
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUCRS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
MESTRADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**COLONIZAÇÃO DE GESTANTES PELO
ESTREPTOCOCO DO GRUPO B:
PREVALÊNCIA, FATORES ASSOCIADOS
E CEPAS VIRULENTAS**

RUI LARA DE CARVALHO

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina da PUCRS para
obtenção de título de Mestre em Saúde da
Criança

Orientador: Prof. Dr. Renato Machado Fiori
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre, 2009

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

C331c Carvalho, Rui Lara de

Colonização de gestantes pelo estreptococo do grupo B: prevalência, fatores associados e cepas virulentas / Rui Lara de Carvalho. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

xi; 48p.: il. tab. Inclui um artigo científico submetido para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Renato Machado Fiori.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Cantarelli Machado.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina. Mestrado em Pediatria e Saúde da Criança. Área de concentração: Infecções neonatais.

1. STREPTOCOCCUS AGALACTIAE. 2. INFECÇÕES ESTREPTOCÓCICAS/epidemiologia. 3. GRAVIDEZ. 4. SEPSE/prevenção & controle. 5. MORTALIDADE NEONATAL PRECOCE. 6. FATORES DE VIRULÊNCIA. 7. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I.Fiori, Renato Machado. II. Machado, Denise Cantarelli. III. Título.

C.D.D. 618.9292

C.D.U. 616.981.21:618.3 (043.3)

N.L.M. WC 210

Rosária Maria Lúcia Prena Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

AGRADECIMENTOS

À Flávia, minha companheira de todas as horas e aos meus filhos André e Eduardo, que são as três pessoas que mais amo.

Ao grande mestre da neonatologia brasileira Dr. Renato Machado Fiori, meu orientador e grande incentivador, que com a sua sabedoria me ajudou muito a atingir o objetivo a que me propus.

Ao grande amigo e colega Dr. João Alfredo Pifero Steibel, que me ajudou em muitos momentos de dificuldade, me incentivando e puxando para cima com sua palavra afetuosa.

À Dra. Denise Cantarelli Machado pela competente ajuda na sua área da biologia molecular me fazendo transitar por uma área com a qual não estamos muito habituados.

À microbiologista Silvana Superti que desde que começou a trabalhar no HSL/PUCRS estabelecemos uma parceria, sem a qual não poderia desenvolver a pesquisa sobre o estreptococo do grupo B.

Às secretárias Carla e Ana pelo auxílio competente que me deram ao longo dos dois anos da pós-graduação.

Aos médicos residentes do Serviço de Obstetrícia que me ajudaram na coleta das amostras.

Às acadêmicas Fabiane e Ana pela inestimável ajuda que me deram comparecendo diariamente no Centro Obstétrico para coletar as amostras.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELA.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	2
---	---

CAPÍTULO II

2 ARTIGO DE REVISÃO	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
REVISÃO DA LITERATURA.....	10
CONCLUSÕES.....	19
REFERÊNCIAS	21

CAPÍTULO III

3 ARTIGO ORIGINAL.....	26
RESUMO	27

ABSTRACT.....	29
INTRODUÇÃO	30
METODOS.....	34
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	46

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO III

- Figura 1** – Índice de colonização pelo EGB de acordo com a Idade gestacional 39
- Figura 2** – Produto da PCR para o gene gbs2018-ST17 de estreptococo agalactiae em gel de agarose a 2%. 100pb: marcador de peso molecular; Mix: controle negativo da reação sem DNA..... 40
-

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Comparação dos grupos positivo e negativo para a presença de Estreptococo do grupo B (EGB).....	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACOG	Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas
AAP	Academia Americana de Pediatria
CAMP	Christie, Atkins, Munch-Petersen
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CO₂	dióxido de carbono
EGB	Estreptococo do grupo B
HSL	Hospital São Lucas da PUCRS
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase <i>Plymerase Chain Reaction</i>
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
OR	<i>Odds Ratio</i>
RN	Recém nascido

RESUMO

Introdução: O estreptococo do grupo B (EGB) tem sido motivo de preocupação para obstetras e neonatologistas pela possibilidade de sepse neonatal, que apresenta um risco importante de mortalidade. O rastreamento do EGB entre 35-37 semanas associado com a profilaxia intra-parto com penicilina cristalina tem propiciado uma diminuição de sepse neonatal precoce por EGB.

O índice de colonização por EGB é muito variável de acordo com região e condição social das gestantes. A frequência de clones virulentos é desconhecida em nosso meio.

Objetivos:

1 - Determinar a prevalência de EGB no trato genital-anal em gestantes que internam no Centro Obstétrico de um Hospital Universitário na Cidade de Porto Alegre, verificando também os fatores associados a esta colonização.

2- Verificar a presença de cepas invasivas do EGB nos casos positivos

Métodos: O estudo envolveu 319 gestantes, com idade gestacional que variou entre 24 e 41 semanas, que internaram na Maternidade do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Nestas pacientes foi feito um swab vaginal-anal e semeado em meio de cultura Todd-Hewitt.

As amostras positivas para EGB foram enviadas para realização de reação em cadeia da polimerase (PCR) para extração do DNA e tipagem de cepas altamente virulentas do EGB.

Resultados: A prevalência de EGB encontrada foi de 23,4% (IC 95%: 17,8-27,2). Em relação aos possíveis fatores associados a colonização a variável idade mostrou uma tendência de maior colonização em pacientes com mais de 30 anos, quando comparada com idades mais jovens. Isso também aconteceu em relação a comparação com a cor da paciente onde apareceu uma tendência de maior colonização em pacientes de cor preta ou mista. As pacientes com idade gestacional abaixo de 35 semanas apresentaram um índice de colonização inferior às gestantes entre 35-37 semanas e também entre 37-39 semanas.

A presença de ruptura prematura das membranas ovulares não apareceu como fator associado a índice maior de colonização pelo EGB.

Em relação a frequência de cepas virulentas a análise de 60 casos revelou 10 casos positivos (16,6%) para clone “sequence typing” – 17 (ST-17).

Conclusões: A prevalência de EGB encontrado em nosso estudo é similar aos índices de países desenvolvidos, que realizam o rastreamento rotineiro no pré-natal e fazem a intervenção com profilaxia intra-parto nos casos positivos.

Houve um maior índice de colonização em gestações à termo comparadas com gestações de pré-termo. A frequência de cepas “altamente virulentas” encontrada foi 16,6%.

Palavras-chave: Estreptococo agalactiae, sepsse neonatal precoce, cepas invasivas de estreptococo B.

ABSTRACT

Background: Group B Streptococcus (GBS) has been of concern to obstetrician and neonatologists to the possibility of neonatal sepsis, which presents a significant risk of mortality. Screening for GBS between 35-37 weeks associated with intrapartum prophylaxis with crystalline penicillin has resulted in reduction of neonatal sepsis by GBS. The rate of GBS colonization varies widely according to region and social status of women. The frequency of virulent clones is unknown in our country.

Objectives:

1. To determine the prevalence of GBS in the genital-anal tract of pregnant patients that are hospitalized at the obstetric center of a University Hospital of Porto Alegre, also check the factors associated with this colonization.
2. Verify the presence of invasive strains of GBS positive cases

Methods: The study involved 319 pregnant women with gestational ages ranging from 24 and 41 weeks, who were hospitalized at the São Lucas Hospital of Catholic University of Rio Grande do Sul. These patients were done a vaginal-anal swab and seeded on culture medium Todd-Hewitt. Samples positive for GBS were sent to carry out polymerase chain reaction (PCR) for DNA extraction and typing of highly virulent strains of GBS.

Results: GBS prevalence found was 23.4% (CI 95%: 17.8-27.2). Regarding the possible factors associated with colonization of the age variable showed a trend of increased colonization in patients over 30 years compared with younger ages. This also happened for comparison with the color of the patient where it appeared a trend of increased colonization in patients of gestational age below 35 weeks among pregnant women at 35-37 weeks and between 37-39 weeks. The presence of premature rupture of ovular membranes did not appear as a factor associated with higher rate of GBS colonization.

Regarding the frequency of virulent strains analysis of 60 cases revealed 10 positive cases (16.6%) to clone sequence typing -17 (ST-17).

Conclusions: GBS prevalence found in our study is similar to rates in developed countries, carrying out routine screening during prenatal care and make an intervention with intrapartum prophylaxis in positive cases.

There was a higher rate of colonization in term pregnancies compared with preterm. The frequency of strains "highly virulent" found was 16.6%.

Key-words: Streptococcus agalactiae, early neonatal sepsis, invasive strains of GBS.

CAPITULO I

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

A doença neonatal causada pelo estreptococo do grupo B (EGB), continua sendo motivo de preocupação para obstetras e neonatologistas pela alta mortalidade e pela possibilidade de seqüelas nas crianças acometidas por esta enfermidade. Ela pode se manifestar através de sepse, pneumonia e/ou meningite.

No Capítulo II iremos apresentar um artigo de revisão sob o título “PREVENÇÃO DA SEPSE NEONATAL PELO ESTREPTOCOCO DO GRUPO “B””, que tem como principal objetivo revisar a literatura sobre a profilaxia intra-parto da sepse neonatal causada pelo Estreptococo do Grupo B (EGB), discutir a conduta de rastrear este patógeno no pré-natal e os benefícios da profilaxia.

No Capítulo III descrevemos o artigo original sob o título “COLONIZAÇÃO DE GESTANTES PELO ESTREPTOCOCO DO GRUPO B: PREVALÊNCIA, FATORES ASSOCIADOS E CEPAS VIRULENTAS, que tem como objetivos: determinar a prevalência de EGB no trato genital-anal em gestantes que internam no Centro Obstétrico de um Hospital Universitário na

cidade de Porto Alegre, verificando também os fatores associados a esta colonização e verificar a presença de cepas invasivas do EGB nos casos positivos.

CAPITULO II

2 ARTIGO DE REVISÃO

PREVENÇÃO DA SEPSE NEONATAL PELO ESTREPTOCOCO
DO GRUPO “B”

PREVENTION OF NEONATAL SEPSIS BY GROUP B ESTREPTOCOCCI

RUI LARA DE CARVALHO¹
SILVANA SUPERTI²
DENISE CANTARELLI MACHADO³
RENATO MACHADO FIORI⁴

Correspondência:

Rua Prof.Langendonck 57/207 – Bairro Petrópolis

Porto Alegre/RS –Brasil.

E-mail: ruilara@hotmail.com

¹ Professor do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da PUCRS

² Microbiologista. Coordenadora do Laboratório de Microbiologia do Hospital São Lucas da PUCRS

³ Professora do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da PUCRS

⁴ Professor Titular do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da PUCRS

RESUMO

Objetivos: Revisar a literatura sobre a profilaxia intra-parto da sepse neonatal causada pelo Estreptococo do Grupo B (EGB), discutir a conduta de rastrear este patógeno no pré-natal e os benefícios da profilaxia.

Fonte de dados: Os artigos utilizados nesta revisão foram buscados nas bases de dados Scielo e PUBMED, sendo as publicações na língua inglesa ou português.

Síntese dos dados: As publicações sugerem fortemente que a profilaxia intra-parto para a sepse neonatal precoce diminui o número de crianças afetadas por esta enfermidade. O rastreamento do EGB no pré-natal entre 35-37 semanas é a recomendação atual.

Conclusões: O rastreamento universal das gestantes entre 35-37 semanas e a prática de profilaxia intra-parto para aquelas colonizadas pelo EGB tem propiciado uma redução dos casos de sepse neonatal precoce.

Palavras Chave: Sepse, estreptococo do grupo B, profilaxia antibiótica

ABSTRACT

Objectives: To review the literature on intrapartum prophylaxis of neonatal sepsis caused by Group B Streptococcus (GBS), discuss the conduct of screening this pathogen in the pregnancy and the benefits of prophylaxis.

Data Sources: Articles used in this review were searched in databases Scielo, PUBMED, and the publications in English or Portuguese.

Data Synthesis: The publications strongly suggest that prophylaxis at delivery to neonatal sepsis decreases the number of children affected by this disease. The screening of GBS during prenatal care between 35-37 weeks is the current recommendation.

Conclusions: The universal screening of pregnant women between 35-37 weeks and the practice of intrapartum prophylaxis for those colonized by GBS has resulted in reduction cases of neonatal sepsis.

Key Words: sepsis, Group B Streptococcus, antibiotic prophylaxis

INTRODUÇÃO

A doença neonatal causada pelo estreptococo do grupo B (EGB), continua sendo motivo de preocupação para obstetras e neonatologistas pela alta mortalidade e pela possibilidade de seqüelas nas crianças acometidas por

esta enfermidade. Ela pode se manifestar através de sepse, pneumonia e/ou meningite.

A partir da década de 90 com a emissão de *guidelines* do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) de Atlanta, juntamente com o Colégio de Obstetras e Ginecologistas (ACOG) e a Academia Americana de Pediatria (AAP), que passaram a recomendar o rastreamento do EGB no pré-natal e a profilaxia com antimicrobianos durante o parto, houve uma redução significativa na incidência de sepse neonatal precoce.^{1,2} Sobre a forma tardia da doença não houve melhora nos resultados com esta intervenção.

A sepse neonatal é considerada precoce quanto ocorre até o sexto dia de vida e tardia quando acomete crianças do sétimo ao nonagésimo dia.

A utilização da profilaxia antibiótica intra-parto para prevenir a sepse neonatal produzida pelo estreptococo do grupo B, também chamado de *streptococcus agalactiae*, têm mostrado uma redução de 70% na doença neonatal causada por este agente infeccioso nos EUA[3]. Em 1996 o CDC, junto com o ACOG e a AAP, recomendaram duas estratégias de prevenção da infecção neonatal causada pelo EGB. Através do rastreamento feito durante a gestação entre 35-37 semanas, ou para as gestantes que não tivessem feito o rastreamento, a utilização do critério risco no momento do parto, para a administração de profilaxia antibiótica.⁴ Os fatores de risco considerados foram gestações com menos de 37 semanas de gestação, presença de ruptura prematura de membranas ovulares com mais de 18 horas e temperatura igual

ou maior do que 38°C. A presença de bacteriúria por EGB na gestação atual e história de filho com sepse neonatal causada pelo EGB também foram considerados fatores para indicação da profilaxia intra-parto com penicilina G. Com estas medidas houve uma redução da sepse neonatal de 1,7/1000 para 0,5/1000 nascidos vivos.²

O objetivo desta revisão foi avaliar a literatura em relação à prevenção da sepse neonatal causada pelo EGB. A sua prevalência, o momento do rastreamento e o uso de profilaxia antimicrobiana intra-parto.

REVISÃO DA LITERATURA

Uma avaliação feita após a emissão do primeiro *guideline* do CDC, revelou que 62% das crianças que apresentaram sepse neonatal pelo EGB não tinham fatores de risco e que 18% das gestantes com cultura positiva também não tinham este perfil, sugerindo que a utilização deste critério pode falhar como estratégia de prevenção da sepse neonatal precoce.² Outro dado importante é que a estratégia baseada em screening, realizado entre 35-37 semanas, se mostrou acima de 50% mais efetiva do que a baseada em risco para prevenir a doença causada pelo estreptococo B. Os fatores de risco de maior peso foram febre de 38°C ou maior e filho anterior com sepse neonatal.

A infecção costuma ocorrer nos primeiros dias de vida, sendo mais freqüente nas primeiras 72 horas. A infecção precoce responde por 90% dos casos sendo considerada a principal causa infecciosa de morte neonatal nos EUA² a Inglaterra o rastreamento não é realizado no pré-natal de forma rotineira. Um estudo de caso-controle revelou que ocorrem 0,57 casos de sepse neonatal causada pelo EGB para cada 1000 nascimentos, a mortalidade registrada neste estudo foi de 16%. Ela varia entre diferentes regiões do Reino Unido⁵.

Uma avaliação de casos de sepse neonatal por EGB em hospital terciário de Londres encontrou uma incidência de 1,1 casos/ 1000 nascidos vivos. O estudo sugere que a incidência de sepse por estrepto B pode ser maior que os

dados oficiais e que estudos subseqüentes poderão mudar a conduta adotada em relação a profilaxia da doença neonatal[6]. Outra avaliação feita incluindo sete maternidades de Londres identificou 140 casos de sepse neonatal com uma incidência de 0,71/1000 nascidos-vivos e uma mortalidade de 15,6%. Este estudo conclui, que a incidência de sepse por EGB nos hospitais de Londres é suficientemente alta para justificar o emprego de penicilina profilática no parto em pacientes de alto risco.⁷

Os dados sobre incidência de sepse neonatal no Brasil são escassos. Em Hospital Universitário de Porto Alegre, a descrição de 15 casos de sepse neonatal revelou uma incidência de 1/1000 nascidos vivos, sem a utilização de antibiótico profilático intra-parto.⁸ Em um hospital privado da cidade de São Paulo a incidência de sepse neonatal por EGB foi de 0,39/1000 nascidos vivos com uma mortalidade de 60%.⁹

No Brasil existem dados fragmentados sobre prevalência de colonização pelo EGB em gestantes. Em estudo realizado em Campinas, numa amostra de 316 gestantes foi encontrado uma positividade de 14,6%.¹⁰ Na cidade de Londrina-PR a prevalência encontrada foi de 14,9% em gestantes de terceiro trimestre.¹¹ Uma dissertação de mestrado apresentada no Curso de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança da PUCRS, descreveu uma prevalência de 23,1% para EGB pesquisado em gestantes da cidade de Uruguaiana-RS.¹² Estudo realizado em Maternidade da Cidade de São Luis-MA refere uma prevalência de 20,4% em gestantes em trabalho de parto.¹³

Um aspecto importante da sepse neonatal causada pelo EGB é o fato de atingir também recém-nascidos a termo e que podem não apresentar fatores de risco. Daí a importância da abordagem de rastrear rotineiramente todas gestantes entre 35-37 semanas a fim de discriminar aquelas que necessitam de profilaxia intra-parto das que não necessitam esta intervenção, evitando com isso que algumas crianças fiquem desprotegidas e ao mesmo tempo se reduza a utilização de antimicrobianos pela identificação de casos de colonização negativa, mesmo tendo fatores de risco. Uma preocupação dos tempos modernos tem sido a emergência de cepas resistentes de *Escherichia Coli*, patógeno também responsável por sepse neonatal cuja mortalidade é alta. Este aumento de resistência têm sido encontrado nas UTIs neonatais, mas não tem sido verificado o aumento na presença destas formas resistentes nos casos de sepse neonatal.¹⁴ Há outro estudo, no entanto, que avaliou as alterações nos índices de resistência da *E. Coli* em pacientes que receberam ampicilina intra-parto constatando um aumento de resistência nos casos de sepse neonatal precoce.¹⁵

A infecção intra-amniótica pode ocorrer pela ascensão do EGB da vagina de uma paciente colonizada, contaminando o líquido amniótico e, pela aspiração deste, o feto pode ter complicações graves.

Os fatores de risco mais importantes para o desfecho doença neonatal são a prematuridade, ruptura prematura de membranas prolongada (>18 horas), febre intra-parto, colonização intra-parto conhecida, infecção do trato urinário pelo EGB na gestação atual e RN comprometido em gestação anterior

por este agente. É importante salientar que a transmissão vertical é a forma mais freqüente, levando a sepse precoce. Na forma tardia da infecção a transmissão pode ser tanto vertical como horizontal. Uma coorte retrospectiva constatou que a estratégia adotada com “screening” foi considerada fator protetor comparado com a estratégia baseada no critério risco - RR 0,46 (IC 95%, 0,36-0,60). Neste estudo que foi feito com uma amostra de 600.000 crianças, foi constatado que a estratégia baseada no rastreamento entre 35-37 semanas se mostrou 50% mais eficiente do que a utilização do critério risco. A avaliação dos fatores de risco encontrou um RR 5.99 (IC 95% 4,28-8,38) para febre intra-parto. O segundo fator mais importante foi a historia prévia de RN com doença precoce RR 3.79 (IC95% 1.30-11,1). Nesta análise foi feita estratificação, analisando separadamente crianças a termo e de pré-termo. As crianças de pré-termo estavam em maior número no grupo onde foi adotado o critério risco, pois sabidamente a prematuridade é um fator de risco para a doença neonatal e ainda assim a estratégia com utilização da pesquisa pré-natal do EGB no trato genital-anal se manteve como fator protetor. Este estudo serviu de base para a recomendação do CDC para a utilização universal do *screening* em todas as gestantes entre 35-37 semanas a partir de 2002 com emissão de novo *guideline*.²

Um estudo que avaliou a prevalência de colonização e os fatores de risco para o EGB em duas maternidades da cidade de Ribeirão Preto-SP com diferentes níveis sócio-econômicos não encontrou relação da colonização com

fatores como idade, raça, estado civil, nível cultural, paridade, tabagismo e etilismo.¹⁶ A prevalência encontrada neste estudo foi de 17,9%.

A coleta de amostra para pesquisar o EGB da vagina e do ânus deve ser realizada em nível ambulatorial, sem a colocação de espelho para a coleta, sendo a amostra recolhida do intróito vaginal e a coleta retal se faz da sua parte terminal. A amostra pode ser obtida com o mesmo *swab* na ordem vagina-ânus, ou então com a utilização de *swabs* separados. Não há necessidade de coletar do colo uterino, de onde teremos menor possibilidade de isolar o gérmen, tendo em vista que é no terço distal da vagina que existe uma colonização mais intensa. Quando houver bacteriúria por EGB deve-se considerar que a gestante esteja intensamente colonizada, não havendo necessidade de realizar rastreamento no pré-natal. Neste caso a profilaxia intra-parto deve ser instituída, após o tratamento da bacteriúria e da urocultura de controle negativa.

O meio de transporte deve ser apropriado para preservar a amostra. Não é adequada a utilização de *swabs* colocados em um tubo de ensaio convencional sem nenhum caldo de cultura, que mantenha viável a amostra, que depois será semeada em meio específico.

O meio de cultura em que será semeada a amostra deve ser seletivo. Inicialmente se utiliza um meio Todd-Hewitt contendo antimicrobianos para eliminar a flora enteral, constituído da associação de gentamicina 8ug/ml + ácido nalidixico 15ug/ml ou colistina 10ug/ml + ácido nalidixico 15ug/ml. O tempo de incubação neste meio seletivo é de 18-24 horas a uma temperatura de 35-

37°C em um ambiente de 5% de CO₂. A partir daí são feitos repiques em meio contendo agar sangue de ovelha. Pela inspeção desta sementeira são identificadas áreas de hemólise sugerindo ação de beta-hemólise pelo EGB. Se em 48 de cultivo não se observa EGB nova sementeira é realizada por mais 48 horas.

Estudo que analisou 347 casos de doença neonatal causada pelo EGB em Berlim entre os anos de 2001 e 2003 constatou que 60% eram doença de início precoce e 16% destes se apresentavam com meningite. Nos casos de doença de início tardio a frequência de meningite foi 61,8%. Este estudo avaliou a incidência de doença neonatal que foi de 0,47/1000 nascidos vivos e a mortalidade foi de 4,3%. Um fator de risco importante encontrado para doença de início tardio foi o baixo peso ao nascer (<2500g) quando comparado com a doença de início precoce (31,7% x 6,9% p<0.001). A mortalidade não foi diferente na comparação entre doença precoce com tardia.¹⁷

A sepse neonatal precoce é tipicamente relacionada com a colonização do feto pela passagem através do canal do parto em gestantes portadoras do EGB (transmissão vertical), já a doença tardia está relacionada com a transmissão vertical e também a horizontal, que pode ser causada por EGB de origem comunitária. Nos casos de meningite na forma tardia da doença são isolados sorotipos de EGB do grupo III e clone ST-17 numa frequência que gira em torno de 90%.¹⁸ Estas cepas também designadas como altamente virulentas tem um potencial de agressividade elevado pelas características enzimáticas e de parede celular que apresentam. Um estudo realizado em hospitais de Paris

revelou que em crianças com doença neonatal tardia as cepas invasivas estiveram presentes em 78% das amostras.¹⁹

A intervenção com profilaxia intra-parto deve ser feita em gestantes portadoras do EGB, ou naquelas que não realizaram o rastreamento e se utilize o critério risco. A profilaxia com Penicilina G cristalina é a intervenção preconizada para ser feita no trabalho de parto, pois o uso do antimicrobiano visa exclusivamente prevenir a sepse neonatal pela transmissão vertical. É importante que o RN tenha concentração inibitória mínima sérica no momento do nascimento. Para avaliar o tempo necessário para atingir concentrações inibitórias no sangue do cordão, um estudo foi feito com 21 gestantes que se submeteram a cesariana eletiva e se verificou que concentrações inibitórias foram atingidas com a administração de 2g de ampicilina no intervalo de tempo a partir do fim da infusão materna e a coleta do sangue do cordão e que eram obtidas a partir de 27 minutos e por até 338 minutos²⁰.

Uma avaliação para verificar se a utilização do antimicrobiano elimina o EGB do trato genital constatou que 3 dias após o início da profilaxia as culturas vaginais se tornaram negativas²¹.

A profilaxia que é recomendada para prevenir a sepse neonatal deve ser iniciada na fase ativa do trabalho de parto e suspensa após a ligadura do cordão umbilical. O recomendável seria que a gestante recebesse penicilina cristalina por 4 horas antes do nascimento. Em situações clínicas como ruptura prematura de membranas de pré-termo e iminência de parto de pré-termo e na

cultura de amostra vaginal-anal o EGB for isolado, a recomendação de profilaxia antibiótica tem sido feita pelo CDC.

Uma meta-análise realizada para avaliar o uso de antibióticos para EGB encontrou cinco estudos com qualidade pobre em termos metodológicos. Estes estudos mostraram uma redução de colonização em RN de mães colonizadas pelo EGB com um *Odds Ratio* de 0,10 (IC 95% 0,07-0,14). A frequência de doença neonatal precoce foi menor no grupo tratado - *Odds ratio* de 0,17 – (IC 95% 0,07 – 0,39).²²

Como o EBG tem comportamento de colonização intermitente, existe dificuldade na sua abordagem no período gestacional. Uma informação microbiológica negativa ou positiva no início da gravidez não nos garante que ao final da gestação a paciente permaneça com a mesma condição. É necessário que o resultado da cultura seja de no máximo 5 semanas para ser valorizada.

Uma pesquisa no trato genital durante o trabalho de parto com cultivo convencional não consegue informar em tempo hábil o estado da gestante para discriminar os casos que exigem profilaxia dos que não necessitam. A utilização de um teste rápido durante o trabalho de parto que consiga dar uma informação em 4 a 6 horas pode ser de muita utilidade. A utilização de testes empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico durante o trabalho de parto tem sido motivo de investigações. Estudo que avaliou a eficiência do PCR para detectar o EGB no momento do parto, encontrou uma sensibilidade

de 97% e valor preditivo negativo de 98% e especificidade e valor preditivo positivo de 100% utilizando como padrão-ouro a cultura, e o resultado do exame foi dado entre 30-45 minutos.²³ Este exame teria que ser feito pelo PCR em tempo real para oferecer o resultado neste intervalo de tempo. A possibilidade de ter pessoal e laboratório disponível 24 horas é a grande dificuldade para a realização deste tipo de exame.

Em relação a outros fatores que poderiam estar associados a colonização de gestantes pelo EGB numa avaliação feita na cidade de Ribeirão Preto-SP, com um estudo controlado, foi verificado que gestantes HIV positivas apresentaram um índice de colonização maior que os controles, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa.²⁴

Uma preocupação que existe em relação ao uso de antimicrobianos durante a gravidez é o aumento na sepse neonatal precoce causada por cepas resistentes de EGB. Um estudo que avaliou 118 casos de sepse neonatal precoce em 13 anos de observação, não encontrou aumento de cepas resistentes nos casos de sepse neonatal precoce.¹⁴ Em relação aos padrões de sensibilidade do *Streptococo* do Grupo B aos antibióticos usuais em profilaxia, um estudo que testou 2937 amostras não encontrou cepas resistentes aos antimicrobianos penicilina, ampicilina, cefotaxima e vancomicina. O índice de resistência observado em relação à clindamicina foi de 12,7% e da eritromicina 25,6% tendo sido observado um aumento significativo na comparação dos índices do ano 1996 com 2003.²⁵

CONCLUSÕES

Poucos estudos em nosso País avaliam a incidência de doença neonatal precoce para verificar a validade de adotar as recomendações do CDC de rastreamento universal de EGB no pré-natal. Os estudos de prevalência em gestantes realizados em varias regiões do Brasil indicam que o problema é relevante, com índices de colonização semelhantes aos países que adotam a conduta de rastreamento e profilaxia intra-parto. No momento não existe a recomendação pelos órgãos oficiais do País no sentido de se fazer o rastreamento universal das gestantes para o EGB. Os dados disponíveis sobre prevalência sugerem que esta conduta poderia ser adotada. Um melhor conhecimento sobre a incidência de sepse neonatal seria necessária para posterior avaliação da conduta de profilaxia a ser empregada.

O recomendável seria, que nos locais que não dispõem de infra-estrutura laboratorial adequada para o cultivo do EGB, a profilaxia intra-parto seja baseada nos critérios de risco. Estes critérios estão bem estabelecidos:

- parto de pré-termo
 - ruptura de membranas ovulares há 18 horas ou mais
 - febre intra-parto de origem desconhecida
 - infecção do trato urinário pelo EGB nesta gestação
 - RN prévio com sepse neonatal
-

A profilaxia intra-parto recomendada é a infusão de penicilina cristalina 5 milhões de UI como dose inicial por via IV, seguida de 2,5 milhões de UI a cada 4 horas até o nascimento. Esta profilaxia deve ser instituída preferencialmente 4 horas antes do parto. No caso de cesariana eletiva a profilaxia não estaria indicada, bem como em casos que o rastreamento tenha sido feito há menos de 5 semanas e cujo resultado seja negativo.

REFERÊNCIAS

- 1 CDC. Perinatal Group B Streptococcal Disease after Universal screening recommendations - United States -M. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. MMWR 1996;45(RR-7):1-24.
 - 2 Schrag SJ, Zell ER, Lynfield R, Roome A, Arnold KE, Craig AS, et al. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. The New England journal of medicine. 2002 Jul 25;347(4):233-9.
 - 3 Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. The New England journal of medicine. 2000 Jan 6;342(1):15-20.
 - 4 Jakobi P, Goldstick O, Sujov P, Itskovitz-Eldor J. New CDC guidelines for prevention of perinatal group B streptococcal disease. Lancet. 1996 Oct 5;348(9032):969.
 - 5 Oddie S. Risk factors for early neonatal group B streptococcal sepsis: case-control study. BMJ. 2002;325:308-13.
 - 6 Luck S, Torny M, d'Agapeyeff K, Pitt A, Heath P, Breathnach A, et al. Estimated early-onset group B streptococcal neonatal disease. Lancet. 2003 Jun 7;361(9373):1953-4.
 - 7 Mifsud AJ. early-onset neonatal group B streptococcal infection in London: 1990-1999. BJOG. 2004;111.
 - 8 Miura E, MartinM. Group B streptococcal neonatal infections in Rio Grande do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2001;43(5):243.
 - 9 Vaciloto E, Richman R, Costa HPF, Kusano EJU, Almeida MFB, Amaro ER. A survey of the incidence of neonatal sepsis by group B
-

-
- Streptococcus during a decade in a Brazilian maternity hospital. *Braz J Infect Dis.* 2002;6(2):55-62.
- 10 Simões J. Phenotypical characteristics of group B streptococcus in parturients. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2007;11(2):261-6.
- 11 Beraldo C , Saridakis HO, Matsuo T. Prevalência da colonização vaginal e anorretal por Estreptococo do Grupo B em gestantes do terceiro trimestre. *RBGO.* 2004;26(7):543-9.
- 12 Silveira JL. Fiori RM. Prevalência do Streptococos agalactiae em gestantes detectado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Dissertação de Mestrado do Pós-graduação de Pediatria e Saúde da criança - PUCRS. 2006.
- 13 Costa ALR, Lamy Fº, chen MBC, Brito O, Lamy ZC, Andrade KL. Prevalência de colonização por estreptococos do grupo B em gestantes atendidas em maternidade pública da região Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia.* 2008;30(6):274-80.
- 14 Chen KT, Puopolo KM, Eichenwald EC, Onderdonck AB, Liberman E. No increase in rates of early-onset neonatal sepsis by antibiotic-resistant group B streptococcus in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2005;192:1167-71.
- 15 Matthew J. Bizzarro Dembry L-M, Baltimore RS, Gallagher PG. Changing patterns in neonatal escherichia coli sepsis and ampicillin resistance in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Pediatrics.* 2008;121(4):689-96.
- 16 Zusman AS, Baltimore RS, Fonseca SN. Prevalence of maternal group B streptococcal colonization and related risk factors in a Brazilian population. *Braz J Infect Dis.* 2006 Aug;10(4):242-6.
-

-
- 17 Fluegge K, Heinrich B et al.. Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany. *Pediatrics*. 2006;117(6):1139-45.
 - 18 Claire Poyart HR-P, Asmaa Tazi, Annick Billoët, Nicolas Dmytruk, Josette Raymond, Patrick Trieu-Cuot. Invasive Group B Streptococcal infections in infants, France. *Emerging Infectious Diseases* 2008;4(10):1647-49.
 - 19 Lamy MC, Dramsi S, Billöet A, Poupet HR, Tazi A, Raymond J. Rapid detection of the "highly virulent" group B streptococcus ST-17 clone. *Microbes and Infection*. 2006;8:1714-22.
 - 20 Colombo DF, Lew JL, Pedersen CA, Johnson JR, Fan-Havard P. Optimal timing of ampicillin administration to pregnant women for establishing bactericidal levels in the prophylaxis of Group B Streptococcus. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2006 Feb;194(2):466-70.
 - 21 Alvarez JR, Williams SF, Ganesh VL, Apuzzio JJ. Duration of antimicrobial prophylaxis for group B streptococcus in patients with preterm premature rupture of membranes who are not in labor. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2007 Oct;197(4):390 e1-4.
 - 22 Smaill F. Intrapartum antibiotics for group B streptococcal colonisation. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*. 2000(2):CD000115.
 - 23 Bergeron MG, Dambing KE, Menard C, Picard FJ, Gagnon M, Bernier M, et al. Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery. *The New England journal of medicine*. 2000 Jul 20;343(3):175-9.
 - 24 El Beitune P, Duarte G, Maffei CLM, Silva ACG, Quintana SM, Nogueira AA. Group B Streptococcus carriers among HIV-1 infected pregnant women: Prevalence and risk factors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;128:54-8.
 - 25 Castor ML, Withney CG, Como-Sabetti K, Facklam RR, Ferrieri P, Bartkus JM, Juni BA, Cieslak PR, Farley MM, Dumas NB, Schrag SJ,
-

Lynfield R. Antibiotic resistance patterns in invasive Group B streptococcal isolates. Infect Dis Obstet Gynecol(Hindawi Publishing Corporation). 2008;2008:5.

CAPITULO III

3 ARTIGO ORIGINAL

COLONIZAÇÃO DE GESTANTES PELO ESTREPTOCOCO DO GRUPO B: PREVALÊNCIA, FATORES ASSOCIADOS E CEPAS VIRULENTAS

Rui Lara de Carvalho⁵, Denise Cantarelli Machado⁶, Ana Paula Szezepaniak Goulart⁷, Fabiane Sartori Ávila Trolli⁸, Silvana Superti⁹, Alice Viero¹⁰, Cristian Viezzer¹¹, Renato Machado Fiori¹²

Endereço para correspondência:

Rua Prof. Langenconck 57/207

Bairro Petrópolis – Porto Alegre/RS – Brasil CEP 90630-060.

E-mail: ruilara@hotmail.com

⁵ Professor do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FAMED PUCRS

⁶ Professora do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da PUCRS

⁷ Acadêmica da Faculdade de Medicina da PUCRS

⁸ Acadêmica da Faculdade de Medicina da PUCRS

⁹ Microbiologista. Coordenadora do Laboratório de Microbiologia do Hospital São Lucas da PUCRS

¹⁰ Acadêmica da Faculdade de Farmácia da PUCRS

¹¹ Doutorando de Engenharia de Minas, Metalurgia e Materiais

¹² Professor Titular, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS

RESUMO

Introdução: O estreptococo do grupo B (EGB) tem sido motivo de preocupação para obstetras e neonatologistas pela possibilidade de sepse neonatal, que apresenta um risco importante de mortalidade. O rastreamento do EGB entre 35-37 semanas associado com a profilaxia intra-parto com penicilina cristalina tem propiciado uma diminuição de sepse neonatal precoce por EGB.

O índice de colonização por EGB é muito variável de acordo com região e condição social das gestantes. A frequência de clones virulentos é desconhecida em nosso meio.

Objetivos:

1 - Determinar a prevalência de EGB no trato genital-anal em gestantes que internam no Centro Obstétrico de um Hospital Universitário na Cidade de Porto Alegre, verificando também os fatores associados a esta colonização.

2- Verificar a presença de cepas invasivas do EGB nos casos positivos

Métodos: O estudo envolveu 319 gestantes, com idade gestacional que variou entre 24 e 41 semanas, que internaram na Maternidade do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Nestas pacientes foi feito um swab vaginal-anal e semeado em meio de cultura Todd-Hewitt.

As amostras positivas para EGB foram enviadas para realização de reação em cadeia da polimerase (PCR) para extração do DNA e tipagem de cepas altamente virulentas do EGB.

Resultados: A prevalência de EGB encontrada foi de 23,4% (IC 95%: 17,8-27,2). Em relação aos possíveis fatores associados a colonização a variável idade mostrou uma tendência de maior colonização em pacientes com mais de 30 anos, quando comparada com idades mais jovens. Isso também aconteceu em relação a comparação com a cor da paciente onde apareceu uma tendência de maior colonização em pacientes de cor preta ou mista. As pacientes com idade gestacional abaixo de 35 semanas apresentaram um índice de colonização inferior às gestantes entre 35-37 semanas e também entre 37-39 semanas.

A presença de ruptura prematura das membranas ovulares não apareceu como fator associado a índice maior de colonização pelo EGB.

Em relação a frequência de cepas virulentas a análise de 60 casos revelou 10 casos positivos (16,6%) para clone "sequence typing" – 17 (ST-17).

Conclusões: A prevalência de EGB encontrado em nosso estudo é similar aos índices de países desenvolvidos, que realizam o rastreamento rotineiro no pré-natal e fazem a intervenção com profilaxia intra-parto nos casos positivos.

Houve um maior índice de colonização em gestações à termo comparadas com gestações de pré-termo. A frequência de cepas “altamente virulentas” encontrada foi 16,6%.

Palavras-chave: *Streptococo agalactiae*, sepse neonatal precoce, cepas invasivas de *estreptococo B*.

ABSTRACT

Background: Group B Streptococcus (GBS) has been of concern to obstetrician and neonatologists to the possibility of neonatal sepsis, which presents a significant risk of mortality. Screening for GBS between 35-37 weeks associated with intrapartum prophylaxis with crystalline penicillin has resulted in reduction of neonatal sepsis by GBS. The rate of GBS colonization varies widely according to region and social status of women. The frequency of virulent clones is unknown in our country.

Objectives:

1 – To determine the prevalence of GBS in the genital-anal tract of pregnant patients that are hospitalized at the obstetric center of a University Hospital of Porto Alegre, also check the factors associated with this colonization.

2. Verify the presence of invasive strains of GBS positive cases

Methods: The study involved 319 pregnant women with gestational ages ranging from 24 and 41 weeks, who were hospitalized at the São Lucas Hospital of Catholic University of Rio Grande do Sul. These patients were done a vaginal-anal swab and seeded on culture medium Todd-Hewitt. Samples positive for GBS were sent to carry out polymerase chain reaction (PCR) for DNA extraction and typing of highly virulent strains of GBS.

Results: GBS prevalence found was 23.4% (CI 95%: 17.8-27.2). Regarding the possible factors associated with colonization of the age variable showed a trend of increased colonization in patients over 30 years compared with younger ages. This also happened for comparison with the color of the patient where it appeared a trend of increased colonization in patients of gestational age below 35 weeks among pregnant women at 35-37 weeks and between 37-39 weeks. The presence of premature rupture of ovular membranes did not appear as a factor associated with higher rate of GBS colonization.

Regarding the frequency of virulent strains analysis of 60 cases revealed 10 positive cases (16.6%) to clone sequence typing -17 (ST-17).

Conclusions: GBS prevalence found in our study is similar to rates in developed countries, carrying out routine screening during prenatal care and make an intervention with intrapartum prophylaxis in positive cases.

There was a higher rate of colonization in term pregnancies compared with preterm. The frequency of strains “highly virulent” found was 16.6%.

Key-words: Streptococcus agalactiae, early neonatal sepsis, invasive strains of GBS.

INTRODUÇÃO

A sepse neonatal causada pelo estreptococo do grupo B (EGB), também chamado de estreptococo agalactiae, persiste como causa importante de morbidade e mortalidade neonatal. A sepse neonatal é considerada precoce quando ocorre na primeira semana de vida do recém nascido (RN) e a tardia do 7º ao 90º dia.

Os avanços nas duas últimas décadas com a utilização da profilaxia intra-parto a partir das recomendações de 1996 feitas pelo Centro de Controle e prevenção de Doenças de Atlanta (CDC), juntamente com o Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (ACOG) e da Academia Americana de Pediatria (AAP) têm reduzido de forma significativa os casos de sepse neonatal precoce.¹

As recomendações feitas pelo CDC conjuntamente com o ACOG e AAP, foi inicialmente a utilização de duas condutas, ou a profilaxia antibiótica intra-parto baseada no critério risco ou baseada no rastreamento do EGB entre 35 e 37 semanas de gestação.

A partir de 2002, com a demonstração de que a conduta baseada no rastreamento se mostrou mais eficiente do que a conduta utilizando o critério risco, o rastreamento universal passou a ser a conduta recomendada com a emissão de um novo *guideline* emitido naquele ano.^{2,3} Os fatores de risco considerados para a profilaxia intra-parto com a administração de penicilina cristalina são febre intra-parto de origem desconhecida, trabalho de parto de

pré-termo e ruptura prematura prolongada das membranas ovulares. O fator de risco mais importante é a presença do estreptococo do grupo B no trato genital-anal de uma gestante.

Em estudo realizado na cidade de Ribeirão Preto-SP comparando gestantes HIV positivas com um grupo controle foi verificada uma tendência de maior colonização nas pacientes portadoras do vírus, embora a diferença não tenha se mostrado estatisticamente significativa.⁴

Um estudo realizado para comparar as estratégias de prevenção da doença neonatal precoce causada pelo EGB mostrou que no grupo que apresentou sepse precoce o rastreamento realizado antes do parto foi fator protetor RR 0,48 (IC 95% 0.38-0.61). Foram fatores associados com doença precoce o parto de pré-termo RR 1.76 (IC95% 1.28-2.42) e ruptura prematura prolongada de membranas > 18 horas RR 1.80(IC95% 1.28-2.53). Febre intra-parto de 38° C ou maior mostrou um RR de 5.99 (IC 95% 4.28-8.38).⁵

Uma revisão sistemática que avaliou os fatores de risco para doença neonatal precoce do RN verificou que a presença do EGB no trato genital-anal da gestante no momento do parto se constitui no mais importante fator de risco para o desenvolvimento de sepse neonatal com uma razão de chances (*Odds Ratio* – OR) de 204. Quando a informação foi obtida com 36 semanas observou-se uma OR de 26,7 e se a cultura for feita com 28 semanas a OR foi de 9,64.⁶

Um estudo de caso controle numa população Britânica, envolvendo 37 casos documentados de sepse neonatal precoce, constatou uma incidência precoce de 0,57/1000 nascidos vivos. Neste estudo foram avaliados fatores de risco para o desenvolvimento de sepse. A prematuridade esteve associada a um aumento significativo do risco apresentando uma razão de chances (OR) de 10.4, sendo as gestações abaixo de 34 semanas associadas a um risco maior (OR = 33,6). Para a ruptura de membranas de 18 horas o OR foi de 25.8 e para febre materna intra-parto de 10,4. A mortalidade neonatal encontrada neste estudo foi de 16,2%.⁷

A descrição de 15 casos de sepse neonatal causadas pelo EGB em um hospital universitário de Porto Alegre-Brasil, reportou uma incidência de 1/1000 nascidos vivos.⁸ É de se ressaltar que não havia a rotina de antibiótico profilático intra-parto para EGB na maternidade onde o estudo foi realizado. Outro levantamento realizado numa maternidade privada na cidade de São Paulo-Brasil encontrou uma incidência de sepse neonatal precoce de 0,39/1000 nascidos vivos.⁹

A profilaxia intra-parto com penicilina cristalina têm reduzido a incidência de sepse neonatal. Uma avaliação feita após a liberação do *guideline* do CDC de 1996 encontrou uma redução de 65% na doença neonatal precoce causada pelo EGB. A incidência que era de 1,7/1000 nascidos vivos passou a ser de 0,6/1000 nascidos vivos. Foi verificado que RN de gestações de pré-termo apresentaram um risco de mortalidade que foi 6,7 vezes maior do que RN a termo, sendo a bacteremia a causa que responde por 80% dos casos.¹⁰

Uma avaliação feita pelo CDC entre 2003 e 2005 para verificar o comportamento da sepse neonatal precoce após as recomendações emitidas em 2002, constatou uma incidência de 0,33/1000 nascidos vivos e uma mortalidade de 5%.¹¹

A infecção fetal pode ocorrer pela ascensão do EGB do trato genital de uma gestante colonizada e pela aspiração do líquido amniótico contaminado. A passagem do feto pelo canal do parto de uma gestante com o EGB presente no trato genital propicia a sua colonização. No caso de sepse tardia a transmissão pode ser vertical ou horizontal.

Existem sorotipos de estreptococo do grupo B consideradas de alto poder de invasão, também chamados de “altamente virulentos”, que possuem um nível diferente de atividade enzimática lhe conferindo uma maior agressividade. Este tipo de clone está presente num percentual elevado nos casos de doença neonatal. A identificação destas cepas invasivas antes do nascimento pode permitir condutas diferenciadas no atendimento do RN.

Os objetivos desse estudo foi verificar a prevalência de EGB em gestantes, os fatores associados com a colonização e a frequência de clones invasivos deste patógeno em gestantes que procuram a maternidade de um Hospital Universitário.

MÉTODOS

Este estudo prospectivo transversal para determinar a prevalência de EGB em gestantes foi conduzido no Centro Obstétrico do Hospital São Lucas (HSL) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), com idade gestacional entre 24 e 41 semanas. A amostra foi realizada por conveniência no período entre 1º de abril e 30 de novembro de 2008 e teve a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade.

Foram incluídas no estudo apenas gestantes que concordaram em participar e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Foram excluídas gestantes que tivessem usado antimicrobianos nos últimos sete dias.

Imediatamente após a internação da gestante foi realizada a coleta de uma amostra com um mesmo *swab*, do terço inferior da vagina e da porção terminal do reto. Esta amostra foi imediatamente inoculada em frasco contendo meio seletivo de Todd-Hewitt, suplementado com gentamicina (8ug/ml) e ácido nalidíxo (15ug/ml) para inibir o crescimento de enterobactérias e enviado imediatamente ao Laboratório de Microbiologia do HSL da PUCRS para processamento. Após incubação por 24 horas a uma temperatura de 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂, uma alçada de cada amostra foi transferida para placa contendo agar sangue de carneiro e as placas incubadas por 24 a 48 horas. De todas as colônias sugestivas de estreptococos foram realizadas as

provas de catalase, bile-esculina e fator CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen).

Uma amostra dos casos positivos foi enviada para o Setor de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. As colônias isoladas de *Streptococcus agalactiae* foram retiradas do meio de cultura com alça de platina e suspendidas em 200 µL de PBS.

A extração de DNA foi realizada adicionando-se 100 µL de SDS 10%, 20 µL de EDTA 0,5 M e 100 µL de Proteinase K (20 mg/mL). Após incubação a 55°C por 3 horas, a amostra foi tratada com Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico e centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o DNA foi precipitado pela adição de 800 µL de isopropanol gelado e 180 µL de NaOAc 3 M pH 5.2. O DNA foi precipitado à -20°C por pelo menos 2 horas e a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi ressuspenso com 50 µL de água MilliQ e armazenado a -20°C até ser utilizado. O método da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizado para detecção do gene gbs2018-ST17 de *Streptococcus agalactiae* com os oligonucleotídeos iniciadores direto SP-ST17-D: 5'ATA CAA ATT CTG CTG ACT ACC G 3' e reverso SP-ST17-R: 5' TTA AAT CCT TCC TGA CCA TTC C 3' ¹² em uma mistura de reação contendo os seguintes reagentes: 5 µL de DNA, 100 µM de dNTPs, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 25 pmol de cada *primer*, 2,0 mM de MgCl₂ e água destilada estéril para um volume final de 50 µL. Foram

incluídos, em cada série de PCR, controles positivos, negativos e uma mistura de reação que não continha DNA. Todas as reações da PCR foram submetidas a um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, um ciclo de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores de 50°C por um minuto e um ciclo de 72°C por 1 minuto e, após trinta ciclos, um ciclo final de 72°C por 10 minutos em termociclador (*MJ Research PTC - 200 Peltier Thermal Cycler*).

Uma amostra do produto amplificado (20 µl) foi separada por eletroforese em gel de agarose 2% contendo 2 µg/ml de brometo de etídio em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) a 100 volts por 30 minutos. Finalmente, os produtos de 210 pb da PCR foram visualizados sob luz ultravioleta.

As variáveis categóricas descritas por percentuais foram analisadas pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fischer quando a célula apresentava valor menor do que 5. As variáveis contínuas foram analisadas pelo teste t de Student. O nível de significância adotado foi de alfa <0,05. Os dados foram processados com o programa SPSS versão 12.

RESULTADOS

Das 319 gestantes estudadas em 71 delas houve crescimento de *streptococcus agalactiae*, uma prevalência de 22,3% (IC 95%: 17,8-27,2). A média de idade das gestantes foi de $25 \pm 6,7$ anos; e a idade gestacional no momento da coleta de $37,5 \pm 3,6$ semanas. A comparação dos grupos positivos e negativos para a presença do EGB está contida na tabela 1. As variáveis analisadas nesta tabela não mostram diferença estatisticamente significativa em relação aos casos positivos e negativos.

A única variável que mostrou diferença estatisticamente significativa foi a idade gestacional no momento da coleta da amostra para cultivo, ocorrendo uma maior frequência de colonização em gestantes com 38 semanas ou mais (26,2%) comparada com uma frequência de 14,7% em gestantes com idade gestacional até 37 semanas completas $p < 0,028$. A colonização pelo EGB mostrou um crescimento no número de casos positivos, que coincide com o aumento da idade gestacional em semanas (figura 1).

Das 71 culturas positivas em 60 se fez a pesquisa de cepas invasivas do EGB, extração de DNA e a tipagem de clone específico EGB do grupo III, ST-17. Em 10 casos se mostrou positivo para este clone (16,6%). A Fig 2 mostra a fotografia dos casos positivos de cepas invasivas ST-17.

Tabela 1 – Comparação dos grupos positivo e negativo para a presença de Estreptococo do grupo B (EGB)

Característica	Positivo (n=71)	Negativo (n=248)	P
Idade, anos	26,1±7,6	24,8±6,4	0,16 ^[1]
Cor, n° (%)			0,39 ^[2]
branca	45 (63)	178 (72)	
mista	19 (27)	50 (20)	
preta	7 (10)	20 (8)	
Estado civil, n° (%)			0,79 ^[2]
sem companheira	11 (16)	44 (18)	
com companheira	60 (84)	204 (82)	
Paridade > 3	3 (4)	26 (11)	0,17 ^[2]
Pré-natal, n° (%)	71 (100)	237 (96)	0,13 ^[3]
Tabagismo, n° (%)	15 (21)	41 (17)	0,47 ^[2]
Ruprema, n° (%)	17 (24)	55 (22)	0,88 ^[2]
DHPG, n° (%)	15 (21)	38 (15)	0,34 ^[2]
TPP, n° (%)	4 (6)	38 (15)	0,054 ^[2]

Os dados são apresentados como média±desvio padrão ou contagem (%).

P: significância estatística, [1]: t de Student, [2]: qui-quadrado e [3]: exato de Fisher

Ruprema: ruptura prematura de membranas, DHPG: doença hipertensiva própria da gestação, TPP: trabalho de parto prematuro.

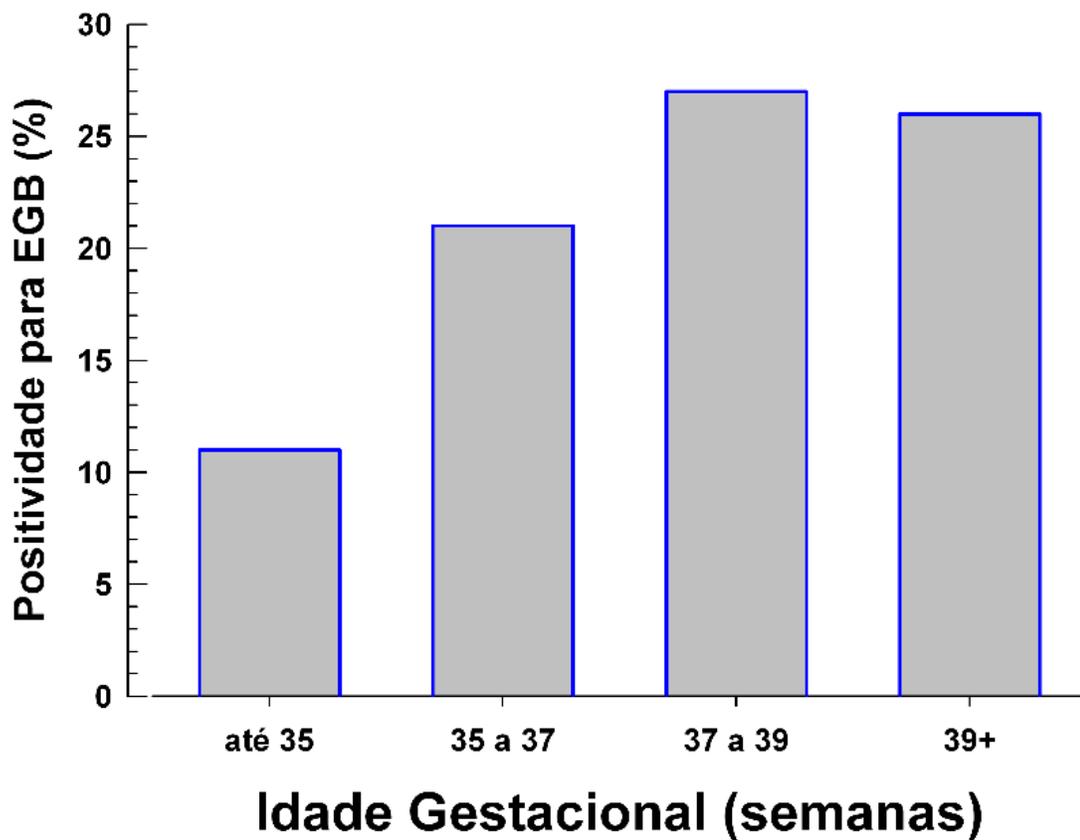


Figura 1 – Índice de colonização pelo EGB de acordo com a idade gestacional

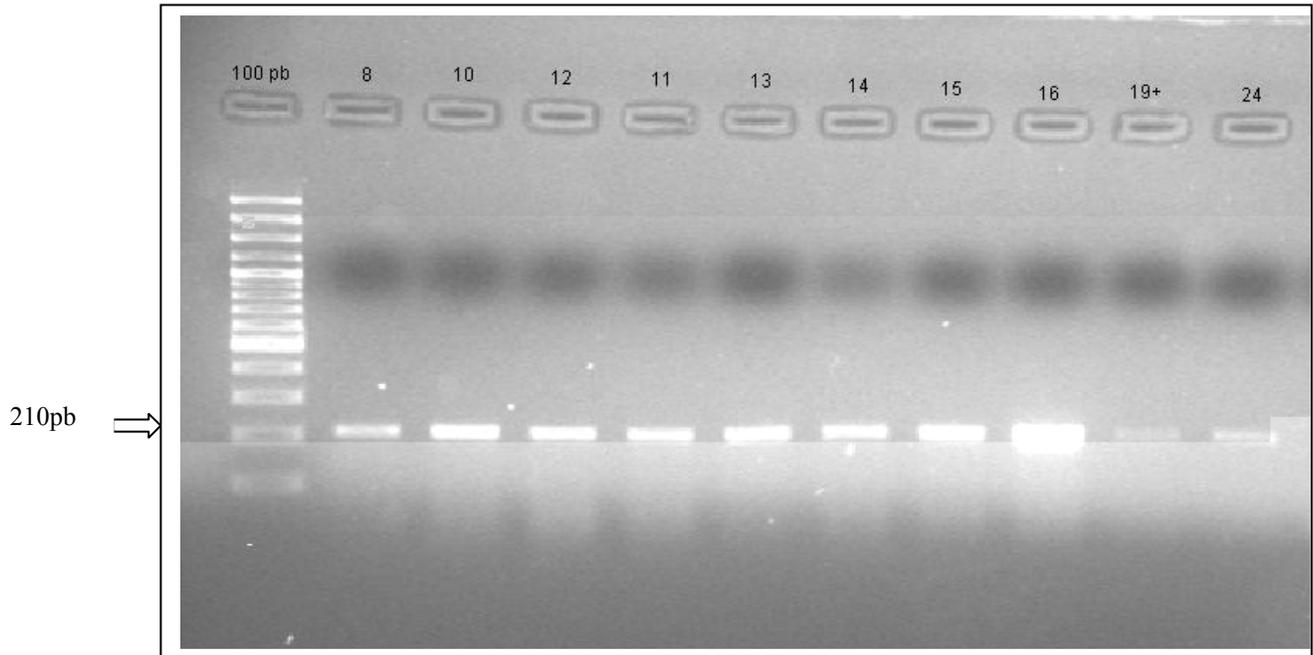


Figura 2 – Produto da PCR para o gene gbs2018-ST17 de estreptococo agalactiae em gel de agarose a 2%.
100pb: marcador de peso molecular; Mix: controle negativo da reação sem DNA.

DISCUSSÃO

Nosso estudo encontrou uma prevalência de EGB comparável com outros centros brasileiros e também com estudos internacionais, dando uma idéia da relevância do assunto em nosso meio. Não foi encontrada relação com fatores de risco que têm sido descritos em estudos epidemiológicos de gestantes com EGB. Devemos considerar que o tamanho da amostra possivelmente tenha sido insuficiente para que algumas das variáveis estudadas pudessem aparecer como significante. Em algumas delas como o trabalho de parto de pré-termo, mostrou uma tendência marginal para ser considerada como fator associado com a colonização pelo EGB. Provavelmente com uma amostra maior, esta variável pudesse mostrar uma relação positiva. O número de casos positivos para análise deste fator foi muito pequeno, apenas quatro casos.

O índice de colonização do EGB durante a gestação, em nosso estudo, mostrou um crescimento com o aumento da idade gestacional. A comparação da coleta realizada em gestações de pré-termo com gestações a termo mostrou haver um índice de colonização maior nas gestações acima de 37 semanas e esta diferença foi estatisticamente significativa. Este dado nos permite dizer que o rastreamento na gestação feito mais próximo do seu final tem uma chance maior de positividade, nos permitindo obter uma informação que vai retratar melhor a realidade.

Uma revisão sistemática verificou que o “screening” realizado com 36 semanas tem melhor sensibilidade do que se for feito com 28 semanas, com aumento também nos valores preditivos positivos e negativos.⁶

Um estudo que analisou fatores de risco para colonização do trato genito-urinário de gestantes, encontrou um índice de colonização maior em pacientes de cor preta ou elevado índice de massa corporal. Foi observada também uma relação fraca com gestantes trabalhadoras em saúde. Os fatores tabagismo e mulheres de origem hispânicas foi fator protetor.¹³ Em outro estudo realizado na cidade de Ribeirão Preto-São Paulo, não foi encontrada associação entre colonização por EGB e os fatores idade, raça, estado civil, nível educacional, paridade, tabagismo e uso de bebida alcoólica. Este estudo constatou uma prevalência de 17,9% de EGB em gestantes.¹⁴

Outros estudos de prevalência realizados em cidades brasileiras revelam índices elevados de EGB no trato genital-anal de gestantes que são comparáveis com estatísticas de estudos norte-americanos. A avaliação da presença de EGB em gestantes do terceiro trimestre na cidade de Londrina-PR, encontrou uma prevalência de 14,9%.¹⁵ Índice similar foi encontrado na cidade do Rio de Janeiro, com uma positividade de 14,6%.¹⁶ No Nordeste Brasileiro uma avaliação em gestantes verificou que o EGB esteve presente em 20,4% delas. Não foi encontrada relação entre colonização e fatores sócio-demográficos nesta análise.¹⁷

Estudo realizado na cidade de Uruguaiana-RS, utilizando PCR para identificar o EGB encontrou prevalência de 23,1% em gestantes.¹⁸

A frequência de formas invasivas de EGB do grupo III clone ST-17, identificadas em nosso estudo foi de 16,6%. Estas cepas invasivas têm sido relacionadas com o desenvolvimento da doença neonatal precoce e tardia do RN, podendo chegar a uma frequência acima de 90% nos casos de meningites.¹⁹

A conduta diante da presença de clones com este potencial de invasão deveria ser a administração precoce de antimicrobianos ou uma rigorosa observação no período neonatal imediato.

Um estudo realizado para identificar clones de EGB do grupo III – ST-17 foi realizado em vários Hospitais da cidade de Paris, tendo-se verificado que em 87,5% da doença neonatal causada por este agente a linhagem invasiva esteve presente. Nesse estudo, cujas amostras foram coletadas de crianças com doença neonatal causada pelo EGB, em 47,6% delas com a forma precoce da doença havia a presença de clones invasivos e em 78% dos casos de sepse tardia.¹²

Os fatores de risco para doença neonatal precoce e tardia não foram avaliados em nosso estudo e não fazia parte dos objetivos do mesmo. A amostra para este tipo de avaliação exige um número elevado de pacientes.

O rastreamento rotineiro no pré-natal tem sido uma prática que aos poucos está sendo incorporada à rotina de atendimento pré-natal em nosso

meio, especialmente em Hospitais Universitários. A dificuldade na técnica de isolamento e identificação do EGB tem sido o maior entrave. A busca por testes rápidos para a detecção deste patógeno no trabalho de parto, quando não foi feito o rastreamento ou em situações como a ruptura prematura de membranas de pré-termo ou trabalho de parto de pré-termo com importante risco de nascimento, nas duas situações é uma meta importante. A utilização de técnicas que utilizam PCR em tempo real, podem conseguir a identificação do *estreptococo agalactiae* em 4 horas, podendo permitir a profilaxia intra-parto nos casos positivos e a não utilização nos negativos, atingindo um dos objetivos atuais que é o de restringir o uso de antimicrobianos na gestação, para evitar o aumento na ocorrência de cepas resistentes de *eschericia coli* nas Unidades de Tratamento Intensivo neonatais.

Para a realização de PCR em tempo real há necessidade de pessoal capacitado estar disponível durante 24 horas para realização do exame, o que é uma grande dificuldade.

Outra meta também importante é o desenvolvimento de vacinas para o estreptococo do grupo B. A dificuldade que existe é o fato de haver uma diversidade de sorotipos do germen.

Em conclusão os resultados deste estudo mostraram um índice de colonização de 22,3% nas gestantes pelo EGB, mostrando a relevância deste tema para obstetras e neonatologistas de nosso meio e que o rastreamento no pré-natal estaria justificado. Mais estudos para avaliar a incidência de seps

neonatal são necessários para se ter uma idéia da relevância deste desfecho em nosso País.

A presença de cepas invasivas de EGB identificadas nas amostras positivas de nosso estudo dão uma noção clara, que elas estão presentes numa freqüência não desprezível, embora essas amostras sejam de gestantes que são portadoras do gérmen, não sendo cepas isoladas de casos de doença neonatal. Não há estudos que tenham avaliado a presença de cepas virulentas em casos de sepse neonatal precoce ou tardia em nosso meio.

A utilização de tecnologias que nos permita a identificação por testes rápidos as cepas invasivas de EGB, pode propiciar condutas neonatais mais agressivas para crianças que passam pelo canal de parto de gestantes portadoras destes clones.

REFERÊNCIAS

- 1 CDC. Perinatal Group B Streptococcal Disease after Universal screening recommendations - United States -M. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. MMWR 1996;45(RR-7):1-24.
 - 2 Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. MMWR Recomm Rep. 2002 Aug 16;51(RR-11):1-22.
 - 3 MMWR. prevention of perinatal Group B streptococcal disease: A public health perspective. CDC guideline. 1996;45:1-24.
 - 4 El Beitune P. Group B Streptococcus carriers among HIV-1 infected pregnant women: Prevalence and risk factors. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2006;128:54-8.
 - 5 Schrag SJ, Zell ER, Lynfield R, Roome A, Arnold KE, Craig AS, et al. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. The New England journal of medicine. 2002 Jul 25;347(4):233-9.
 - 6 Benitz WE GJ, Druzin ML. Risk factors for Early-onset Group B Streptococcal Sepsis: Estimation of Odds Ratios by Critical Literature Review. Pediatrics. 1999;103(6).
 - 7 Oddie S. Risk factors for early neonatal group B streptococcal sepsis: case-control study. BMJ. 2002;325:308-13.
 - 8 Miura E MM. Group B streptococcal neonatal infections in Rio Grande do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2001;43(5):243.
 - 9 Vaciloto E RR, Costa HPF, Kusano EJU, Almeida MFB, Amaro ER. A survey of the incidence of neonatal sepsis by group B Streptococcus
-

- during a decade in a Brazilian maternity hospital. *Braz J Infect Dis.* 2002;6(2):55-62.
- 10 Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *The New England journal of medicine.* 2000 Jan 6;342(1):15-20.
 - 11 Perinatal Group B streptococcal Disease after universal screening recommendations - United States, 2003-2005. *MMWR.* 2007;56(28):701-5.
 - 12 Lamy M-C. Rapid detection of the "highly virulent" group B streptococcus ST-17 clone. *Microbes and Infection.* 2006;8:1714-22.
 - 13 Stapleton RD KJ, Evans LE.. risk factors for Group B streptococcal genitourinary tract colonization in pregnant women. *Obstet Gynecol.* 2005;106:1246.
 - 14 Zusman AS BR, Fonseca SNS. Prevalence of maternal group B streptococcal colonization and related risk factors in a Brazilian population. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2006;10(3).
 - 15 Beraldo C BA, Saridakis HO, Matsuo T. Prevalência da colonização vaginal e anorretal por Estreptococo do Grupo B em gestantes do terceiro trimestre. *RBGO.* 2004;26(7):543-9.
 - 16 Simões J. Phenotypical characteristics of group B streptococcus in parturients. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2007;11(2):261-6.
 - 17 Costa ALdR. Prevalência de colonização por estreptococos do grupo B em gestantes atendidas em maternidade pública da região Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia.* 2008;30(6):274-80.
 - 18 Silveira JLSF, Renato Machado. Pravalência do Streptococcus agalactiae em gestantes detetada pela técnica de reação em cadeia da
-

polimerase (PCR). Dissertação de Mestrado do Pos-graduação de Pediatria e Saúde da Criança - PUCRS. 2006.

- 19 Claire Poyart HR-P, Asmaa Tazi, Annick Billoët, Nicolas Dmytruk, Josette Raymond, Patrick Trieu-Cuot. Invasive Group B Streptococcal infections in infants, France. *Emerging Infectious Diseases* 2008;4(10):1647-49.