

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

**DIDIER SILVEIRA CASTELLANO FILHO**

**PREVALÊNCIA E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A DROGAS DE  
*Streptococcus agalactiae* EM PARTURIENTES USUÁRIAS DO SUS,  
ATENDIDAS EM UMA MATERNIDADE DE JUIZ DE FORA.**

**Juiz de Fora**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

**Didier Silveira Castellano Filho**

**PREVALÊNCIA E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A DROGAS DE  
*Streptococcus agalactiae* EM PARTURIENTES USUÁRIAS DO SUS,  
ATENDIDAS EM UMA MATERNIDADE DE JUIZ DE FORA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde - Área de concentração Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz  
**Co-orientadores:** Prof. Dr. Marcel de Toledo Vieira  
Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva

**Juiz de Fora**

**2008**

**DIDIER SILVEIRA CASTELLANO FILHO**

**PREVALÊNCIA E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A DROGAS DE  
*Streptococcus agalactiae* EM PARTURIENTES USUÁRIAS DO SUS,  
ATENDIDAS EM UMA MATERNIDADE DE JUIZ DE FORA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde - Área de concentração Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde.

**Aprovada em: 03 de novembro de 2008**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho  
Universidade Federal de Minas Gerais

---

Prof. Dr. Tadeu Coutinho  
Universidade Federal de Juiz de Fora

***“Não existe milagre; existe trabalho e progresso.  
Felicidade é consequência”.***

**Isabel Salomão de Campos**

## Dedicatórias

*A Deus, nosso Pai, infinitamente Bom e Justo, pela benção da vida e pela sublime oportunidade desta reencarnação.*

*A Jesus, nosso Mestre e Amigo Maior, pelo amparo e assistência espiritual, percebidos em cada momento desta existência, a me sustentar os passos.*

*À D. Isabel Salomão de Campos, meu exemplo de vida, pela amizade incondicional, pelo amparo nos momentos difíceis e pela orientação espírita, sempre presente, a iluminar meu caminho.*

*À minha esposa Adriana, amor da minha vida, por compartilhar comigo cada passo desta trajetória. Sem sua dedicação, compreensão, carinho e apoio constantes, eu não chegaria ao término desta jornada.*

*Às minhas queridas filhas, Isabelle e Anne, almas amigas que alegam minha existência, renovando diariamente as minhas forças. Amo vocês pela eternidade.*

*Aos meus pais, Didier e Marita, pela educação, pelos exemplos, pelo amparo e apoio que sempre recebi. Minha gratidão eterna.*

# Agradecimentos

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz, que, além de ter me conduzido neste novo caminho, com segurança, dedicação, paciência e competência, é meu exemplo de seriedade, comprometimento e ética na pesquisa científica. Minha gratidão e minha amizade.*

*À minha co-orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Vânia Lúcia da Silva, pela amizade, pela atenção, pelos valiosos ensinamentos, e pela colaboração percebida em todas as fases deste projeto, especialmente, nas etapas de biologia molecular e nas revisões.*

*Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcel de Toledo Vieira, pela palavra de estímulo e pelo aprendizado na análise estatística dos dados.*

*À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Sandra Tibiriçá, pessoa especial colocada por Deus em meu caminho, pela força, pelo incentivo, e por ter acreditado neste projeto quando ele ainda era um sonho distante.*

*À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Ângela Maria Gollner pela amizade, pela orientação nos primeiros passos, e pelas palavras decisivas que me encorajaram a encarar este desafio.*

*Aos colegas do Núcleo de Pesquisa e, aos professores, pesquisadores, funcionários e acadêmicos de iniciação científica do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da UFJF, pelo muito que tenho aprendido na convivência com vocês.*

*Ao amigo e colega de Pós-graduação, Thiago Cesar Nascimento, pela força e apoio, sempre presentes, e pela importante colaboração em várias etapas da pesquisa.*

*Ao meu irmão Ricardo que, mesmo de longe, esteve perto, me apoiando nesta conquista.*

*Aos médicos plantonistas, médicos residentes e enfermeiros do Centro de Parto Normal do Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus, em Juiz de Fora, em especial, à enfermeira-obstetra Adriana Vilella Ávila, e às acadêmicas de enfermagem Kamila Guércio Fernandes e Joseane Braga de Souza, pela colaboração na coleta dos dados.*

*À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Darcília Maria Nagen da Costa pela atenção, paciência e carinho, sempre presentes, na solução das questões ligadas à pós-graduação.*

*Aos meus amigos da Comunidade Espírita “A Casa do Caminho”, pela alegria do convívio, pelo apoio constante e pela amizade sincera, fundamentais para o êxito nesta tarefa.*

## Resumo

O *Streptococcus agalactiae* ou Grupo B de Lancefield (EGB) pode fazer parte da microbiota de seres humanos, colonizando principalmente o trato gastrointestinal e geniturinário. Sua importância médica está associada à transmissão para neonatos durante o parto, o que pode resultar em infecção grave. A prevalência dos EGB entre gestantes varia de 3% a 41%. Medidas internacionais foram sugeridas (detecção de EGB no pré-natal e terapia profilática intraparto) para a prevenção da doença perinatal, o que resultou em decréscimo na sua incidência onde foram adotadas. Nosso trabalho teve como objetivo isolar e identificar linhagens de EGB de parturientes em uma maternidade de Juiz de Fora, MG, e estimar sua prevalência entre estas gestantes. Foram colhidos espécimes clínicos vaginais e anorretais, com auxílio de *swab* estéril, de 221 gestantes admitidas em trabalho de parto, entre outubro/07 e março/08. A prevalência de colonização pelo EGB foi feita utilizando-se a cultura microbiológica clássica seguida da identificação específica por biologia molecular. Foi feita, também, a detecção dos microrganismos diretamente nos espécimes clínicos anorretais e vaginais, também por técnica molecular. Após cultura de enriquecimento em meio seletivo e isolamento de linhagens sugestivas, as amostras foram avaliadas por características morfotintoriais, ausência de produção de catalase e hidrólise de esculina, e sensibilidade a bile. A identificação específica baseou-se na pesquisa do gene codificador para proteína Sip de superfície, conservada em EGB, e da amplificação de região específica do DNA codificador para a região 16S do RNA, por biologia molecular (PCR). Pela metodologia microbiológica clássica, baseada em cultura, EGB foi detectado em 21 das 221 gestantes avaliadas (9,5%), sendo que 25 linhagens foram isoladas e identificadas, considerando-se os 2 sítios de isolamento. Pela metodologia molecular, EGB foi detectado em 72 das gestantes avaliadas (32,6%), considerando-se, também, os 2 sítios avaliados. O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi avaliado, sendo testadas as drogas penicilina, ampicilina, cefazolina, ciprofloxacina, vancomicina, eritromicina e clindamicina, pelo método de disco-difusão (Kirby-Bauer). Os resultados encontrados mostraram uma diminuição da sensibilidade à

eritromicina (22,7%) e à clindamicina (50%). Considerando-se que, no Brasil, ainda não foram adotadas estratégias de prevenção para reduzir a prevalência de infecção neonatal pelo EGB, seu custo de tratamento, a profilaxia empírica e o alto nível de colonização, como observado neste trabalho, percebe-se a necessidade de estudos prospectivos e regionais sobre a ocorrência e perfil de susceptibilidade a drogas de EGB, a fim de se contribuir para elaboração de políticas de saúde, visando reduzir sua transmissão vertical.

PALAVRAS-CHAVE: *Streptococcus agalactiae*. Sepses Neonatal. Doença Estreptocócica Perinatal.

## Abstract

*Streptococcus agalactiae* or Group B of Lancefield (GBS) can be part of the microbiota of the human beings, colonizing especially the gastrointestinal and the genitourinary tract. Its medical importance is associated to the transmission to neonates during the delivery, which can result in severe infection. The prevalence of the GBS among pregnant women ranges from 3% to 41%. International precautions were suggested (detection of the GBS during the prenatal and predelivery prophylaxis therapy) to the prevention of the prenatal disease, which resulted in a decrease in its incidence where they had been adopted. Our work had the aim of isolating and identifying lineages of the GBS in delivering women in a hospital in the city of Juiz de Fora-MG, and esteem its prevalence among these pregnant women. Vaginal and anorectal clinical specimens were collected, with an sterile swab, in 221 pregnant women in labor, between October 2007 and March 2008. The prevalence of GBS colonies was performed using classical microbiologic culture, following the specific identification through molecular biology. It was also performed the detection of microorganisms directly in clinical anorectal and vaginal specimens, also through molecular technique. After enriching culture in selective medium and isolating suggestive lineages, the isolated ones were analyzed by their morpho-tinctorial characteristics, absence of catalase production and esculin hydrolysis, and bile sensitiveness. The specific identification was based on the research of the codifying gene for Sip surface protein, conserved in GBS, as well as on the magnification of the specific region of the codifying DNA for the 16S region in the RNA, through molecular biology (PCR). Through the classical microbiological methodology, based on culture, GBS was detected in 21 out of the 221 pregnant women observed (9.5%), and 25 lineages were isolated and identified, taking into account the two isolation sites. Through molecular methodology, GBS was detected in 72 pregnant women observed (32.6%), also taking into consideration both analyzed sites. The susceptibility profile to antimicrobial was also analyzed, and the following drugs have been tested through the disc-diffusion method (Kirby-Bauer): peniciline, ampicillin, cefazolin, ciprofloxacin, vancomycin, erythromycin and clindamycin. The findings showed a reduction in the sensitivity to erythromycin (22.7%) and clindamycin (50%).

Bearing in mind that in Brazil prevention strategies to reduce the prevalence of neonatal infection through GBS have not been adopted, and taking into account treatment costs, empirical prophylaxis and the high level of colonization, as observed in this work, one can notice the need for prospective and regional studies on the prevalence and susceptibility profile to GBS drugs, in order to contribute to the preparation of health policies aimed at reducing its vertical transmission.

KEY-WORDS: *Streptococcus agalactiae*. Neonatal Sepsis. Perinatal Streptococcal disease.

## Lista de figuras

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Representação esquemática do procedimento de coleta de espécime clínico, com <i>swab</i> estéril, nas regiões anorretal e vaginal, para detecção de <i>Streptococcus agalactiae</i> . Adaptado do site do CDC ( <a href="http://www.cdc.gov">www.cdc.gov</a> ).....   | 43 |
| Figura 2 | Fotografia representativa da prova da bile-esculina. Ausência de hidrólise da esculina (seta) indica prova negativa, como esperado na identificação presuntiva de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....   | 44 |
| Figura 3 | Representação gráfica das freqüências relativas aos sítios de colonização pelo EGB, considerando-se a cultura microbiológica clássica para diagnóstico presuntivo.....  | 56 |
| Figura 4 | Fotografia representativa de eletroforese em gel de agarose de segmentos de DNA amplificados em reação de PCR para detecção e identificação molecular de <i>Streptococcus agalactiae</i> em espécimes clínicos vaginais e anorretais coletados por <i>swab</i> estéril e inoculados em caldo de enriquecimento Todd-Hewitt. A – detecção da amplificação de segmento do gene codificador para proteína Sip de superfície (293pb); B – detecção da amplificação de segmento do gene codificador para o RNA ribossomal 16S bacteriano (590pb). Mm – marcador molecular - <i>100bp DNA ladder</i> ; Canaletas 1 a 9 – espécimes clínicos representativos provenientes das pacientes incluídas no estudo; Cont+ controle positivo <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813..... | 57 |
| Figura 5 | Representação gráfica das freqüências relativas aos sítios de colonização pelo EGB, considerando-se a biologia molecular para detecção direta a partir do espécime clínico.....   | 58 |
| Figura 6 | Prevalência de <i>Streptococcus agalactiae</i> observada entre as parturientes incluídas no estudo, comparando-se as duas metodologias utilizadas: detecção direta no espécime clínico por biologia molecular e recuperação em cultura microbiológica.....  | 58 |
| Figura 7 | Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens de <i>Streptococcus agalactiae</i> isoladas e identificadas a partir de espécimes clínicos obtidos por swabs vaginais e anorretais de parturientes atendidas no Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus, em Juiz de Fora, MG. Penicilina (PEN), ampicilina (AMP), cefazolina (CFZ), ciprofloxacina (CIP), vancomicina (VAN), eritromicina (ERI) e clindamicina (CLI).....   | 59 |

## Lista de tabelas

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Características sócio-demográficas do grupo de estudo.....  | 51 |
| Tabela 2 | Características clínico-obstétricas do grupo de estudo..... | 53 |

## Lista de abreviaturas e siglas

|               |  |
|---------------|--|
| <b>AAP</b>    | <i>American Academy of Pediatrics</i>                      |
| <b>ACOG</b>   | <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i> |
| <b>ATCC</b>   | <i>American Type Culture Collection</i>                    |
| <b>CDC</b>    | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>          |
| <b>CEP</b>    | Comitê de Ética em Pesquisa                                |
| <b>CID 10</b> | Classificação Internacional de Doenças - 10ª edição        |
| <b>CLSI</b>   | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>         |
| <b>DIP</b>    | Doença de Início Precoce                                   |
| <b>DIT</b>    | Doença de Início Tardio                                    |
| <b>DNA</b>    | <i>Deoxyribonucleic acid</i>                               |
| <b>EDTA</b>   | <i>Ethylene diamine tetra-acetic acid</i>                  |
| <b>EGB</b>    | Estreptococo do Grupo B                                    |
| <b>EV</b>     | Endovenosa   |
| <b>HMTJ</b>   | Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus                 |
| <b>MBE</b>    | Medicina Baseada em Evidências                             |
| <b>OMS</b>    | Organização Mundial de Saúde                               |
| <b>PA</b>     | Pressão arterial   |
| <b>PCR</b>    | <i>Polymerase Chain Reaction</i>                           |
| <b>PSF</b>    | Programa de Saúde da Família                               |
| <b>RNA</b>    | <i>Ribonucleic acid</i>                                    |
| <b>SIP</b>    | Sepse de Início Precoce                                    |
| <b>SIT</b>    | Sepse de Início Tardio                                     |
| <b>SUS</b>    | Sistema Único de Saúde                                     |

|             |  |
|-------------|--|
| <b>TBE</b>  | Tris / Borato / EDTA                       |
| <b>TCLE</b> | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| <b>TPP</b>  | Trabalho de Parto Prematuro                |
| <b>Tris</b> | Hidroximetil Aminometano                   |
| <b>TSA</b>  | <i>Tryptone Soy Agar</i>                   |
| <b>UFJF</b> | Universidade Federal de Juiz de Fora       |
| <b>UTIN</b> | Unidade de Terapia Intensiva Neonatal      |

# Sumário

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 18 |
| 2     | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                                       | 21 |
| 2.1   | Considerações sobre a sepse neonatal.....                                | 21 |
| 2.2   | Sepse de Início Precoce e Sepse de Início Tardio.....                    | 22 |
| 2.3   | Histórico e generalidades sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> .....    | 24 |
| 2.4   | Importância do EGB em perinatologia.....                                 | 25 |
| 2.5   | Doença estreptocócica perinatal precoce - estratégias de prevenção.....  | 28 |
| 2.6   | Antibioticoprofilaxia intraparto e resistência bacteriana.....           | 30 |
| 2.7   | A Prevenção da doença no Brasil.....                                     | 33 |
| 3     | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 35 |
| 3.1   | Objetivo geral.....  | 35 |
| 3.2   | Objetivos específicos.....   | 35 |
| 4     | <b>METODOLOGIA</b> .....   | 37 |
| 4.1   | Desenho epidemiológico e população a ser amostrada.....                  | 37 |
| 4.2   | Variáveis.....   | 37 |
| 4.2.1 | Características sócio-demográficas do grupo de estudo.....               | 37 |
| 4.2.2 | Características clínico-obstétricas do grupo em estudo.....              | 39 |
| 4.2.3 | Pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i> (EGB).....                   | 40 |
| 4.3   | Critérios de inclusão.....   | 41 |
| 4.4   | Critérios de exclusão.....   | 42 |
| 4.5   | Avaliação de risco com relação à pesquisa.....                           | 42 |
| 4.6   | Coleta dos espécimes clínicos.....                                       | 42 |
| 4.7   | Identificação presuntiva de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....        | 44 |
| 4.8   | Identificação específica e detecção direta de <i>S. agalactiae</i> ..... | 45 |
| 4.9   | Determinação do perfil de susceptibilidade aos Antimicrobianos.....      | 47 |
| 4.10  | Análise estatística.....   | 48 |
| 5     | <b>RESULTADOS</b> .....  | 50 |
| 5.1   | População amostrada.....   | 50 |
| 5.2   | Pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i> (EGB).....                   | 54 |
| 5.3   | Susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens Recuperadas.....        | 59 |
| 6     | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 60 |
| 7     | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | 68 |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 70 |
|       | <b>ANEXOS</b> .....  | 77 |

# 1 INTRODUÇÃO

Microrganismos da espécie *Streptococcus agalactiae* ou estreptococo do Grupo B de Lancefield (EGB) são bactérias que fazem parte da microbiota residente das membranas mucosas de seres humanos, colonizando, principalmente, o trato gastrointestinal e geniturinário.

A importância maior dos EGB em Perinatologia está relacionada à contaminação vertical dos neonatos de parturientes colonizadas, que pode acontecer de forma ascendente ainda no útero ou durante o parto. Mundialmente, a prevalência da colonização pelos estreptococos do grupo B nas gestantes varia de 3% a 41 %. Entre as infecções neonatais associadas a estes microrganismos destacam-se, principalmente, a septicemia e a pneumonia, e, em menor incidência, meningite, celulite, osteomielite e artrite séptica.

Preocupados com a incidência e, principalmente, com a gravidade que a infecção estreptocócica adquire nos recém-nascidos, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), o *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) e a *American Academy of Pediatrics* (AAP) publicaram, em 1996, o primeiro guia para a prevenção da doença estreptocócica perinatal. Este guia de condutas estabeleceu as diretrizes e os critérios para a prevenção da doença. Em 2002, as recomendações foram revisadas, utilizando-se a metodologia de Medicina Baseada em Evidências (MBE), estabelecendo-se como estratégia para a prevenção da transmissão vertical, o uso da profilaxia antimicrobiana intraparto e a investigação rotineira da colonização pelo *S. agalactiae* no final da gestação, através de cultura de material vaginal (porção do terço inferior) e anorretal, em meio seletivo. Nos

países que adotaram estas medidas profiláticas, registrou-se um decréscimo significativo na incidência da doença.

No Brasil, a mortalidade neonatal é um grave problema de saúde pública. No entanto, ainda não foram adotadas estratégias de prevenção e tratamento para reduzir a prevalência da infecção perinatal pelo EGB, uma vez que o tema não está contemplado no Manual Técnico de Pré-natal e Puerpério – Atenção Qualificada e Humanizada do Ministério da Saúde, edição 2006.

Apesar de a literatura mostrar a relevância epidemiológica da colonização materna pelo EGB, pelas conseqüências para as parturientes e os recém-nascidos e pelos custos delas decorrentes, este fenômeno, no Brasil, permanece pouco conhecido e valorizado pelos profissionais da saúde. Estudos nacionais sobre a prevalência de *S. agalactiae* em parturientes brasileiras são raros, o que dificulta a elaboração de estratégias profiláticas para dar suporte às políticas de saúde, objetivando reduzir a transmissão vertical.

A resistência dos EGB aos antibióticos habitualmente empregados na antibioticoprofilaxia intraparto (penicilina ou ampicilina) não foi, ainda, descrita na literatura disponível, o mesmo ocorrendo com relação à cefazolina e à vancomicina. Entretanto, já tem sido relatada resistência à eritromicina, à clindamicina, à gentamicina, à tetraciclina e, mais recentemente, às fluoroquinolonas.

Percebe-se, assim, a importância da geração de dados científicos nacionais sobre o tema. Este projeto nasceu da busca do melhor caminho para associar o trabalho de pesquisa acadêmica à atividade profissional do mestrando, que vivencia, em sua especialidade médica, a problemática abordada nesta introdução. Na proposta pretendeu-se contribuir com dados sobre a prevalência, a identificação de possíveis fatores associados à colonização de *Streptococcus* do grupo B em

parturientes, no nosso meio, e o seu perfil de susceptibilidade às drogas de interesse clínico-microbiológico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Considerações sobre a Sepses Neonatal

De acordo com a 10ª edição da Classificação Internacional de Doenças (CID 10), o período neonatal começa no nascimento e termina após 28 dias de vida completos (LAURENTI & BUCHALLA, 1997). Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), as causas mais comuns de morte no período neonatal são as infecções (incluindo septicemia, meningite, infecções respiratórias, diarreia, e tétano neonatal), a asfixia neonatal e a prematuridade (VERGNANO *et al.*, 2005).

A sepsis neonatal é um dos principais problemas de saúde em todo o mundo. A cada ano, aproximadamente 30 milhões de recém-nascidos são acometidos, e cerca de 1 a 2 milhões, vão a óbito (AFROZA, 2006). Sua incidência varia de 7,1 a 38 por 1000 nascidos vivos na Ásia, de 6,5 a 23 por 1000 nascidos vivos na África, de 3,5 a 8,9 por 1000 nascidos vivos na América do Sul e Caribe, e de 1,5 a 3,5 por 1000 nascidos vivos nos Estados Unidos e Austrália (VERGNANO *et al.*, 2005). Geralmente, ocorre nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) ou em berçários intermediários, sendo mais freqüente em neonatos prematuros. De acordo com o tempo de início da doença, é classificada em sepsis de início precoce e sepsis de início tardio (KAUFMAN & FAIRCHILD, 2004). Estudos recentes sobre infecções em UTIN têm utilizado como ponto de corte o tempo entre 48 e 72 horas de vida para distinguir entre sepsis de início precoce e sepsis de início tardio. Alguns autores consideram o tempo classicamente adotado de 6 dias completos, e outros, ainda subcategorizam a sepsis que se inicia nas primeiras 24 horas (GRAY, 2007).

O diagnóstico da septicemia do recém-nascido deve associar dados clínicos e microbiológicos. O diagnóstico clínico é dificultado pelo fato de a sintomatologia ser inespecífica. Clinicamente, a doença pode manifestar-se por um ou mais sinais, como queda do estado geral, hipotermia ou hipertermia, hiperglicemia, apnéia, além de insuficiência respiratória, choque e sangramento. Dessa forma, para fechar o diagnóstico e determinar a melhor conduta terapêutica o médico deve ter, além da avaliação clínica, a avaliação laboratorial, que deve incluir hemograma completo, nível de plaquetas, proteína C reativa e dados microbiológicos incluindo hemoculturas e cultura de líquido. (ANDERSON-BERRY, BELLIG, & OHNING, 2006; ADAMS-CHAPMAN & STOLL, 2006; BRASIL, 2006b).

## **2.2 Sepses de Início Precoce e Sepses de Início Tardio**

De acordo com o CDC, todas as infecções no período perinatal são consideradas infecções hospitalares, com exceção das transmitidas por via transplacentária, que são consideradas infecções comunitárias. Dentro desse conceito, são consideradas infecções hospitalares de origem materna as infecções cujas manifestações clínicas ocorram até 48 horas de vida. As infecções hospitalares com manifestação clínica a partir de 48 horas são consideradas adquiridas na unidade neonatal. Esta definição do CDC é adotada por muitos serviços de controle de infecções hospitalares no Brasil (BRASIL, 2006b).

A sepsis de início precoce ocorre, geralmente, por transmissão vertical em decorrência da contaminação do neonato por patógenos do canal do parto (via ascendente) ou da contaminação secundária à bacteremia materna (via

transplacentária). Entre os microrganismos associados à sepse de início precoce incluem-se *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* e *Listeria monocitogenes*, embora os *S. agalactiae* figurem como as bactérias mais frequentemente associadas. (ANDERSON-BERRY, BELLIG, & OHNING, 2006; BRASIL, 2006b). Cerca de 85% dos casos de sepse de início precoce têm início nas primeiras 24 horas de vida do neonato e podem progredir rapidamente acometendo múltiplos órgãos. A mortalidade varia entre 5 e 50% (JIANG *et al.*, 2004). Em relação à etiologia, este tipo de infecção difere, consideravelmente, daquelas relacionadas aos quadros clínicos de sepse de início tardio (GRAY, 2007).

A sepse de início tardio ocorre, na maioria dos casos, entre 48-72 horas e 90 dias de vida em decorrência da contaminação do recém-nascido por microrganismos do ambiente onde se encontra internado (infecção hospitalar). Em países desenvolvidos, os principais agentes responsáveis por esta condição clínica nas unidades de terapia intensiva neonatal são os *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (ANDERSON-BERRY, BELLIG, & OHNING, 2006; ADAMS-CHAPMAN & STOLL, 2006; BRASIL, 2006b). Em países da América do Sul, incluindo o Brasil, bactérias Gram negativo e *Staphylococcus aureus* ainda são os principais agentes de infecção, em grande parte dos hospitais, seguidos pelo EGB, bactérias anaeróbias e fungos leveduriformes, como os do gênero *Candida*. Fato relevante é a importância crescente dos fungos como agentes causadores de sepse de início tardio (BRASIL, 2006b). As infecções virais não são usualmente associadas às diferentes formas de sepse neonatal (GRAY, 2007).

### 2.3 Histórico e Generalidades sobre os *Streptococcus agalactiae*

O termo *Streptococcus* foi utilizado pela primeira vez em 1874, para descrever um microorganismo com morfologia esférica, disposto aos pares ou em pequenas cadeias, freqüentemente isolado de feridas supuradas. Com o avanço das técnicas de estudo microbiológico, novas espécies foram descritas e, até mesmo, alguns gêneros foram criados. O nome da espécie *Streptococcus agalactiae* foi sugerido em 1896 para designar os estreptococos isolados do leite, devido ao tipo de infecção a que foram associados, a mastite bovina (HARDIE & WHILEY, 1997).

As primeiras classificações do gênero *Streptococcus* foram baseadas na atividade hemolítica e nas reações sorológicas com os anticorpos de Lancefield. A utilização do meio ágar sangue possibilitou a diferenciação quanto ao padrão de hemólise em  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (este, não hemolítico), sendo este um grande passo na diferenciação dos estreptococos (FACKLAM, 2002). Em 1933, Rebecca Lancefield desenvolveu uma classificação para estas bactérias, baseada nas características antigênicas do carboidrato C da parede celular (LANCEFIELD, 1933). Em 1934, o estreptococo hemolítico bovino (*S. agalactiae*) foi diferenciado sorologicamente, e classificado como pertencente ao Grupo B. A partir daí, o *Streptococcus agalactiae* foi, também, denominado Estreptococo do Grupo B de Lancefield (LANCEFIELD, 1934).

Em 1937, os estreptococos foram classificados em quatro grupos: piogênico, viridans, lático e enterococo, sendo que o *S. agalactiae* ficou no grupo B dos piogênicos (FACKLAM, 2002). Desde então, foram propostas e aceitas várias modificações relacionadas à taxonomia dos estreptococos, com base na aplicação de técnicas genéticas, que incluem: hibridização DNA-DNA, hibridização DNA-RNA

ribossômico (rRNA) e seqüenciamento da subunidade 16S do RNA ribossômico. Na edição de 2003 do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, a família *Streptococcaceae* está dividida em 2 gêneros, o *Lactococcus* e o *Streptococcus*, com mais de 50 espécies (GARRITY, BELL & LILBURN, 2003).

Os microrganismos da espécie *S. agalactiae*, assim como as outras espécies do gênero, são cocos Gram positivo, catalase negativos, oxidase negativos que, caracteristicamente, crescem aos pares ou em cadeias. São imóveis e não-esporulados. Considerando-se o metabolismo energético, são classificados como anaeróbios facultativos, obtendo energia para a síntese de material celular através da fermentação dos carboidratos (KONEMAN *et al.*, 2008). Diferenciadas em onze sorotipos distintos relacionados aos determinantes antigênicos da superfície celular, estas bactérias fazem parte da microbiota residente das membranas mucosas de seres humanos e de outros animais, colonizando, principalmente, os tratos gastrintestinal e geniturinário na espécie humana (CDC, 1996; SIMÕES, 2007).

## **2.4 Importância do EGB em Perinatologia**

De acordo com a CID 10, o período perinatal se inicia com 22 semanas completas (154 dias) de gestação, terminando com sete dias completos após o nascimento (LAURENTI & BUCHALLA, 1997).

A maior atenção ao estreptococo do grupo B em Perinatologia ocorreu na década de 70, quando relatórios norte-americanos apontaram-no como o principal agente causador de sepse neonatal. Nas décadas de 80 e 90, foi responsável por cerca de 7.500 novos casos a cada ano (CDC, 1996). Em vários estudos, em

especial um multicêntrico envolvendo 52.406 nascimentos, realizado nos Estados Unidos da América (EUA), o EGB foi o agente mais prevalente nos casos de sepse neonatal precoce (SCHUCHAT *et al.*, 2000). Dentre as infecções neonatais causadas pelo *S. agalactiae* destacam-se a septicemia e a pneumonia e, em menor incidência, meningite, celulite, osteomielite e artrite séptica (CDC, 2002).

Mundialmente, a colonização pelos EGB tem sua prevalência entre as gestantes variando de 3% a 41 % (VACILOTO *et al.*, 2002; POGERE *et al.*, 2005; EISENBERG *et al.*, 2006; WINN, 2007; SAVOIA *et al.*, 2008; THIBAUDON *et al.*, 2008). Autores brasileiros encontraram taxas de colonização variando entre 5 e 25% em estudos regionais (OLIVEIRA *et al.*, 1985; SMÂNIA JÚNIOR *et al.*, 1986; PELLEGRINI, 1999; BERALDO *et al.*, 2004; POGERE *et al.*, 2005; SIMÕES *et al.*, 2007), sendo que não se constatou na literatura relatos sobre a prevalência desta bactéria na região da Zona da Mata Mineira.

A colonização neonatal pelo EGB resulta da transmissão vertical (mãe-feto) por via ascendente, seja antes do parto, por aspiração de líquido amniótico infectado através das membranas íntegras ou rotas (ou com microrroturas), seja no momento do parto, por contato do microrganismo com os tecidos fetais no canal do parto colonizado ou, ainda, por aspiração de secreções vaginais pelo feto (MOYO *et al.*, 1996; CDC, 2002). A taxa de colonização em recém-nascidos de mulheres colonizadas é de, aproximadamente, 50%, independentemente da via de parto. A colonização pelo EGB em gestantes é, geralmente, assintomática e intermitente, podendo a bactéria causar infecção do trato urinário em até 4% das gestações, e estando, no puerpério, associada com casos de corioamniotite, endometrite, meningite ou, mais raramente, septicemia materna. A detecção da bactéria na urina é fator preditivo da intensidade da colonização. Entre os recém-nascidos

colonizados, 2% se tornam infectados (CDC, 2002; PETTERSSON, 2007).

A doença estreptocócica perinatal pelo EGB segue dois padrões conhecidos como: Doença de Início Precoce (DIP) e Doença de Início Tardio (DIT). Classicamente, considera-se que a DIP pelo EGB ocorre na primeira semana de vida e a DIT a partir do sétimo dia, até três meses (CDC, 1996). Alguns autores consideram como ponto de corte o tempo entre 48 e 72 horas de vida para distinguir entre DIP e DIT (PETTERSSON, 2007). De acordo com dados da literatura sobre a epidemiologia das doenças neonatais causadas por EGB em todo o mundo, a doença de início precoce ocorre com uma incidência de 0,7 a 3,7 por 1.000 nascidos vivos e a doença de início tardio ocorre com uma incidência de 0,5 a 1,8 por 1.000 nascidos vivos. Em, aproximadamente, 90% dos casos, os sinais de infecção grave irão aparecer nas primeiras 72 horas de vida, sendo que 85% irão se manifestar nas primeiras 24 horas (PETTERSSON, 2007). Os recém-nascidos de gestantes colonizadas apresentam um risco até 29 vezes maior de adquirir infecção precoce do que os recém-nascidos de gestantes cuja cultura foi negativa (BALTIMORE, 2007; HEATH & SCHUCHAT, 2007).

Segundo o CDC, os índices de mortalidade pela doença estreptocócica perinatal em recém-nascidos prematuros, nos Estados Unidos, no período de 1996 a 2004, foram de 23% na DIP e 9% na DIT. Entre os recém-nascidos de gestação a termo, o índice foi de 4% (CDC, 2005). No Brasil, são escassos os dados referentes à morbidade e mortalidade pela doença perinatal causada por EGB. Em um estudo recente realizado em Porto Alegre, RS, foi registrada a taxa de mortalidade em torno de 20% (MIURA & MARTIN, 2001; VACILOTO *et al.*, 2002).

## 2.5 Doença Estreptocócica Perinatal Precoce - Estratégias de Prevenção

Preocupados com a incidência e, principalmente, com a gravidade que a infecção estreptocócica oferece aos recém-nascidos, o CDC, o ACOG e a AAP publicaram, em 1996, o primeiro guia para prevenção da doença estreptocócica perinatal (CDC, 1996). Este guia recomendava a opção entre duas estratégias para indicação da profilaxia com drogas antimicrobianas: a primeira, baseada no grupo de risco e a segunda, baseada em culturas obtidas no final da gestação. Eram consideradas de risco, e assim recebiam a antibioticoprofilaxia intraparto, todas as gestantes que apresentavam, pelo menos, um dos seguintes critérios: trabalho de parto anterior à 37<sup>a</sup> semana de gestação; febre intraparto ( $>$  ou  $= 38^{\circ}\text{C}$ ) e ruptura de membrana amniótica superior a 18 horas. Pela outra conduta, o antibiótico era indicado às gestantes cujo *swab* anorretal ou vaginal, colhido entre a 35<sup>a</sup> e a 37<sup>a</sup> semana, era positivo para o EGB. A profilaxia era indicada, independentemente do grupo de risco, quando havia antecedente desta doença em gestação anterior ou quando era diagnosticada bacteriúria pelo *S. agalactiae* durante a gravidez (CDC, 1996; HEATH & SCHUCHAT, 2007).

Em 2002, as recomendações foram revisadas e, utilizando-se a metodologia da Medicina Baseada em Evidências (MBE), ficaram estabelecidos, de maneira definitiva, os critérios e as diretrizes para a prevenção da doença. O guia de condutas de 2002 definiu como estratégias para a prevenção da transmissão vertical, além da antibioticoprofilaxia intraparto, a investigação rotineira da colonização pelo EGB no final da gestação pela cultura de material vaginal e anorretal (porção do terço inferior da vagina e anorretal), em meio seletivo, coletado

com swab, entre a 35<sup>a</sup> e a 37<sup>a</sup> semana de gestação. A antibioticoprofilaxia permaneceu indicada a todas as gestantes colonizadas. Nos casos de parturientes das quais o resultado da cultura não estivesse disponível, a profilaxia estava indicada, caso a paciente apresentasse qualquer um dos critérios de risco anteriormente descritos (CDC, 2002).

Segundo alguns autores, a cultura bacteriana é considerada o padrão-ouro para a detecção do EGB, quando se utiliza material obtido de coleta vaginal e anorretal, semeado em meio de cultura específico (EL BEITUNE, DUARTE & MAFFEI, 2005). Métodos moleculares baseados na amplificação de ácidos nucléicos, utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido estudados, com potencial uso clínico (KONG, MA & GILBERT, 2005).

O aprimoramento dos recursos laboratoriais e clínicos tem, certamente, impacto na profilaxia da infecção perinatal pelo EGB. O teste rápido para detecção da colonização utilizando a técnica de PCR, apesar de ter o custo mais elevado do que a cultura pode ser uma opção para as parturientes sem o diagnóstico feito no pré-natal (CDC, 2002; SIMÕES *et al.*, 2007). Além disso, a imunoprofilaxia também tem sido sugerida para a prevenção da infecção pelo EGB. Acredita-se que o desenvolvimento de uma vacina específica contra o *S. agalactiae* seja a única solução efetiva na prevenção dessa infecção tão importante, prevalente e letal para os recém-nascidos, além de minimizar o impacto da resistência desse microrganismo a drogas antimicrobianas. As preparações vacinais atualmente desenvolvidas têm sido efetivas somente sobre alguns sorotipos do EGB, mais prevalentes em algumas regiões geográficas do mundo (JOHRI *et al.*, 2006).

Segundo alguns autores, considerando-se que as propostas de inclusão de novas condutas médicas relacionadas aos exames pré-natais em gestantes

enfrentam um grande debate ético-científico, pela dificuldade de realização de estudos duplo cegos randomizados em gestantes, vários questionamentos ainda permanecem em relação à vacina contra o EGB. Estes questionamentos são direcionados ao número ideal de doses, à necessidade de reforços, à real proteção clínica, ao número de sorotipos cobertos e à validação da vacinação em larga escala (SILVA & RICHTMANN, 2006).

## **2.6 Antibioticoprofilaxia Intraparto e Resistência Bacteriana**

A profilaxia intraparto com drogas antimicrobianas tem-se mostrado efetiva como estratégia para a prevenção da transmissão vertical do EGB. De acordo com o CDC o seguinte esquema é recomendado: penicilina G cristalina - 5 milhões de unidades endovenosa (EV) como dose de ataque, no momento da internação da paciente em trabalho de parto, e 2,5 milhões de unidades EV a cada 4 horas até o parto. Como alternativa, pode ser empregada ampicilina 2g EV na dose de ataque e 1g EV a cada 4 horas, até o parto (CDC, 2002).

Para a paciente alérgica à penicilina existem duas alternativas: se a gestante for considerada de alto risco para anafilaxia (apresentar história de reação de hipersensibilidade imediata, angioedema, urticária e/ou asma), realizar o teste de susceptibilidade da amostra isolada à clindamicina e à eritromicina. Em caso de sensibilidade às drogas testadas, utilizar 900mg de clindamicina EV a cada 8 horas, até o parto, ou 500mg EV de eritromicina a cada 6 horas até o parto, sendo que, esta última apresentação (Eritromicina EV), não se encontra disponível, atualmente, no Brasil. Por outro lado, se a gestante for considerada de baixo risco para

anafilaxia, utilizar cefazolina 2g EV como dose de ataque e 1g EV a cada 8 horas, até o parto (CDC, 2002).

A vancomicina deve ser utilizada na dose de 1g EV a cada 12 horas até o parto, caso a gestante seja alérgica à penicilina ou considerada de alto risco para anafilaxia, com a condição de que a linhagem bacteriana isolada seja resistente ou de susceptibilidade desconhecida à eritromicina ou à clindamicina (CDC, 2002).

Com a implementação da pesquisa do EGB em gestantes e da profilaxia antimicrobiana intraparto registrou-se, em todos os países que adotaram as diretrizes do CDC, um significativo decréscimo na incidência da doença estreptocócica perinatal (SHARE *et al.*, 2001), sendo que, nos Estados Unidos, de 1990 até 2000, foi registrada a diminuição de 70% na incidência da doença (CDC, 2002; CDC, 2005; EISENBERG *et al.*, 2006).

Considerando-se a ocorrência de bactérias potencialmente patogênicas e a terapia a ser instituída para prevenção e tratamento de doenças infecciosas, as drogas antimicrobianas figuram como ferramentas que têm reduzido a mortalidade, mas não a persistência de doenças infecciosas. Devido ao uso e, às vezes, abuso, estas drogas estimulam a evolução bacteriana em direção ao desenvolvimento de resistência, por novos mecanismos de adaptação e sua transmissão para as novas gerações (BOHNEN, 1998).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é, geralmente, espécie ou gênero específico, enquanto que a adquirida está presente em apenas algumas linhagens da espécie ou do gênero. Este fato é relacionado com a mutação em gene bacteriano ou com a aquisição de nova informação genética, por mecanismos de recombinação, como a conjugação, a transformação ou a transdução (LEVY, 1998).

A resistência bacteriana a drogas antimicrobianas é um fenômeno que pode ser analisado sob diferentes aspectos. Do ponto de vista genético, a resistência pode ser mediada por genes cromossômicos, por genes situados em elementos extracromossomais, tais como os plasmídios, ou, ainda, em elementos móveis do próprio genoma, como os transposons e, mais recentemente, os integrons. Assim, além do desenvolvimento da resistência por alteração em genes cromossomais, por meio de mutações ou expressão de genes intrínsecos pela pressão exercida por uma droga, os microrganismos podem adquirir resistência aos antimicrobianos pela aquisição de elementos extracromossomais que contenham marcadores de resistência (LEVY, 1998; ASM, 2000).

A resistência do EGB aos antimicrobianos habitualmente empregados na profilaxia intraparto (penicilina ou ampicilina) ainda não foi observada no Brasil e em outros países, o mesmo ocorrendo em relação à cefazolina e à vancomicina. Entretanto, altos índices de resistência à eritromicina, à clindamicina e às fluoroquinolonas têm sido relatados. (DECOSTER *et al.*, 2005; SCHOENING, WAGNER & ARVAND, 2005; MIRÓ *et al.*, 2007). Além disso, no Brasil, alguns estudos mostram a ocorrência de linhagens de *S. agalactiae* resistentes à gentamicina e à tetraciclina (ALVES, 2005; DUARTE *et al.*, 2005).

Assim, o comportamento desse grupo microbiano, à semelhança do observado para outros microrganismos de interesse clínico, reforça a preocupação dos Órgãos de Saúde Internacionais que consideram o fenômeno da resistência bacteriana como um dos grandes desafios da ciência no século XXI (ASM, 2000).

## 2.7 A Prevenção da Doença no Brasil

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a mortalidade neonatal é um grave problema de saúde pública (BRASIL, 2006). Do total de mortes de crianças menores de um ano, 52% ocorrem no período neonatal, como decorrência direta da qualidade da atenção dispensada na gestação, no parto e no puerpério (BRASIL, 2006).

O pré-natal de baixo risco é realizado pelos profissionais do Programa de Saúde da Família (PSF), em 92% dos municípios brasileiros (BRASIL, 2008). É importante que a massa crítica dos médicos de família e dos obstetras responsáveis pelo pré-natal de alto risco que atuam no nível de atenção secundária, seja alertada quanto às possíveis infecções sintomáticas e assintomáticas em gestantes, muito embora, até o momento, o exame microbiológico para detecção do *S. agalactiae*, na rotina pré-natal, não esteja disponível nos laboratórios vinculados ao Sistema único de Saúde (SUS).

Infelizmente, não dispomos de estratégias públicas de prevenção e tratamento direcionados à redução da prevalência da infecção neonatal pelo estreptococo do grupo B, uma vez que o tema não está incluído no Manual Técnico de Pré-natal e Puerpério – Atenção Qualificada e Humanizada do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006). Dentre os vários motivos da pouca atenção dada ao assunto está, certamente, a escassez de produção científica nacional que possibilite qualificar e quantificar o problema, para dar suporte à proposição de diretrizes dentro da nossa realidade.

Portanto, considerando-se, em síntese:

1. A relevância da ocorrência de *Streptococcus agalactiae* em gestantes e as eventuais implicações para as parturientes e os recém-nascidos;
2. Os custos de prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças neonatais;
3. A crescente resistência a drogas antimicrobianas e a disseminação de marcadores na comunidade e no ambiente hospitalar;
4. A importância da disponibilidade de dados regionais que permitam ações educativas e que sirvam de suporte para a prática clínica e;
5. A carência de dados regionais sobre a prevalência desses microrganismos em gestantes.

Percebe-se a necessidade da geração de conhecimento científico de cunho clínico-microbiológico, envolvendo estreptococos do grupo B em parturientes no nosso meio. Espera-se, com isto, que as políticas públicas brasileiras sejam respaldadas pelos saberes científicos oriundos, também, de estudos nacionais e regionais, que expressem, de fato, a nossa realidade.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Conhecer a prevalência da colonização por *Streptococcus agalactiae* em parturientes usuárias do SUS, atendidas em uma maternidade no município de Juiz de Fora, MG, identificando possíveis fatores associados a essa colonização e o perfil de susceptibilidade destes microrganismos a drogas antimicrobianas de interesse clínico-microbiológico.

### 3.2. Objetivos específicos

1. Isolar e identificar, por métodos dependentes de cultivo, amostras de *S. agalactiae* presentes em espécimes vaginais e retais de parturientes usuárias do SUS, em uma maternidade do município de Juiz de Fora, MG;
2. Detectar, por método molecular, a presença de *S. agalactiae* nos espécimes clínicos e no meio de enriquecimento inoculado;
3. Estabelecer a prevalência da colonização por *S. agalactiae* na população estudada;

4. Identificar os possíveis fatores sócio-demográficos e obstétricos associados à colonização por *S. agalactiae* na população estudada.
  
5. Determinar o perfil de susceptibilidade das linhagens de *S. agalactiae*, isoladas e identificadas, a drogas antimicrobianas de interesse clínico e microbiológico;

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Desenho Epidemiológico e população a ser amostrada

Trata-se de um estudo descritivo transversal seccional, cuja medida de prevalência foi avaliada pelo número de casos de parturientes usuárias do SUS colonizadas pela bactéria *Streptococcus agalactiae* em relação ao número total de parturientes submetidas à coleta, nas mesmas condições. O estudo foi realizado no Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus (HMTJ), situado no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, no período de outubro de 2007 a março de 2008.

A amostra probabilística, que representasse bem a população alvo, foi obtida através da coleta de secreção vaginal e anorretal de 221 parturientes, após sua admissão na maternidade e esclarecimento. Em seguida, as pacientes foram encaminhadas à sala de pré-parto para a assistência adequada a cada caso, durante o trabalho de parto.

### 4.2 Variáveis

#### 4.2.1 Características sócio-demográfias do grupo de estudo

- **Idade:** diferença entre a data do nascimento e a data da coleta dos dados, calculada em anos completos de vida, segundo consta no prontuário médico.

- **Estado civil:** situação conjugal da parturiente, segundo consta no prontuário – solteira, casada, outro.
- **Raça (Cor da pele):** tonalidade da pele, conforme consta no prontuário – branca, negra, parda, amarela, outra.
- **Escolaridade:** último grau completado na escola, segundo consta no prontuário – ignorado, nenhum, fundamental incompleto, fundamental completo, médio incompleto, médio completo, superior incompleto e superior completo.
- **Ocupação profissional:** descrição de atividade laborativa remunerada realizada fora do lar, segundo consta no prontuário, ou de atividade laborativa não remunerada no lar.
- **Procedência:** local de moradia da parturiente, segundo prontuário – Região de Juiz de Fora ou outra cidade. Para as pacientes residentes em Juiz de Fora, foi atribuído o endereço de acordo com a região do município (centro, leste, nordeste, noroeste, norte, oeste, sudeste e sul).

#### 4.2.2 Características clínico-obstétricas do grupo em estudo

- **Número de gestações:** número de vezes que a mulher esteve grávida, independentemente do resultado da gravidez, segundo consta no prontuário.
- **Paridade:** número de partos, segundo consta no prontuário.
- **Hipertensão arterial nesta gestação:** história de níveis pressóricos elevados (PA sistólica/diastólica  $>$  ou  $=$  140/90 mmHg) identificados no exame admissional da paciente na maternidade e/ou pelo uso de medicação anti-hipertensiva prescrita pelo médico pré-natalista; segundo consta no prontuário – presente, ausente.
- **Presença de diabetes nesta gestação:** história de diabetes (Tipo 1, Tipo 2 ou Gestacional) nesta gestação, segundo consta no prontuário - presente, ausente.
- **Amniorrexe prematura  $\geq$  18 horas nesta gestação:** ruptura das membranas âmnio-coriais ocorrida a partir de 20 semanas de gravidez e antes do início do trabalho de parto por tempo  $\geq$  18 horas, segundo consta no prontuário – presente, ausente
- **Febre:** temperatura axilar maior ou igual a 38° C, aferida no momento da internação, conforme consta no prontuário – presente, ausente.
- **Antecedente de infecção do trato urinário nesta gestação:** Leucocitúria e presença de colonização bacteriana no trato urinário, detectada pelo exame de urina, conforme anotação no prontuário – ausente, *Streptococcus agalactiae*, outros.

- **História de infecção neonatal por EGB:** história de infecção por EGB em recém-nascidos de gestações anteriores, segundo consta no prontuário - presente, ausente.
- **Idade Gestacional:** tempo de gestação expresso em semanas, no momento da internação.
- **Pré-natal:** descrição se a paciente fez pré-natal: sim ou não, segundo consta no prontuário.
- **Número de consultas:** número de vezes que a paciente esteve na unidade de saúde para sua consulta pré-natal, segundo consta no prontuário - de 01 a 03, de 04 a 06, ou mais de 06.
- **Antecedente de trabalho de parto prematuro nesta gestação:** história de contrações uterinas regulares e persistentes, antes de 37 semanas de gestação, acompanhadas de modificações cervicais e que necessitaram de internação hospitalar, segundo consta no prontuário – presente, ausente.

#### 4.2.3 Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* (EGB)

- **Colonização por EGB:** presença de EGB, detectada através de cultura de enriquecimento em meio seletivo e isolamento de amostras sugestivas, posteriormente avaliadas por características morfotintoriais e por PCR e detecção direta nos espécimes, após cultura de enriquecimento por biologia molecular – presente, ausente.

- **Sítio de colonização:** avaliação do sítio de colonização do EGB nas amostras positivas, considerando-se tanto a cultura microbiológica, quanto a detecção molecular – vaginal, anorretal ou vaginal e anorretal.
- **Susceptibilidade do EGB aos antimicrobianos:** resposta do EGB, quando exposto *in vitro*, aos antimicrobianos testados pelo método de disco-difusão (penicilina, ampicilina, clindamicina, eritromicina, cefazolina, ciprofloxacina, vancomicina), segundo análise laboratorial – sensível, resistente, resistência intermediária.

### 4.3 Critérios de Inclusão

Foram considerados critérios de inclusão: gestante admitida para assistência ao parto que aceitou participar deste estudo após esclarecimentos sobre os objetivos e procedimentos e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o parecer nº. 004/2007. Não foi realizada qualquer modificação na rotina assistencial, a não ser as coletas de espécimes clínicos anorretais e vaginais, sendo este procedimento inócua para a parturiente e para o feto. A identificação das pacientes doadoras de espécime clínico foi mantida em absoluto sigilo.

#### **4.4 Critérios de Exclusão:**

Foram considerados critérios de exclusão: paciente que tenha feito uso de drogas antimicrobianas nos últimos 30 dias anteriores à admissão; as que estavam em trabalho de parto muito avançado, com iminência do parto e as pacientes que não concordaram em participar deste estudo.

Os dados dos prontuários das mulheres parturientes que satisfizeram aos critérios de inclusão foram coletados de acordo com o Formulário para Coleta de Dados (ANEXO B).

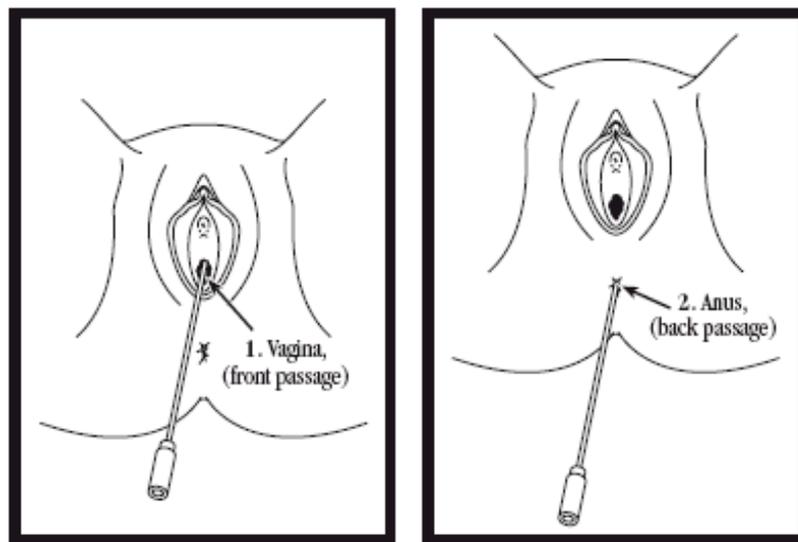
#### **4.5 Avaliação de risco com relação à pesquisa:**

As participantes do estudo não foram submetidas a nenhum procedimento clínico que oferecesse riscos físicos ou dolorosos para as elas ou para os seus bebês. Considerada pesquisa com risco mínimo, eventuais desconfortos emocionais foram minimizados, uma vez que as amostras foram coletadas durante os exames admissionais realizados rotineiramente na maternidade, por ocasião da internação.

#### **4.6 Coleta dos espécimes clínicos:**

A coleta e o processamento dos espécimes clínicos foram realizados de acordo com as recomendações do CDC (CDC, 2002), por profissionais da área médica e de enfermagem, previamente capacitados. O isolamento de linhagens de *S. agalactiae* foi feito a partir de avaliação microbiológica qualitativa de espécimes obtidos em dois sítios anatômicos (FIGURA 1):

- Cultura vaginal, cujo espécime foi obtido pela introdução de um *swab* estéril através do intróito vaginal e coleta de amostra de secreção ou muco do terço distal da vagina, antes de qualquer antissepsia perineal e sem uso de espéculo;
- Cultura anorretal, obtida com um segundo *swab* estéril, introduzido através do orifício anorretal para coleta de amostra da parede distal do reto.



**FIGURA 1.** Representação esquemática do procedimento de coleta de espécime clínico, com *swab* estéril, nas regiões anorretal e vaginal, para detecção de *Streptococcus agalactiae*. Adaptado do site do CDC ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

Cada um dos dois *swabs* foi imediatamente inoculado, separadamente, em meio Todd-Hewitt<sup>1</sup> suplementado com gentamicina- 8 µg/ml<sup>2</sup>, ácido nalidíxico - 15 µg/ml<sup>3</sup> e azida sódica 0,02%<sup>4</sup> para enriquecimento e isolamento seletivo de *Streptococcus agalactiae*. Os tubos inoculados foram encaminhados num prazo máximo de 24 horas ao Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da

<sup>1</sup> Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, MI, USA

<sup>2</sup> Schering-Plough, RJ, Brasil

<sup>3</sup> Homeopatia Santos, MG, Brasil

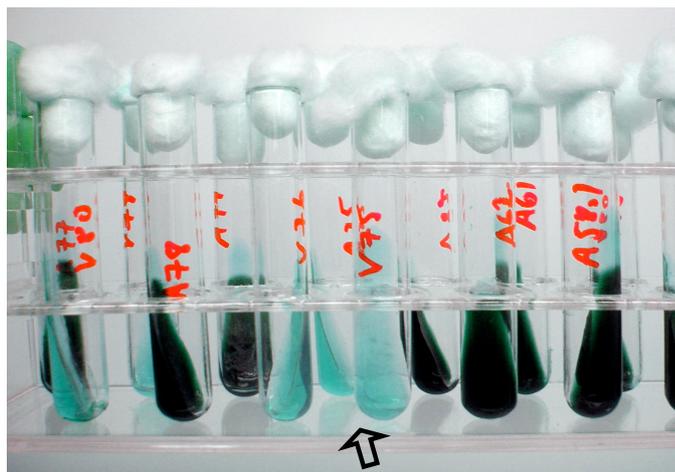
<sup>4</sup> Sigma-Aldrich, Inc., MO, USA

Universidade Federal de Juiz de Fora, e incubados em estufa bacteriológica 35,5°C, por 18 a 24 horas.

#### 4.7 Identificação presuntiva de *Streptococcus agalactiae*

Após o período de enriquecimento, as culturas foram inoculadas, por esgotamento, em placas de Petri contendo Ágar Triptona de Soja-TSA<sup>5</sup> suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e incubado na mesma atmosfera, a 35,5°C, por 24 horas.

Culturas puras de colônias sugestivas e representativas (beta-hemolíticas ou não, Gram positivas, com morfologia típica, e catalase-negativas) foram submetidas à prova da bile-esculina (FIGURA 2). As amostras isoladas e identificadas presuntivamente como *S. agalactiae* foram criopreservadas em meio de congelamento (peptona 13,5g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3,6 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9g/L; NaCl 4,5 g/L e glicerina 9%), em freezer a – 20°C, para posterior identificação específica e avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.



**FIGURA 2.** Fotografia representativa da prova da bile-esculina. Ausência de hidrólise da esculina (seta) indica prova negativa, como esperado na identificação presuntiva de *Streptococcus agalactiae*.

<sup>5</sup> Acumedia Manufacturers, USA

#### **4.8 Identificação específica e detecção direta de *Streptococcus agalactiae***

A identificação específica do *Streptococcus agalactiae* baseou-se na amplificação de segmentos do DNA bacteriano. Pesquisa de segmento do gene codificador da proteína Sip de superfície, conservada em EGB e pesquisa de região do DNA codificadora da região conservada do RNA 16S pela reação em cadeia da polimerase (PCR), de acordo com a metodologia descrita por Chotár e colaboradores (2006).

O DNA genômico das amostras bacterianas isoladas e o DNA total presente nos espécimes clínicos vaginais e anorretais foram extraídos pelo método de digestão química em fenol-clorofórmio, de acordo com metodologia já estabelecida para obtenção de DNA de alto grau de pureza com pequenas modificações (DINIZ *et al.*, 2004). Brevemente, 500 µL de tampão de lise (sacarose, 25%; tris-HCl pH 8.0, 50mM; EDTA, 10mM; lisozima, 2,5mg/ml) foram adicionados às amostras, que foram incubadas em banho-maria a 37°C, por 60 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 µL de SDS 5%, e as amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram desproteinizadas em volumes iguais de fenol e clorofórmio-álcool isoamílico (29:1). Os tubos foram agitados em agitador do tipo vórtex e centrifugados, por 10 minutos, a 14000 rpm, em centrífuga de mesa, e a parte aquosa foi retirada e transferida para novos tubos, onde o DNA foi precipitado pela adição de 50µL de acetato de sódio 5M e 1,2 mL de álcool etílico absoluto gelado. As amostras foram incubadas em freezer a – 20°C, por 30 minutos, e, após este período, os tubos foram centrifugados por 30 minutos, nas mesmas condições.

O sobrenadante foi descartado e o DNA foi solubilizado em 200µL de solução de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0). Os extratos foram estocados em freezer (-20°C), para serem utilizados nos experimentos de biologia molecular.

Foram utilizados os iniciadores de seqüência específica SAGA 1 (5'-CGT TGG TAG GAG TGG AAA AT-3'), SAGA 2 (5'-CTG CTC CGA AGA GAA AGC CT-3'), SIPf (5'-TGA AAA TGC AGG GCT CCA ACC TCA-3') e SIPr (5'-GAT CTG GCA TTG CAT TCC AAG TAT-3'), em um volume final de reação de 25µL contendo 25µM de cada um dos iniciadores SAGA 1, SAGA 2, SIPf e SIPr, 2µL do DNA molde e 12,5µL de uma solução comercial pronta para o uso, contendo *Taq* DNA polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> e tampões, em uma concentração ótima para eficiente amplificação do DNA<sup>6</sup>.

Foram utilizadas as seguintes condições de amplificação, em reações independentes: desnaturação inicial - 96°C, 5min seguido de 30 ciclos de 96°C, 1min; - 55°C, 1min; - 72°C, 2min, seguindo-se extensão final de 72°C, 2min. As reações de PCR foram realizadas em duplicata, em termociclador automatizado<sup>7</sup>.

Os amplicons obtidos em cada reação foram visualizados em gel de agarose 1,5%<sup>8</sup>, em tampão TBE 1X (ácido bórico 54g/L; Tris base 27,5 g/L e EDTA 0,5 mol/L pH 8,0), após eletroforese em voltagem constante de 120 volts, por, aproximadamente, 2 horas. Os géis foram analisados em transiluminador de luz ultravioleta<sup>9</sup>, após tratamento com brometo de etídio<sup>10</sup>, e documentados utilizando

---

<sup>6</sup> PCR Master Mix<sup>®</sup>, Promega Corporation, Madison, WI, USA

<sup>7</sup> Techne<sup>®</sup> TC-412 Thermal Cycler, Southam Warwickshire, UK

<sup>8</sup> Promega Corporation

<sup>9</sup> GE Healthcare, United Kingdom

<sup>10</sup> Promega Corporation

sistema de fotodocumentação de imagens<sup>11</sup>. O tamanho dos amplicons foi estimado utilizando-se padrão DNA Ladder de 100 bp<sup>12</sup> como marcador de peso molecular.

Como controle positivo, foi utilizada a amostra de referência *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, e o controle negativo foi realizado em reações de amplificação sem o DNA molde.

#### **4.9 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos**

A determinação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas foi feita pelo método de disco-difusão, segundo recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007).

Foram utilizados discos impregnados com os diferentes agentes antimicrobianos: penicilina<sup>13</sup>, ampicilina<sup>13</sup>, clindamicina<sup>13</sup>, eritromicina<sup>13</sup>, cefazolina<sup>13</sup>, ciprofloxacina<sup>13</sup> e vancomicina<sup>13</sup>. As drogas utilizadas justificam-se por sua relevância clínico-microbiológica.

As linhagens bacterianas foram inoculadas em TSA e incubadas a 35,5°C, por 24 horas, em estufa bacteriológica. Após crescimento bacteriano, com o auxílio de uma alça de platina, foram obtidas suspensões bacterianas em salina estéril (NaCl 0,9%), com turbidez ajustada para 0.5 na escala McFarland (aproximadamente 10<sup>8</sup> células/ml). Com auxílio de um “swab” estéril, foi realizado inóculo por esgotamento na superfície de uma placa de ágar Mueller-Hinton<sup>14</sup>.

---

<sup>11</sup> GE Healthcare, United Kingdom

<sup>12</sup> Promega Corporation

<sup>13</sup> Laborclin Produtos para Laboratório, Paraná, Brasil

<sup>14</sup> HiMedia Laboratories, Mumbai, India

Após absorção do inóculo, os discos de antimicrobianos (penicilina, ampicilina, clindamicina, eritromicina, cefazolina, ciprofloxacina e vancomicina) foram colocados na superfície do ágar Mueller-Hinton, com auxílio de pinça, respeitando-se a distância mínima de 25mm entre os discos. As placas foram invertidas e incubadas a 35,5°C, por 24 horas, em estufa bacteriológica.

A leitura dos resultados foi realizada determinando-se o diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano (milímetros), e comparando-o à tabela de referência apresentada pelo manual do CLSI (2007). As linhagens foram classificadas de acordo com o diâmetro do halo de inibição do crescimento em sensíveis, resistentes e com resistência intermediária aos antimicrobianos. O controle de qualidade para os testes de susceptibilidade foi feito pela inclusão da linhagem de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, cujos padrões de susceptibilidade são conhecidos.

#### **4.10 Análise Estatística**

Neste estudo, o pacote estatístico computacional SPSS foi adotado para a entrada e armazenamento dos dados, bem como para a condução das análises estatísticas. O teste qui-quadrado de significância foi utilizado para o estudo da associação entre a colonização por estreptococos do Grupo B (EGB) e uma série de fatores (variáveis categóricas), obtidas através do formulário para coleta de dados (PAGANO & GAUVREAU, 2004).

O teste qui-quadrado de significância tem como base a comparação das frequências observadas em cada uma das categorias da tabela de contingência com

as frequências esperadas, caso não houvesse associação entre as variáveis estudadas (no presente caso, colonização por EGB e cada um dos fatores considerados). Tal teste tem como objetivo determinar se as diferenças entre as contagens observadas e esperadas são grandes o suficiente para não poderem ser consideradas como devidas apenas ao acaso.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 População amostrada

Foram incluídas nesta investigação, 221 parturientes admitidas para internação, em trabalho de parto, no Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus, situado no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, no período de outubro de 2007 a março de 2008.

A descrição das características sócio-demográficas (idade, estado civil, raça, escolaridade, ocupação, procedência) da população estudada encontra-se na TABELA 1.

Em relação às características clínico-obstétricas das parturientes participantes do estudo, a TABELA 2 mostra a idade gestacional no momento da admissão da parturiente, a paridade, o número de gestações, a realização de pré-natal e o número de consultas pré-natais. Mostra, também a presença, nesta gestação, de trabalho de parto prematuro, hipertensão arterial, diabetes, amniorrexe, febre, história de Infecção urinária e presença de infecção pelo *Streptococcus agalactiae* (EGB) em gestação anterior.

TABELA 1. Características sócio-demográficas do grupo de estudo.

| Variáveis analisadas      | Frequência no grupo amostrado<br>(n=221) | Percentual |
|---------------------------|--|------------|
| <b>Faixa etária média</b> | 24 ± 6,32                                | -          |
| <b>Estado civil</b>       |  |            |
| Solteira                  | 128                                      | 57,9       |
| Casada                    | 66                                       | 29,9       |
| Outro                     | 27                                       | 12,2       |
| <b>Raça (cor da pele)</b> |  |            |
| Branca                    | 97                                       | 43,9       |
| Negra                     | 66                                       | 29,9       |
| Parda                     | 57                                       | 25,8       |
| Amarela                   | 0  | 0          |
| <b>Escolaridade</b>       |  |            |
| Nenhuma                   | 95                                       | 43         |
| Fundamental               | 79                                       | 35,7       |
| Médio                     | 46                                       | 20,8       |
| Superior                  | 1  | 0,5        |
| <b>Ocupação</b>           |  |            |
| Do lar                    | 138                                      | 62,4       |
| Outro                     | 83                                       | 37,6       |
| <b>Procedência</b>        |  |            |
| <b>Juiz de Fora</b>       | 170                                      | 76,9       |
| Centro                    | 30                                       | 13,6       |
| Região Leste              | 36                                       | 16,3       |
| Região Nordeste           | 7  | 3,2        |
| Região Noroeste           | 54                                       | 24,4       |
| Região Oeste              | 17                                       | 7,7        |
| Região Sudeste            | 7  | 3,2        |
| Região Norte              | 7  | 3,2        |
| Região Sul                | 14                                       | 6,4        |
| <b>Outras localidades</b> | 51                                       | 23,1       |

Foram estabelecidas as relações entre a colonização pelo EGB e as variáveis do estudo, utilizando-se o teste qui-quadrado, e os resultados encontrados não foram estatisticamente significativos em relação a todos os testes realizados.

Em relação às características sócio-demográficas da população estudada, a faixa etária média das parturientes foi de 25 anos, sendo que a menor idade descrita foi de 14 anos e a maior, de 42 anos. O estado civil que prevaleceu foi o de solteira (57%) e a raça mais freqüente foi a branca (43,9%).

Ao considerarmos a variável ocupação, observamos que 62,4% das parturientes trabalhavam em serviços do lar. Quanto ao município de procedência, 76,9% residiam em Juiz de Fora e 23,1% em outras cidades, na sua maioria, da Zona da Mata Mineira. Aquelas com domicílio em Juiz de Fora procederam das oito regiões geográficas do município, a saber: centro, leste, nordeste, noroeste, norte, oeste, sudeste e sul, sendo que, 24,4% do total procederam da região noroeste da cidade.

TABELA 2. Características clínico-obstétricas do grupo em estudo.

| Variáveis analisadas                       | Frequência no grupo amostrado (n=221) | Percentual |
|--|---------------------------------------|------------|
| <b>Número de gestações</b>                 | 2,47 ± 1,89                           | -          |
| <b>Número de partos</b>                    | 1,37 ± 1,87                           | -          |
| <b>Hipertensão arterial nesta gestação</b> |                                       |            |
| Sim  | 34                                    | 15,4       |
| Não  | 187                                   | 84,6       |
| <b>Diabetes nesta gestação</b>             |                                       |            |
| Sim  | 6                                     | 2,7        |
| Não  | 215                                   | 97,3       |
| <b>Amniorrexe ≥ 18 horas</b>               |                                       |            |
| Presente                                   | 17                                    | 7,7        |
| Ausente                                    | 204                                   | 92,3       |
| <b>Febre</b>                               |                                       |            |
| Presente                                   | 6                                     | 2,7        |
| Ausente                                    | 214                                   | 96,8       |
| <b>Infecção urinária nesta gestação</b>    |                                       |            |
| <i>S.agalactiae</i>                        | 7                                     | 3,2        |
| Outros agentes etiológicos                 | 74                                    | 33,5       |
| Ausente                                    | 140                                   | 63,3       |
| <b>Infecção neonatal pelo EGB anterior</b> |                                       |            |
| Sim  | 0                                     | 0          |
| Não  | 221                                   | 100        |
| <b>Idade gestacional</b>                   |                                       |            |
| Menor que 37 semanas                       | 45                                    | 20,4       |
| Maior ou igual a 37 semanas                | 176                                   | 79,6       |
| <b>Fez Pré-natal</b>                       |                                       |            |
| Sim  | 214                                   | 96,8       |
| Não  | 7                                     | 3,2        |
| <b>Número de consultas no pré-natal</b>    |                                       |            |
| Nenhuma                                    | 7                                     | 3,2        |
| 01 a 03                                    | 13                                    | 5,9        |
| 04 a 06                                    | 68                                    | 30,8       |
| Mais de 06                                 | 133                                   | 60,2       |
| <b>Antecedente de TPP nesta gestação</b>   |                                       |            |
| Sim  | 57                                    | 25,8       |
| Não  | 164                                   | 74,2       |

Ao analisar as características clínico-obstétricas do grupo amostrado, constatou-se que 41,2% das parturientes eram primíparas e 58,8% multíparas. Foram admitidas em trabalho de parto pré-termo, isto é, com menos de 37 semanas completas de gestação, 21,4% das participantes do estudo. A presença de hipertensão arterial na gestação atual, independentemente se devido à pré-eclâmpsia e/ou hipertensão crônica, foi detectada em 15,4%, e o diabetes em apenas 2,7% da amostra. A amniorrexe por tempo maior ou igual a 18 horas, no momento da internação, foi constatada em 7,7%; a infecção urinária pelo EGB nesta gravidez foi registrada em 3,2% e a febre maior ou igual a 38° C, em 2,7%. A quase totalidade das pacientes freqüentava regularmente o pré-natal da rede pública (96,8%), e 91% já haviam comparecido a quatro ou mais consultas.

## **5.2 Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* (EGB)**

A avaliação da prevalência de colonização pelo EGB nas parturientes amostradas foi feita utilizando-se duas abordagens metodológicas. A primeira, utilizando-se a cultura, método microbiológico clássico, para o diagnóstico presuntivo, seguida da identificação específica, por biologia molecular. A segunda, através da detecção dos microrganismos diretamente nos espécimes clínicos anorretais e vaginais, por técnica molecular.

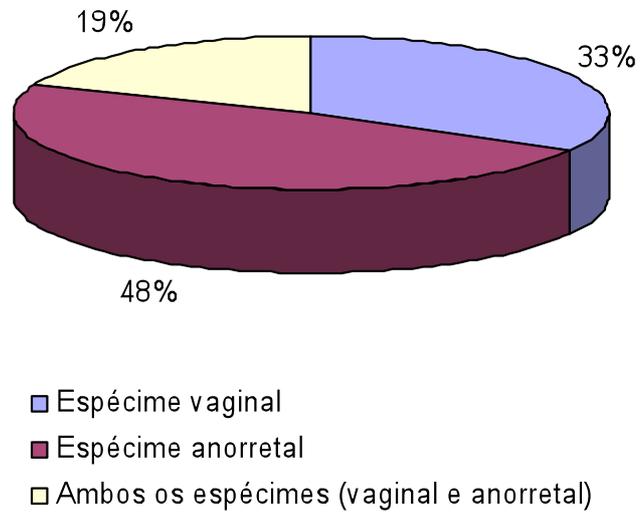
Ao considerar-se a cultura microbiológica, foram isoladas 25 amostras bacterianas identificadas como EGB, recuperadas de 21 das 221 pacientes, sendo que, 11 das amostras eram provenientes do sítio vaginal e 14 do sítio anorretal. Destas culturas positivas, os microrganismos foram detectados simultaneamente nos dois sítios (tanto vaginal, quanto anorretal) em 4 pacientes. Assim, observou-se

uma prevalência de 9,5% de colonização pelo EGB, por esta metodologia, com freqüências relativas aos sítios de colonização, como representado na FIGURA 3.

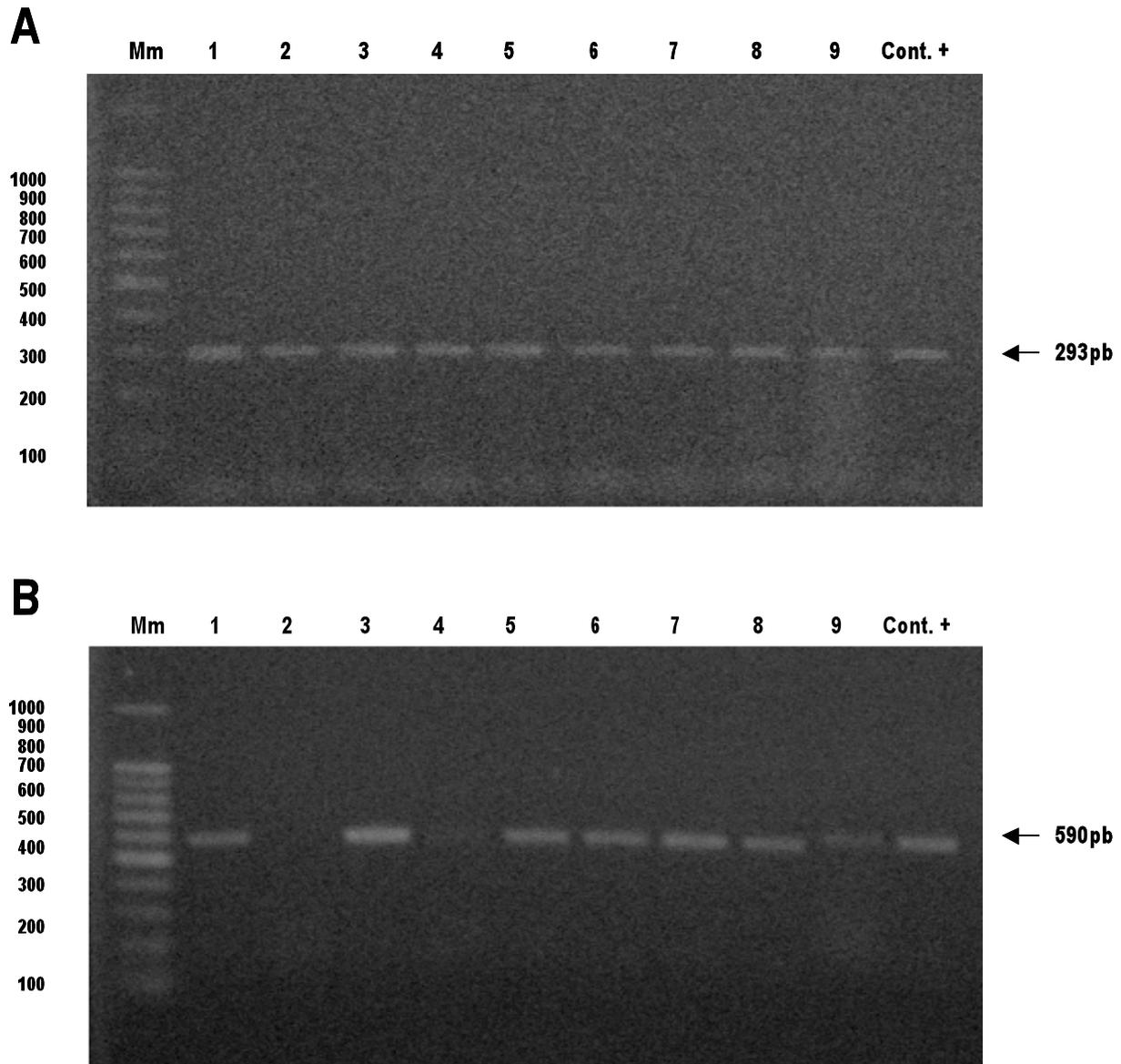
Utilizando-se a metodologia molecular, levando-se em conta a amplificação de segmentos de DNA relacionados à proteína Sip de superfície e região do DNA codificadora do segmento do RNA ribossomal 16S, o teste foi considerado positivo para aquelas amostras que amplificaram os dois segmentos, de maneira confirmatória, como sugerido na literatura e representado na FIGURA 4.

Pela metodologia molecular, *Streptococcus agalactiae* foi identificado em 96 espécimes clínicos (56 vaginais, 40 anorretais) provenientes de 72 pacientes, das 221 incluídas no estudo. Destes 96 testes positivos, 32 foram relacionados a espécimes vaginais, somente 16 relacionados a espécimes anorretais e 24 relacionados à detecção da bactéria em ambos os espécimes. Assim, observou-se uma prevalência de 32,6% de colonização pelo EGB, por esta metodologia, com freqüências relativas aos sítios de colonização, como representado na FIGURA 5.

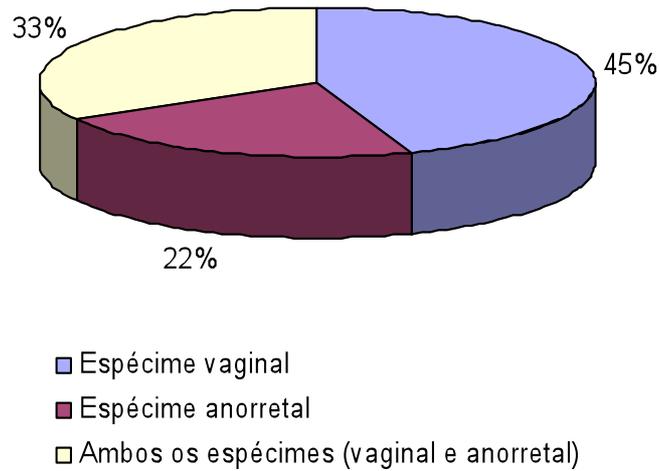
Ao se comparar as duas metodologias utilizadas, ou seja, a microbiologia clássica envolvendo isolamento e identificação bacteriana e o método molecular de detecção direta de ácidos nucléicos dos microrganismos pesquisados por PCR, foi observado que a segunda foi muito mais sensível na detecção destas bactérias, mostrando uma sensibilidade de 29,17% e 100% de especificidade. A metodologia molecular mostrou-se mais eficiente no diagnóstico de colonização por EGB nos espécimes clínicos avaliados (FIGURA 6).



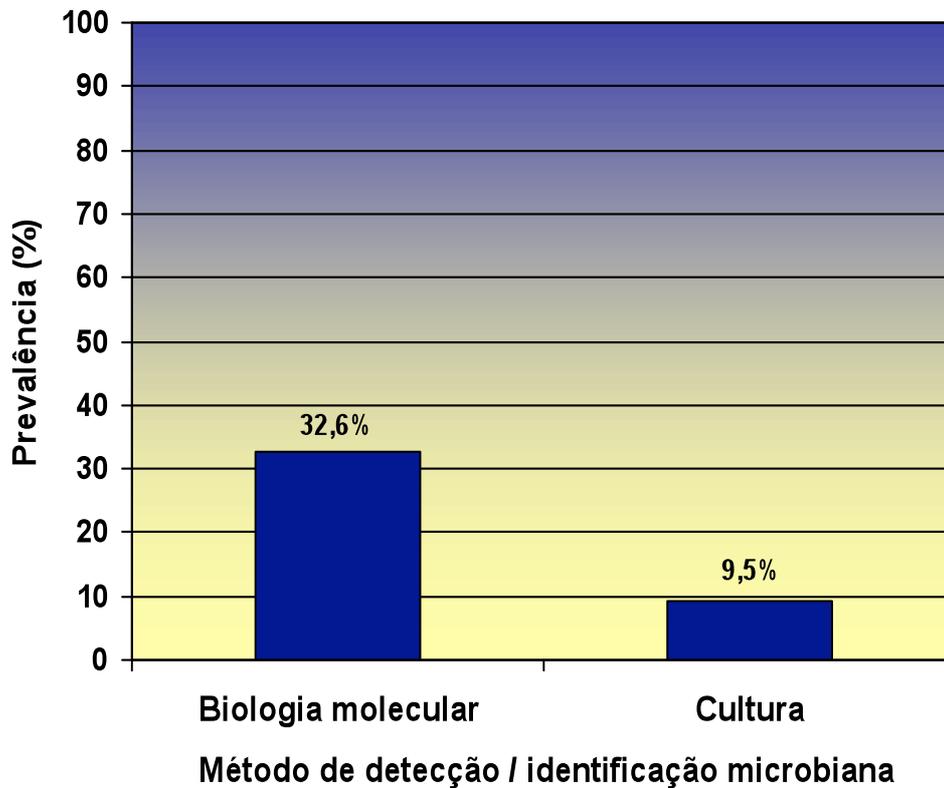
**FIGURA 3.** Representação gráfica das frequências relativas aos sítios de colonização pelo EGB considerando-se a cultura microbiológica clássica para diagnóstico presuntivo.



**FIGURA 4.** Fotografia representativa de eletroforese em gel de agarose de segmentos de DNA amplificados em reação de PCR para detecção e identificação molecular de *Streptococcus agalactiae* diretamente em espécimes clínicos vaginais e anorretais coletados por *swab* estéril inoculados em caldo de enriquecimento Todd-Hewitt e para identificação específica de amostras bacterianas identificadas, presuntivamente, como EGB, pela cultura. A – detecção da amplificação de segmento do gene codificador para proteína Sip de superfície (293pb); B – detecção da amplificação de segmento do gene codificador para o RNA ribossomal 16S bacteriano (590pb). Mm – marcador molecular - 100bp DNA ladder; Canaletas 1 a 9 – espécimes clínicos representativos provenientes das pacientes incluídas no estudo; Cont+ - controle positivo *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813.



**FIGURA 5.** Representação gráfica das frequências relativas aos sítios de colonização pelo EGB considerando-se a biologia molecular para detecção direta a partir do espécime clínico.



**FIGURA 6.** Prevalência de *Streptococcus agalactiae* observada entre as parturientes incluídas no estudo, comparando-se as duas metodologias utilizadas: detecção direta no espécime clínico por biologia molecular e recuperação em cultura microbiológica.

### 5.3 Susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens recuperadas

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi avaliado para as linhagens bacterianas identificadas como *Streptococcus agalactiae* recuperadas a partir de espécimes clínicos vaginais e anorretais. Foram testadas as drogas penicilina, ampicilina, cefazolina, ciprofloxacina, vancomicina, eritromicina e clindamicina. Os diâmetros dos halos de inibição observados, segundo a técnica utilizada, foram avaliados segundo critérios já estabelecidos (CLSI, 2007).

Como observado na FIGURA 7, os resultados indicam que todas as linhagens avaliadas foram sensíveis à ação da penicilina, ampicilina, cefazolina, ciprofloxacina, vancomicina. Entretanto, foi observada resistência bacteriana em relação às drogas eritromicina (22,7%) e clindamicina (50%).

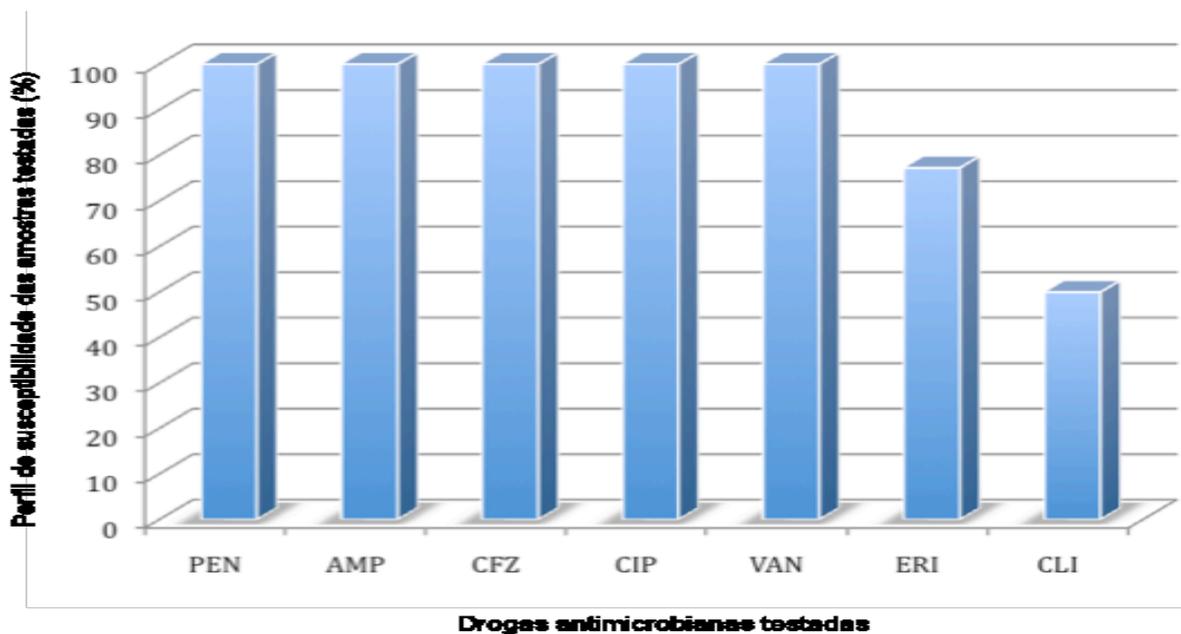


FIGURA 7. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens de *Streptococcus agalactiae* isoladas e identificadas a partir de espécimes clínicos obtidos por swabs vaginais e anorretais de parturientes atendidas no Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus, em Juiz de Fora, MG. Penicilina (PEN), ampicilina (AMP), cefazolina (CFZ), ciprofloxacina (CIP), vancomicina (VAN), eritromicina (ERI) e clindamicina (CLI).

## 6 DISCUSSÃO

*Streptococcus agalactiae* ou grupo B (EGB) faz parte da microbiota de seres humanos, colonizando, de forma assintomática, crônica e intermitente, o trato gastrointestinal e geniturinário. Sua importância médica está relacionada à contaminação vertical dos neonatos de gestantes colonizadas, o que pode resultar em infecção neonatal grave (CDC, 2002). A colonização neonatal pelo EGB resulta da transmissão vertical por via ascendente, antes do parto, por aspiração de líquido amniótico infectado, através das membranas íntegras ou não (com roturas ou microrroturas) ou, no momento do parto, por contato do microrganismo com os tecidos fetais no canal do parto colonizado ou, ainda, por aspiração de secreções vaginais pelo feto (MOYO *et al.*, 1996; CDC, 2002).

A estratégia proposta para a prevenção da transmissão vertical inclui o uso da profilaxia antimicrobiana intraparto e a investigação rotineira da colonização pelo *S. agalactiae* no final da gestação, através de cultura de material vaginal e anorretal em meio seletivo (HEATH & SCHUCHAT, 2007).

Justificou-se a realização deste estudo em pacientes usuárias do SUS, por esta população representar, em média, 60% dos nascimentos ocorridos no município, e constituir o principal foco para a elaboração das políticas de saúde governamentais. Sabe-se que, em Juiz de Fora, ocorrem cerca de 7000 nascimentos por ano, 35% das quais no Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus (PJF, 2008).

No Brasil, ainda não existem recomendações técnicas ou consenso sobre a profilaxia da doença estreptocócica perinatal, não sendo este tema sequer mencionado na última edição do Manual Técnico de Pré-natal e Puerpério – Atenção

Qualificada e Humanizada do Ministério da Saúde (FEBRASGO, 2006; BRASIL, 2006). Desta forma, optou-se pela realização do estudo em gestantes admitidas na maternidade, em trabalho de parto, independentemente da idade gestacional, no momento da internação.

Ao se aplicar os testes estatísticos relacionando a prevalência da colonização pelo EGB com as características sócio-demográficas e clínicas acima descritas, não foram detectadas diferenças significativas. Em relação aos fatores de risco clássicos da doença estreptocócica perinatal, como antecedente de recém-nascido com sepse causada pelo EGB, ocorrência de febre igual ou acima de 38°C no momento do parto, ruptura prematura das membranas por tempo maior ou igual a 18 horas e prematuridade (idade gestacional menor ou igual a 37 semanas), os resultados também não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Os achados do presente trabalho são semelhantes aos de Pellegrini (1999), Pogere e colaboradores (2005), Silveira (2006), e Fernandez e colaboradores (2006). Os dados reforçam as conclusões do CDC, que recomenda a realização de cultura vaginal e anorretal, de forma sistemática e universal, através da investigação de todas as gestantes, durante o pré-natal, no terceiro trimestre da gravidez (CDC, 2002).

A pesquisa de *S. agalactiae* foi feita através de duas abordagens metodológicas que evidenciaram uma significativa diferença nos resultados. Na primeira, utilizou-se a cultura microbiológica clássica para isolamento e identificação presuntiva da bactéria, seguida da identificação específica, por biologia molecular, obtendo-se uma prevalência de 9,5%. Na segunda, realizou-se a detecção dos microrganismos colonizados diretamente nos espécimes clínicos anorretais e vaginais, empregando-se, também, a técnica molecular. A prevalência encontrada por esta metodologia foi de 32,6%. Mesmo considerando-se a diferença nos

resultados encontrados pelos dois métodos utilizados, os dados aferidos se encontram de acordo com a faixa de prevalência encontrada na literatura mundial, que varia entre 3% e 41% (VACILOTO *et al.*, 2002; POGERE *et al.*, 2005; EISENBERG *et al.*, 2006; WINN, 2007; SAVOIA *et al.*, 2008; THIBAUDON *et al.*, 2008). Esta grande variabilidade que ocorre nos índices de prevalência de colonização pelo EGB, em todo o mundo, provavelmente, tem relação com as diferenças socioculturais, geográficas, climáticas e biológicas das diferentes populações, e também, com a metodologia empregada para o isolamento e a identificação do microrganismo.

O achado de uma prevalência de 32,6% pelo método molecular, revela quão elevado e preocupante é, este índice visto que não existem, ainda, estudos publicados no Brasil mostrando taxas tão elevadas de prevalência. Os trabalhos nacionais sobre o assunto, registram índices entre 5 e 25% (OLIVEIRA *et al.*, 1985; SMÂNIA JÚNIOR *et al.*, 1986; PELLEGRINI, 1999; BERALDO *et al.*, 2004; BORGER *et al.*, 2005; POGERE *et al.*, 2005; SILVEIRA, 2006; SIMÕES *et al.*, 2007; CAETANO, 2008).

Uma revisão sistemática da literatura realizada no México por Reyna-Figueroa e colaboradores (2007), onde foram incluídos nove estudos sobre a prevalência de EGB em gestantes, resultados de busca realizada no MEDLINE, LILACS, Artemisa e Imbiomed, revelou uma prevalência média de 9,5% naquele país.

Quanto à grande diferença dos dados encontrados com o emprego das duas metodologias, cultura e biologia molecular (9,5% e 32,6%) respectivamente, percebe-se que os estudos baseados em cultura, largamente empregados hoje na

prática clínica, podem, na verdade, sub-diagnosticar a prevalência destes microrganismos nas diferentes populações.

Ao se comparar os resultados encontrados nos dois sítios, com aqueles provenientes unicamente do sítio vaginal, observa-se um aumento de 92,3% na taxa de detecção do EGB pela metodologia da cultura e um aumento de 28,2% pela técnica molecular. Este fato reforça a recomendação do CDC, que preconiza a coleta dos espécimes nas duas regiões anatômicas (CDC, 2002). Vale salientar que, em muitos trabalhos na literatura, o sítio anal não é pesquisado, subestimando, de maneira significativa, as verdadeiras taxas de prevalência do EGB. Honest, Sharma & Khan (2006) avaliaram o emprego de testes rápidos para a detecção de EGB em gestantes durante o trabalho de parto. Dos vinte e nove trabalhos incluídos nesta revisão, somente oito consideraram os sítios anorretal e vaginal, sendo que, dezesseis deles, consideraram somente o sítio vaginal.

Comparando-se, ainda, as duas metodologias, observou-se que a técnica do PCR foi muito mais sensível na detecção do EGB que a da cultura, que mostrou uma sensibilidade de 29,17%, e especificidade de 100%, embora a literatura destaque o método cultural clássico como padrão ouro de investigação epidemiológica de prevalência de EGB (ATKINS *et al.*, 2006; HONEST, SHARMA & KHAN, 2006; GAVINO & WANG, 2007; GOODRICH & MILLER, 2007). Ainda que a identificação dos espécimes clínicos pela metodologia molecular tenha se mostrado mais eficiente na identificação do *S. agalactiae*, o seu emprego, na rotina, ainda se encontra bem distante da nossa realidade, pois, além de envolver treinamento de pessoal especializado, apresenta custo elevado de infra-estrutura e de material de consumo para sua viabilização.

Ainda considerando-se a metodologia de investigação, Silveira (2006) descreveu prevalência de 23,1% de colonização por EGB, em estudo realizado em Uruguaiana, no Rio Grande do Sul, utilizando o PCR como método para detecção/identificação bacteriana. Entretanto, neste trabalho, os iniciadores utilizados nas reações de amplificação de DNA foram diferentes dos utilizados no presente estudo. Neste trabalho (SILVEIRA, 2006) foram utilizados iniciadores que amplificam o segmento do DNA correspondente ao Gene ATR (proteína transportadora de glutamina), enquanto que, no presente estudo, utilizou-se dois iniciadores: o primeiro, que amplifica o segmento do DNA correspondente ao Gene codificador da proteína Sip e, o segundo, que amplifica o segmento do DNA correspondente à região codificadora do RNA16S (CHOTÁR, VIDOVA & GODÁNY, 2006).

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *S. agalactiae* foi realizado de acordo com os critérios preconizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007). Foram avaliados os antibióticos penicilina, ampicilina, cefazolina, ciprofloxacina, vancomicina, eritromicina e clindamicina. Do ponto de vista clínico, com exceção da ciprofloxacina (fluoroquinolona), estas drogas fazem parte do esquema da antibioticoprofilaxia intraparto proposta pelo CDC para a prevenção da transmissão vertical do EGB. Entretanto, na visão microbiológica, é importante testar a susceptibilidade a drogas antimicrobianas que atuem em alvos bacterianos diversos.

O resultado da avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos indicou que todas as linhagens avaliadas foram sensíveis à ação de penicilina, ampicilina, cefazolina, ciprofloxacina e vancomicina. O comportamento deste microrganismo frente à penicilina e à ampicilina não sofre alterações há décadas,

sendo que todas as linhagens testadas mostraram-se sensíveis a estes antimicrobianos (FRACALANZZA & BENCHETRIT, 1986; BARCAITE *et al.*, 2008).

Em relação à cefazolina, embora o manual do CLSI não especifique o ponto de corte de sensibilidade à droga, ele recomenda que toda amostra sensível à penicilina seja também considerada sensível à cefazolina. Sendo assim, não se conhece, também, até o momento, linhagens do presente trabalho de EGB resistentes à cefazolina (CDC, 2002), fato este também confirmado pelos resultados.

Contrastando com os relatos referentes à penicilina, à ampicilina e à cefazolina, os índices de resistência à eritromicina e à clindamicina vêm aumentando progressivamente a partir de 1996 (CDC, 2002). Em nosso estudo, foi observada resistência bacteriana em relação à eritromicina em 22,7% das linhagens, e resistência à clindamicina em 50% das linhagens.

Relatórios publicados pelo CDC informaram que a resistência de *S. agalactiae* em relação à eritromicina, nos Estados Unidos e Canadá, variou de 7% a 25%, e de 3% a 15%, em relação à clindamicina (CDC, 2002). Barcaite e colaboradores (2008), em uma revisão sistemática realizada entre 1996 e 2006, que incluiu 24.093 mulheres de 13 países europeus, encontraram índices de resistência à eritromicina variando de 3,8% a 21,2% e, à clindamicina, de 2,7% a 20%. Decoster e colaboradores (2005) identificaram índices de resistência de 16,7% para eritromicina e 11% para a clindamicina. Em nosso País, Borger e colaboradores (2005) encontraram resistência à eritromicina em 9,4% e à clindamicina em 6,2% das amostras de EGB isoladas. Recentemente, o trabalho de Caetano (2008), em estudo com amostragem semelhante à obtida no nosso trabalho, mostrou índice de resistência à eritromicina e à clindamicina de 2,2%, taxas estas abaixo da faixa de incidência mundial.

Em relação à resistência a eritromicina, nossos resultados se encontram de acordo com a maioria dos estudos da literatura mundial. Apesar disso, os índices foram significativamente menores do que os achados de Sahnoum e colaboradores (2007), que detectaram resistência de 38,5%.

Quanto à clindamicina, como vimos anteriormente, nossos dados estão muito acima dos índices da literatura. Este fato pode estar relacionado ao número reduzido de amostras incluídas em nosso estudo (n=25/221), ou ainda, à crescente utilização de clindamicina em nosso meio para tratamento e profilaxia de outras doenças infecciosas, como, por exemplo, sua utilização na medicina e na odontologia como droga anti-anaeróbios. É interessante observar que, de maneira semelhante ao nosso estudo, os microrganismos anaeróbios vêm adquirindo resistência a estes antimicrobianos, e a justificativa está, geralmente, relacionada ao seu uso indiscriminado (DIPERSIO & DIPERSIO, 2006; BRANCO, VOLPATO & ANDRADE, 2007).

A vancomicina, embora tenha seu uso clínico restrito por não ser droga de primeira escolha na profilaxia da doença estreptocócica perinatal, vem apresentando índices progressivos de resistência em algumas amostras de bactérias Gram positivas, como os enterococos e o *Staphylococcus aureus* (CDC, 2002). Apesar disso, até hoje, em todo o mundo, não foram identificadas linhagens de EGB resistentes à vancomicina (CDC, 2002; DECOSTER, 2005; BORGER, 2005; BARCAITE, 2008; PERSSON *et al.*, 2008).

Em relação à ciprofloxacina, o presente estudo não evidenciou resistência bacteriana a esta droga. Contrastando com nossos achados, alguns trabalhos encontraram linhagens de EGB resistentes a fluoroquinolonas, tais como

norfloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin and gatifloxacin, among others (WEHBEH *et al.*, 2005; BORCHARDT *et al.*, 2006; MIRÓ *et al.*, 2007).

Assim, considerando-se os resultados obtidos nesse estudo relacionados às altas taxas de colonização pelo EGB e seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, ressaltamos a responsabilidade médica e civil que envolve, sobretudo, o obstetra pré-natalista, por se tratar de uma doença passível de prevenção. Considerando-se, ainda, os elevados gastos públicos e as graves conseqüências físicas e psicológicas da doença estreptocócica perinatal, contrapondo-se à eficiência e ao baixo custo dos métodos de rastreio no pré-natal, esperamos que este trabalho possa contribuir no sentido da elaboração de estratégias de saúde pública que, efetivamente, interfiram na prevenção e no tratamento dessa importante doença perinatal.

## 7 CONCLUSÃO

1. *Streptococcus agalactiae* é um microrganismo prevalente entre as parturientes usuárias do SUS, atendidas em uma maternidade no município de Juiz de Fora, MG;
2. A metodologia molecular apresenta maior acurácia que a cultura microbiológica na detecção de *Streptococcus agalactiae* em espécimes clínicos provenientes de swabs vaginais e/ou anorretais de parturientes.
3. A detecção e a identificação de *Streptococcus agalactiae* por metodologia clássica de cultura microbiológica (padrão ouro) pode subestimar a real prevalência destes microrganismos em diferentes populações.
4. Não há relações entre características sócio-demográficas e clínico-obstétricas com a colonização por *Streptococcus agalactiae*, na população amostrada.
5. Resistência bacteriana a antimicrobianos, como eritromicina e clindamicina, ocorre em níveis alarmantes entre linhagens de *Streptococcus agalactiae* representativas daquelas circulantes na macrorregião de Juiz de Fora, MG.

6. Beta-lactâmicos e glicopeptídios (como a vancomicina) figuram como opção terapêutica para controle de *Streptococcus agalactiae*, circulantes na macrorregião de Juiz de Fora, MG.

7. Embora fluoroquinolonas não figurem como opção na antibioticoprofilaxia intraparto para prevenção da doença estreptocócica neonatal, linhagens de *Streptococcus agalactiae* representativas daquelas circulantes na macrorregião de Juiz de Fora, MG são sensíveis à sua ação antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS-CHAPMAN, I; STOLL, B. J. Neonatal infection and long-term neurodevelopmental outcome in the preterm infant. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v.19, n.3, p.290-297, 2006.
- AFROZA, S. Neonatal sepsis – a global problem: an overview. **Mymensingh Medical Journal**, Dhaka, v. 15, n.1, p.108-114, 2006.
- ALVES, V. M. N. **Prevalência e fatores associados à colonização retal e vaginal pelo Estreptococo do Grupo B em parturientes e suas características fenotípicas**. Campinas, 2005. [Dissertação – Mestrado – Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP].
- ANDERSON-BERRY, A. L.; BELLIG, L. L.; OHNING, B. L. **Neonatal Sepsis**. University of Nebraska Medical Center, Omaha, 2006. Disponível em: <<http://www.emedicine.com/ped/topic2630.htm>>. Acesso em: 14 fev. 2008.
- ASM. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. **Antimicrobial Resistance an Ecological Perspective**. Report from the American Academy of Microbiology, Washington, D.C., 2000.
- ATKINS, K. L.; MD, ATKINSON, R. M.; SHANKS, A.; PARVIN A.C.; DUNNE, M.; GROSS, G. Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Group B Streptococcus Detection Using an Improved Culture Method. **Obstetrics & Gynecology**, New York, v.108, n.3, p.488-491, 2006.
- BALTIMORE, R. S. Consequences of Prophylaxis for Group B Streptococcal Infections of the Neonate. **Seminars in Perinatology**, New York, v.31, n.1, p.33-38, 2007.
- BARCAITE, E.; BARTUSEVICIUS, A.; TAMELIENE, R.; KLIUCINSKAS, M.; MALECKIENE, L.; NADISAUSKIENE R. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, Oxford, v.87, n.3, p. 260-271, 2008.
- 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. **Revista Brasileira de Ginecologia & Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.26, n.7, p.543-549, 2004.
- BOHNEN, J.M.A. Antibiotic therapy for abdominal infection. **World Journal of Surgery**, New York, v.22, p.152-157, 1998.

BORCHARDT, S. M.; DEBUSSCHER, J. H.; TALLMAN, P. A.; MANNING, S. D.; MARRS, C. F.; KURZYNSKI, T. A.; FOXMAN, B. Frequency of antimicrobial resistance among invasive and colonizing Group B streptococcal isolates. **BMC Infectious Diseases**, London, v.57, n.6, 2006.

BORGER, I. L.; D'OLIVEIRA, R. E. C.; CASTRO, A. C. D.; MONDINO, S. S. B. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ginecologia & Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.27, n.10, p.575-9, 2005.

BRANCO, F. P.; VOLPATO, M. C. & ANDRADE, E. D. Profilaxia da endocardite bacteriana na clínica odontológica – o que mudou nos últimos anos? **Revista Periodontia**, São Paulo, v.17, n.3, p.23-29, 2007.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Pediatria: Prevenção e Controle de Infecção Hospitalar**. 1ª. Ed. Brasília: Editora Anvisa, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Atenção Básica. Saúde da Família. **Histórico de cobertura da Saúde da Família**. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/dab/abnumeros.php>>. Acesso em: 12 fev. 2008.

CAETANO, M. S. S. G. **Colonização pelo *Streptococcus agalactiae* (EGB) em gestantes atendidas na rede pública de Uberaba**. Uberaba, 2008. [Dissertação – Mestrado – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, MG].

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: A Public Health Perspective. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.45, n.RR-7, p.01-24, 1996.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. - Revised Guidelines from CDC. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.51, n. RR-11, p.01-22, 2002.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Early-Onset and Late-Onset Neonatal Group B Streptococcal Disease - United States, 1996--2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.54, n.47, p.1205-1208, 2005.

CHOTÁR, M; VIDOVÁ, B; GODÁNY, A, Development of Specific and Rapid Detection of Bacterial Pathogens in Dairy Products by PCR. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 51, n. 6, p.639-646, 2006.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. **CLSI document M100-S17 [ISBN 1-56238-625-5]**. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.

DECOSTER, L.; FRANS, J.; BLANKAERT, H.; LAGROU, K.; VERHAEGEN, J. Antimicrobial susceptibility of group B streptococci collected in two Belgian hospitals. **Acta Clinica Belgica**, Bruxelles, v.60, n.4, p.180-184, 2005.

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. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.54, n.1, p.100-108, 2004.

DIPERSIO, L. P & JOSEPH R. DIPERSIO, J. R. High rates of erythromycin and clindamycin resistance among OBGYN isolates of group B *Streptococcus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v.54, n.1, p. 79-82, 2006.

DUARTE, R. S.; BELLEI, B. C.; MIRANDA, O. P.; BRITO, M. A.; TEIXEIRA, L. M. Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Genes among Brazilian Group B Streptococci Recovered from Bovine and Human Sources. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Birmingham, v. 49, n.1, p.97-103, 2005.

EISENBERG, V. H.; RAVEH, D.; MEISLISH, Y.; RUDENSKY, B.; EZRA, Y.; SAMUELOFF, A.; EIDELMAN, A. I.; SCHIMMEL, M. S. Prevention of Early-Onset Neonatal Group B Streptococcal Infection: is Universal Screening by Culture Universally Applicable? **Israel Medical Association Journal**, Tel Aviv, v.8, n.10, p.698-702, 2006.

EL BEITUNE, P.; DUARTE, G.; MAFFEI, C. M. L. Colonization by *Streptococcus agalactiae* During Pregnancy: Maternal and Perinatal Prognosis. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, Salvador, v.9, n.3, p.276-282, 2005.]

FACKLAM, R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.15, n.4, p.613-630, 2002.

FEBRASGO; AMB; CFM. **Projeto Diretrizes, vol. V. 2ª Ed.** São Paulo: Editora Projeto Diretrizes, 2006.

FERNÁNDEZ, J.; SÁNCHEZ, J. ; FERIS, J. M.; GÓMEZ, E.; SERULLE, Y.; DEMORIZI, J.; RIVERA, L.; 1; RIVERA-ALMODÓVAR, E.; MERCEDES, H.; PÉREZ-THEN, E. Prevalencia de estreptococo grupo B (EGB) en embarazadas dominicanas. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v.8, n.1, p.26-32, 2006.

FRACALANZZA, S.E.L.; BENCHETRIT, J.R.L.C. Susceptibilidade de estreptococos do grupo B isolados no período perinatal aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v.43, p. 221-224, 1986.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. Taxonomic Outline of the Prokariotes. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. USA: Springer, 2003.

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. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, New York, v.197, n.4, p.388.e1-388.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. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v.59, n.1, p.17-22, 2007.

GRAY, J. W. Surveillance of infection in neonatal intensive care units. **Early Human Development**, Amsterdam, v.83, n.3, p. 157-163, 2007.

HARDIE, J. M; WHILEY, R. A. Classification and overview of genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.83, n.01s, p.01s-11s, 1997.

HEATH, P.T; SCHUCHAT, A. Perinatal group B streptococcal disease. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, London, v.21, n.3, p. 411-424, 2007.

HONEST, H.; SHARMA, S.; KHAN, K. S. Rapid Tests for Group B *Streptococcus* Colonization in Laboring Women: A Systematic Review. **Pediatrics**, Illinois, n.117, p.1055-1066, 2006.

JIANG, J.H.; CHIU, N.C.; HUANG, F.Y.; KAO, H.A.; HSU, C.H.; HUNG, H.Y.; CHANG, J.H.; PENG, C.C. Neonatal sepsis in the neonatal intensive care unit: characteristics of early versus late onset. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Hong Kong, v.37, n.5, p.301-306, 2004.

JOHRI, A.K.; PAOLETTI, L. C.; GLASER, P.; DUA, M.; SHARMA, P. K.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.4, n.12, p. 932-942, 2006.

KAUFMAN, D; FAIRCHILD, K.D. Clinical Microbiology of Bacterial and Fungal Sepsis in Very-Low-Birth-Weight Infants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.17, n.3, p.638-80, jul. 2004.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHERECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KONG, F.; MA, L.; GILBERT, G. L. Simultaneous detection and serotype identification of *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 54, n.12, p.1133-1138, 2005.

LANCEFIELD, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.57, n.4, p.571-595, 1933.

LANCEFIELD, R. C. A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (Group B). **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.59, n.4, p.441-458, 1934.

LAURENTI, R; BUCHALLA, C.M. Maternal and child health indicators: implications of the tenth revision of the International Classification of Diseases. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 2, n.1, p. 13-17, 1997.

LEVY, S.B. The Challenge of Antibiotic Resistance. **Scientific American**, New York, v.278, n.3, p.46-53, 1998.

MIRÓ, E.; REBOLLO, M.; RIVERA, A.; ÁLVAREZ, M. T.; NAVARRO, F.; MIRELIS, B.; COLL, P. *Streptococcus agalactiae* altamente resistente a fluoroquinolonas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v.24, n.9, p.562-563, 2007.

MIURA, E; MARTIN, M. C. Group B streptococcal neonatal infections in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v.43, n.5, p. 243-246, 2001.

MOYO, S.R.; HÄGERSTRAND, I.; NYSTRÖM, L. TSWANA, S. A.; BLOMBERG, J. BERGSTRÖM, S.; LJUNGH, A. Stillbirth and intrauterine infection, histological chorioamnionitis and microbiological findings. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, Baltimore, v. 54. n.2, p.115-123, 1996.

OLIVEIRA, A. I. F.; JÁCOMO, A. J. D.; CORREA FILHO, L.; SILVA, J. R.; CORDEIRO, D.; NEIOMAR, N. C.; TAVARES, H.P. Colonização em gestantes por estreptococo do grupo B. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.58, n.6, p.381-382, 1985.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de Bioestatística**. 1ª ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2004.

PELLEGRINI, R. Frequência de colonização por *Streptococcus agalactiae* em gestantes da cidade de Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.32, n.4, p.451-452, 1999.

PERSSON, E.; BERG, S.; BERGSENG, H.; BERGH K, VALSÖ-LYNG, R.; TROLLFORS, B. Antimicrobial susceptibility of invasive group B streptococcal isolates from south-west Sweden 1988-2001. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Estocolmo, v.40, n.4, p. 308-313, 2008.

PETTERSSON, K. Perinatal infection with Group B streptococci. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, Amsterdam, v.12, n.3, p.193-197, 2007.

PJF. Prefeitura Municipal de Juiz de Fora. Secretaria, saneamento e Desenvolvimento Ambiental. Indicadores epidemiológicos. Nascidos vivos de acordo com o estabelecimento de ocorrência. Disponível em: <<http://www.sssda.pjf.mg.gov.br>>. Acesso em: 26 set. 2008.

POGERE, A.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; FREITAS, P. F.; D'ACAMPORA, A. J.; ZUNINO, J. N. Prevalência da colonização pelo estreptococo do grupo B em gestantes atendidas em ambulatório de pré-natal. **Revista Brasileira de Ginecologia & Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.27, n.4, p.174-180, 2005.

REYNA-FIGUEROA, J.; ORTIZ-IBARRA, F.J.; ESTEVES-JARAMILLO, A.; CASANOVA-ROMAN, G. Maternal B group *Streptococcus* colonization in Mexico: prevalence based on literature review. **Ginecología y Obstetricia de México**, México, v.75, n.7, p.399-403, 2007.

SAHNOUN, O.; BEN ABDALLAH, H.; NOOMEN, S.; BEN ELHADJ KHELIFA, A.; MASTOURI, M. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* strains in Monastir. **Médecine et Maladies Infectieuses**, Paris, v.37, n.11, p.734-737, 2007.

SAVOIA, D.; GOTTIMER, C.; CROCILLA, C.; ZUCCA, M. *Streptococcus agalactiae* in pregnant women: Phenotypic and genotypic characters. **Journal of Infection**, London, v.2, n.56, p.120-5, 2008.

SCHOENING, T. E.; WAGNER, J.; ARVAND, M. Prevalence of erythromycin and clindamycin resistance among *Streptococcus agalactiae* isolates in Germany. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 11, n.7, p.579-582, 2005.

SCHUCHAT, A.; ZYWICKI, S. S.; DINSMOOR, M. J.; MERCER, B.; ROMAGUERA, J.; O'SULLIVAN, M. J.; PATEL, D.; PETERS, M. T.; STOLL, B.; LEVINE, O. S. Risk Factors and Opportunities for Prevention of Early-onset Neonatal Sepsis: A Multicenter Case-Control Study. **Pediatrics**, Evanston, v.105, n.1, p. 21-26, 2000.

SHARE, L.; CHAIKIN, S.; POMERANETS, S.; KIWI, R.; JACOBS, M.; FANAROFF, A. A. Implementation of Guidelines for Preventing Early Onset Group B Streptococcal Infection. **Seminars in Perinatology**, New York, v.25, n.2, p.107-113, 2001.

SILVA, L. J.; RICHTMANN, R. Vaccines under development: group B *Streptococcus*, herpes-zoster, HIV, malaria and dengue. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 82, n.3, suppl. p.115-124, 2006.

SILVEIRA, J.L.S. **Prevalência do *Streptococcus agalactiae* em gestantes detectada pela técnica de reação de cadeia da polimerase (PCR)**. Porto Alegre, 2006. [Dissertação – Mestrado - Faculdade de Medicina PUCRS].

SIMOES, J.A.; ALVES, V. M. N.; FRACALANZZA, E. L.; CAMARGO, R. P. S.; MATHIAS, L.; MILANEZ, H. M. B. P.; BROLAZO, E. M. Phenotypical characteristics of group B *Streptococcus* in parturients. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 2, p.261-266, 2007.

SMÂNIA JÚNIOR, A.; BENCHETRIT, L. C.; SMÂNIA, E. F. A.; FRACALANZZA, S. E. L. Isolamento de estreptococos do grupo B, de gestantes e neonatos, em Florianópolis, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v.18, n.4, p.103-108, 1986.

THIBAUDON, B. C.; STROEBEL, N. A.; BOULARD, M. I.; DJAVADZADEH-AMINI, M.; KACET, N.; TRUFFERT, P.; SUBTIL, D.; DUBOS, J.P. Prevention of early-onset group B streptococcus neonatal diseases. The 2005 experience of the Lille University Health Center. **Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction**, Paris, v.37, n.4, p.392-399, 2008.

VACILOTO, E.; RICHTMANN, R.; COSTA, H. P. F.; KUSANO, E. J. U.; ALMEIDA, M. F. B.; AMRO, E. R. A Survey of the Incidence of Neonatal Sepsis by Group B *Streptococcus* During a Decade in a Brazilian Maternity Hospital. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, Salvador, v. 6, n.2, p. 55-62, 2002.

VERGNANO, S.; SHARLAND, L.; KAZEMBE, P.; MWANSAMBO, C.; HEALTH, P. T. Neonatal sepsis: an international perspective. **Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition**, London, v. 90, p.220-224, 2005.

WEHBEH, W.; ROJAS-DIAZ, R.; LI, X.; MARIANO, N.; GRENNER, L.; SEGAL-MAURER, S.; TOMMASULO, B.; DRLICA, K.; URBAN, C.; RAHAL, J.J. Fluoroquinolone-Resistant *Streptococcus agalactiae*: Epidemiology and Mechanism of Resistance **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Birmingham, v.49, p. 2495-2497, 2005.

WINN, H. N. Group B Streptococcus in pregnancy. **Clinics in Perinatology**, New York, v.34, p. 387-392, 2007.

# ANEXOS

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)