



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**OCORRÊNCIA DO ESTREPTOCOCO DO GRUPO B EM
GESTANTES DE BAIXO E ALTO RISCO OBSTÉTRICO EM
MANAUS/AM.**

CARLOS HENRIQUE ESTEVES FREIRE

**MANAUS
MAIO DE 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CARLOS HENRIQUE ESTEVES FREIRE

**OCORRÊNCIA DO ESTREPTOCOCO DO GRUPO B EM
GESTANTES DE BAIXO E ALTO RISCO OBSTÉTRICO EM
MANAUS/AM.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de concentração “Ciências da Saúde”, na Linha de Pesquisa “Biodiversidade Amazônica Aplicada às Doenças Regionais”.

Orientadora: Prof^a. Dra. Júlia Ignez Salem

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira

**MANAUS
MAIO DE 2016**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F866o Freire, Carlos Henrique Esteves
Ocorrência do estreptococo do grupo B em gestantes de baixo e alto risco obstétrico em Manaus/AM / Carlos Henrique Esteves Freire. 2016
65 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Julia Agnez Salem
Coorientadora: Patrícia Pulcinelli Orlandi Nogueira
Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Estreptococo do Grupo B. 2. Sepsis neonatal. 3. Mortalidade Neonatal. 4. Complicações perinatais. I. Salem, Julia Agnez II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CARLOS HENRIQUE ESTEVES FREIRE

**OCORRÊNCIA DO ESTREPTOCOCO DO GRUPO B EM
GESTANTES DE BAIXO E ALTO RISCO OBSTÉTRICO EM
MANAUS/AM.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de concentração “Ciências da Saúde”, na Linha de Pesquisa “Biodiversidade Amazônica Aplicada às Doenças Regionais”.

Aprovada em 06 / 05 / 2016

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Julia Ignez Salem, Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof. Dra. Mariana Facchinetti Brock
Universidade Estadual do Amazonas

Dr. Paulo Afonso Nogueira
Instituto Leônidas e Maria Deane – Fundação Oswaldo Cruz/AM

Dedicatória

*À memória do Dr. Raimundo Nilo Lopes Freire, meu querido e saudoso pai,
que com o seu orgulho imensurável de ter este filho médico, seu senso
humanitário e, sobretudo, sua humildade, me inspira, e sempre me inspirará,
a assistir com humanidade, carinho e dedicação àqueles que de meus
préstimos precisem.*

Agradecimentos

A Deus, nosso criador, por ter me dado força e tenacidade para conseguir executar e concluir esta pesquisa;

A Rejane Freire, minha esposa dedicada e sempre presente nas minhas ausências frequentes;

Aos meus colegas de mestrado que sempre achavam uma palavra de apoio na continuidade deste processo de formação, quando me deparava com situações desafiadoras;

As minhas alunas do PIBIC, Bárbara Ihara e Flávia Mourão que apesar de todas as dificuldades iniciais confiaram no projeto e o tocaram para frente com dedicação e presteza;

A minha colega, Rossiclei Pinheiro, incentivadora incansável deste projeto, sempre pronta a colaborar com a realização desta pesquisa;

As minhas colegas, técnicas de enfermagem do Ambulatório de pré natal da maternidade Balbina Mestrinho que vibravam comigo durante a realização da pesquisa em campo;

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane da Fundação Oswaldo Cruz/AM pelo apoio as realizações dos exames laboratoriais, executados no Laboratório de Biodiversidade em Saúde.

Agradecimentos Especiais

A professora Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira, que com grande desprendimento e dedicação, orientou e contribuiu decisivamente no desenvolvimento deste projeto, inclusive na obtenção de financiamento para o mesmo, assim como na execução das ações necessárias a obtenção dos resultados.

E a Dra. Julia Ignez Salem, minha querida orientadora, que aceitou de primeira hora ter-me como orientando, abraçando por completo a ideia da pesquisa, sempre estimulando meu pensar científico e transmitindo sua inabalável confiança na conclusão do projeto cujos resultados irão contribuir de maneira significativa com as gestantes amazonenses e quiçá com a comunidade científica nacional.

RESUMO

O *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B de Lancefield é responsável pela ocorrência de abortamento, infecção urinária, prematuridade, corioamnionite, endometrite puerperal e sepse neonatal precoce com uma alta mortalidade, principalmente entre prematuros. A taxa de colonização materna, a incidência de complicações perinatais causadas pelo EGB, a inquestionável eficácia da intervenção e a escassez de trabalhos nacionais que revele a realidade brasileira, justificam a realização de estudos que possam gerar e ampliar conhecimentos. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi de investigar a colonização por Estreptococo do grupo B (EGB) de gestantes que utilizaram o serviço de pré-natal da Maternidade Estadual Balbina Mestrinho, Manaus/AM, unidade de atendimento as grávidas de baixo risco obstétrico e de referência para alto risco obstétrico. Para tanto, foram estudadas 174 gestantes que se encontravam entre a 35^a e 37^a semanas de gestação, confirmadas pela ultrassonografia e/ou pela data da última menstruação, atendidas no período compreendido de abril a novembro de 2012. Durante a consulta de pré natal foram colhidas as informações demográficas, socioeconômicos, história obstétrica pregressa e atividade sexual, assim como, dados da gestação atual e coletadas amostras clínicas vaginais e anorretais para a realização de exames bacteriológicos e moleculares. Nos exames bacteriológicos foi realizado o cultivo, que no caso de positividade para o estreptococo foi submetido à identificação taxonômica. As amostras clínicas com os isolados de estreptococos foram submetidas às análises de detecção de DNA por técnica de PCR. Para fins de análise dos resultados, conforme os objetivos propostos, a colonização pelo EGB foi determinada quando um ou mais dos métodos diagnósticos (cultivo, ou PCR “in house”) em qualquer das amostras coletadas (vaginal e anorretal), proporcionou uma positividade para o EGB. Para análise das variáveis quantitativas, foram calculados os percentuais de ocorrência dos eventos. Para as análises de sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos, assim como seus valores preditivos positivos e negativos, foram utilizadas tabelas de contingência do tipo 2x2. Também foram calculados os respectivos Intervalos de Confiança ao nível de 95% (IC95%) e na comparação das proporções foi utilizado o teste do Chi Quadrado (X²) de Pearson, sendo que na impossibilidade da aplicação do mesmo, foi utilizado o teste exato de Fisher. Entre aos resultados obtidos destaca-se uma taxa de colonização de 51,02% pelo cultivo e de 69,39% pela PCR, sendo que essa última forneceu uma ampliação de 18,37%. Pelo método de cultivo a vagina, como local de coleta, mostrou-se mais eficiente que anorretal, apesar de que em 17,33% a colonização ter sido obtida apenas nas amostras anorretal. A caracterização de alto e baixo risco não se traduziu em fator de risco para a colonização, apesar de essa ter sido maior nas gestações de alto risco. Na presente casuística, a ocorrência de infecções do trato urinário apresentou significância estatística como fator de proteção à colonização pelo EGB.

Palavras-chaves: Estreptococo do Grupo B; *Streptococcus agalactiae*; Sepsis Neonatal; Prematuridade.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae or β -hemolytic *Streptococcus* Group B Lancefield is responsible for the occurrence of urinary tract infection, abortion, prematurity, chorioamnionitis, puerperal endometritis and early neonatal sepsis with a high mortality, especially among premature infants. The rate of colonization, the incidence of perinatal complications caused by EGB, the unquestioned effectiveness of intervention and the shortage of national works that reveal the Brazilian reality, justify this study that can generate and expand knowledge. In this sense, the objective of the present work was to investigate the colonization by Group B *Streptococcus* (GBS) of pregnant women who used the prenatal unit of the Balbina Mestrinho State Hospital Maternity, ManausAM, pregnant service unit of low risk obstetric and reference to high risk obstetric. To this end, 174 were studied pregnant women who were between the 35th and 37th weeks of pregnancy, confirmed by ultrasound or by the first day of last the period, met in the period from April to November 2012. During the prenatal query were collected demographic, socioeconomic information, previous obstetric history and sexual activity, as well as data from the actual pregnancy and vaginal and anorectal specimens were collected for bacteriological and molecular tests. Bacteriological examination was conducted the cultivation, which in the case of positivity to the streptococcus was submitted to taxonomic identification. The clinical samples with *Streptococcus* isolates were subjected to analyses of DNA detection by PCR. For the purposes of analysis of the results, as the proposed objectives, the colonization by EGB was determined when one or more of the diagnostic methods (cultivation, or PCR "in house") in any of the samples collected (vaginal and anorectal), provided a positivity to the EGB. For analysis of the quantitative variables were calculated the percentages of occurrence of events. For the analysis of sensitivity and specificity of diagnostic methods, as well as their positive and negative predictive values were used type 2 x 2 contingency tables. Were also calculated the respective confidence intervals at 95% (95%) and comparison of proportions, the test Chi Square (X²) Pearson, and the impossibility of implementation, we used the exact test Fisher. Among the results obtained are distinguished colonization rate by cultivation of 51.02% and 69.39% by PCR, with the latter provided a magnification of 18.37%. At the vagina cultivation method, such as collection site, it was more efficient than anorectal, although at 17.33% colonization have been obtained only in the anorectal samples. The characterization of high and low risk did not translate into a risk factor for colonization, although that was higher in high-risk pregnancies. In this series, the occurrence of urinary tract infections was statistically significant protective factor for colonization by EGB.

Key words: Group B Strep; *Streptococcus agalactiae*; Neonatal Sepsis; Prematurity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Recém-nato acometido por sepse neonatal ocasionada por Estreptococo do grupo B	18
FIGURA 2	Fluxo de procedimentos para investigação de colonização de gestantes por Estreptococo do grupo B (EGB).....	31
FIGURA 3	Coleta de amostra vaginal para isolamento de EGB.....	33
FIGURA 4	Ilustração de um resultado positivo no teste de CAMP	35
FIGURA 5	Resultados de detecção do EGB conforme a análise de acuidade e concordância com a PCR, tendo o cultivo como padrão ouro de diagnóstico.....	39

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1	Resultados entre o Cultivo e a PCR na detecção do EGB.....	40
TABELA 2	Resultados de colonização pelo EGB em gestantes, conforme positividade nos diferentes métodos e locais anatômicos de coleta.....	44
TABELA 3	Resultados de colonização do EGB correlacionados com os locais de coleta e métodos diagnósticos.....	45
TABELA 4	Resultados com positividade de colonização pelo EGB conforme os métodos diagnósticos e locais de coleta.....	46
TABELA 5	Distribuição dos resultados de colonização pelo EGB pelos métodos diagnósticos utilizados, conforme gestação de alto e baixo risco obstétrico.....	47
TABELA 6	Resultados de colonização pelo EGB conforme métodos diagnósticos utilizados, gestação de alto e baixo risco obstétrico e locais de coleta..	48
TABELA 7	Resultados de colonização pelo EGB, conforme gestação de alto e baixo risco obstétrico, diferentes métodos diagnósticos e locais anatômicos de coleta.....	49
TABELA 8	Análise de antecedentes pessoais com a colonização pelo EGB.....	50
TABELA 9	Análise das variáveis de intercorrências clínico-obstétricas e passado obstétrico com a colonização pelo EGB.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
δ	Gama
=	Igual a
>	Maior que
<	Menor que
° C	Graus Celsius
μ	Micro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
10 X	Concentração estoque
1X	Concentração diluída (1:10)
A	Adenina
AAN	Amplificação de ácidos nucleicos
AAP	American Academy of Pediatrics
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
AM	Amazonas
ATR	Proteína Transportadora de Glutamina
BHI	Brain Heart Infusion
C	Citosina
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de nível superior
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm^2	Centímetro ao quadrado
CO_2	Dióxido de carbono
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Conjunto de desoxirribonucleosídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGB	<i>Streptococcus β-hemolítico</i> do grupo B de Lancefield
EUA	Estados Unidos da América do Norte
G	Guanina
g	Gramma
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
h	Hora

ITU	Infecção do Trato Urinário
Iv	Intravenosa
KCl	Cloreto de Potássio
LBS/ILMD/FIOCRUZ	Laboratório de Biodiversidade em Saúde do Instituto Leônidas e Maria Deane da Fundação Oswaldo Cruz
M	Molar
MA	Maranhão
MS	Ministério da Saúde do Brasil
mA	MiliAmpêres
mg	Miligrama
min.	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NAAT	Teste de Amplificação de ácidos nucleicos
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PROAP	Programa de Apoio a Pós-Graduação
q.s.p	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotura prematura das membranas
rpm	Rotações por minuto
<i>rpoB</i>	Gene codificante da subunidade β da RNA polimerase
SDS	Sulfato dodecil de Sódio
SP	São Paulo
T	Timina
<i>Taq</i>	<i>Termus aquaticus</i> – polimerase termo estável
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tris-EDTA
THB	Todd Hewitt Broth
TP	Trabalho de parto
TPP	Trabalho de parto prematuro
UI	Unidades Internacionais
UV	Ultra-Violeta
xg	Unidade de rotação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 O Estreptococo	15
2.2 A repercussão do EGB na gestação	16
2.3 Fatores de risco para a colonização do EGB	20
2.4 Protocolos de profilaxia da infecção pelo EGB	20
2.5 O diagnóstico Laboratorial do EGB	24
2.6 A prevenção da doença estreptocócica neonatal no Brasil	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 Geral	28
3.2 Específico	28
4. METODOLOGIA	29
4.1 Modelo de Estudo	29
4.2 Universo de Estudo	29
4.2.1 População de Estudo	29
4.2.2 Casuística, Participantes e Critérios de Elegibilidade.....	29
4.3 Informações Éticas e de Financiamento	30
4.4 Fluxo de Procedimentos	31
4.5 Detalhes dos Procedimentos	32
4.5.1 Coleta de Informações	32
4.5.2 Exame Clínico/Obstétrico e Coleta das amostras clínicas	32
4.5.3 Análises Laboratoriais	33
4.5.3.1 Procedimentos Bacteriológicos	34
4.5.3.2 Procedimentos Moleculares	36
4.6 Análise dos Resultados	38
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICES	63

1. INTRODUÇÃO

O *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus β -hemolítico* do grupo B de Lancefield, denominado rotineiramente de EGB, é um diplococo Gram-positivo presente no trato gastrointestinal e geniturinário humano, que quando acomete a grávida compromete a evolução da gestação. É responsável pela ocorrência de abortamento, infecção urinária, prematuridade, corioamnionite, endometrite puerperal e sepse neonatal precoce com uma alta mortalidade, principalmente entre prematuros (SCHRAG et al., 2002).

Somente a partir de 1970, quando houve um aumento importante da incidência de sepse e meningite por EGB em neonatos nos Estados Unidos da América do Norte (EUA), foi dada a devida importância ao agente (SCHRAG et al., 2002). Segundo Gibbs et al. (2004), a doença perinatal causada por EGB é um dos problemas emergentes no atendimento da gestante e recém-nascido em todo mundo. Nas últimas três décadas muitos estudos têm sido publicados acerca da infecção neonatal de início precoce pelo EGB, tendo em vista sua alta morbidade e mortalidade.

Nos EUA, a incidência da sepse esteve estável durante o período de 1996 a 2001 (0,47 casos/1.000 nascidos vivos), queda em 2003 (0,32 casos/1.000 nascidos vivos) e pouca alteração em 2004, pois a taxa foi de 0,34 casos/1.000 nascidos vivos (CDC, 2005). Atualmente a incidência entre 0,34 e 0,37 casos/1.000 nascidos vivos está associada às medidas profiláticas instituídas (CDC, 2010).

Tendo por base as estatísticas de mortalidade perinatal, o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), em 1996, elaborou um protocolo de rotina para a prevenção de infecção precoce do neonato. Nesse, recomendou a quimioprofilaxia nos casos positivos para os fatores de riscos, como tempo de ruptura de membrana amniótica maior ou igual há 18

horas, temperatura axilar igual ou superior a 38°C durante o trabalho de parto e/ou prematuridade (CDC, 1996).

Em 2002 houve uma atualização do protocolo enfatizando a maior eficácia da pesquisa da colonização materna pelo EGB, mediante o cultivo das secreções vaginal e anorretal, em meio seletivo, colhidas entre a 35^a e a 37^a semanas de gestação, quando comparado ao protocolo dos fatores de risco. Foi recomendada a pesquisa universal em todas as gestantes entre a 35^a e 37^a semana de gestação e o uso da quimioprofilaxia. Essas recomendações foram estendidas às gestantes que apresentaram bacteriúria durante a gravidez ou que tiveram um filho com doença infecciosa precoce, ambas ocasionadas por EGB (CDC, 2002).

Em 2010 a nova atualização do protocolo, manteve as orientações anteriores e ampliou os algoritmos para: atendimento às gestantes com quadro de ameaça de trabalho de parto prematuro; trabalho de parto prematuro; e portadoras de rotura prematura das membranas (CDC, 2010). Também foi atualizado o ajuste de doses da penicilina G na quimioprofilaxia e as opções de antibióticos para as gestantes alérgicas à penicilina. Na abordagem laboratorial foi incluído o teste de amplificação e caracterização de ácidos nucleicos por reação em cadeia da polimerase (PCR).

A taxa de colonização materna, a incidência de complicações perinatais causadas pelo EGB, a inquestionável eficácia da intervenção e a escassez de trabalhos nacionais que fundamente as diretrizes do CDC dentro da realidade brasileira, conforme disposto por Castellano-Filho et al. (2008), justificam a realização de estudos que possam gerar e ampliar conhecimentos.

Preferencialmente, os estudos devem ser executados em todos os estados da federação brasileira, visando estabelecer as peculiaridades e realidade de cada estado. Neste sentido, pretende-se aplicar o protocolo estabelecido pelo CDC e verificar as adaptações que ao mesmo devem ser incorporadas para uma eficaz determinação da ocorrência da sepse neonatal precoce secundária ao EGB na cidade de Manaus.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Estreptococo

Entre os microrganismos que fazem parte da microbiota humana normal se destacam os estreptococos. Tal fato advém de que alguns deles são responsáveis por uma variedade de manifestações clínicas sendo, portanto, considerados como importantes agentes infecciosos.

Segundo Breed (1927), em 1874, Billroth utilizou pela primeira vez o termo *Streptococcus* para descrever um microrganismo esférico, isolado, aos pares ou em pequenas cadeias, encontrado em feridas supuradas. Posteriormente, segundo Köhler; Köhler (2004), Nocard e Mollereau em 1887 correlacionaram a presença do microrganismo com a mastite puerperal bovina, infecção comum em vacas leiteiras e que acarretavam a inibição da lactação, surgindo então à denominação de *Streptococcus agalactiae*.

Shottmuller et al. (1903) promoveram um grande avanço na diferenciação das espécies de *Streptococcus*, utilizando os padrões de hemólise (α , β , γ) produzidos em meio de cultivo de agar sangue. Em 1933, Rebeca Lancefield (LANCEFIELD, 1933) desenvolveu a classificação sorológica dos estreptococos, utilizada até o presente momento. Com base na composição variável de um polissacarídeo da parede celular, denominado de carboidrato C, a autora dividiu os estreptococos em 20 grupos, designados pelas letras maiúsculas do alfabeto (A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U e V). Esse método de agrupamento é amplamente aceito para os estreptococos β -hemolíticos, pois com raras exceções não tem boa utilidade para os não- β -hemolíticos (CDC, 2004).

Segundo Facklan (2002), Sherman em 1937, com base no disposto por Shottmuller et al. (1903) e Lancefield (1933), estabeleceu uma nova classificação para as diferentes espécies de *Streptococcus*, dividindo-os em 4 grupos: piogênicos, viridans, láticos e enterococos, sendo

que o *Streptococcus agalactiae* foi incluído no grupo dos piogênicos.

Fundamentado na propriedade hemolítica do tipo β e nas características sorológicas do grupo B, o *Streptococcus agalactiae* passou a ser rotineiramente denominado de Estreptococo do Grupo B (EGB). O isolamento do microrganismo, em 1935, como patógeno responsável em três casos fatais de sepse puerperal deu início aos estudos que consideram o EGB como responsável por infecções em humanos (FRY, 1938).

O EGB é encontrado colonizando o trato gastrointestinal, genital e urinário de forma transitória, crônica ou intermitente. Sua importância no ciclo grávido-puerperal é que pode determinar quadros infecciosos graves nos recém natos como septicemia, pneumonia e menos frequentemente, meningite. A importância da detecção em espécimes clínicos tem relação com o diagnóstico e a terapêutica adequada, e a doença é mais comum que outras bem mais conhecidas como rubéola, sífilis e espinha bífida (SCHRAG et al., 2002).

Atualmente o EGB é dividido em seis tipos sorológicos: Ia, Ib, Ia/c, II, III, e IV, e essa tipagem oferece dados sobre a epidemiologia das infecções e a associação de certos tipos com as diferentes síndromes clínicas (CDC, 2004a).

2.2 A repercussão do EGB na gestação

A importância do EGB na perinatologia foi evidenciada quando na década de 70 foi identificado como o principal agente causador da sepse neonatal precoce, sendo responsabilizado por cerca de 7.500 casos/ano nas décadas de 80 e 90 (CDC, 1996).

Nos EUA, em 1990 ocorreram 7.600 casos de septicemia neonatal devido ao EGB com 310 mortes, revelando uma incidência de 1,8 casos/1.000 nascidos vivos entre recém-natos com até 90 dias de vida. Destes, 80% apresentaram a septicemia neonatal precoce (CDC, 1996).

Schuchat et al. (2000) em um trabalho multicêntrico com 52.406 nascimentos, identificaram a septicemia neonatal precoce em uma taxa de 3,5 casos/1.000 nascidos vivos,

sendo 1,4 casos/1.000 nascidos vivos devidos ao EGB, com 16% de evolução para óbito. O EGB foi o agente mais prevalente, sendo identificado em mais de 40% dos casos. Fatores de risco obstétrico como parto pré-termo, febre intraparto ou rotura das membranas amnióticas foram encontrados em 49% dos casos relacionados ao EGB. A colonização pelo EGB é estimada mundialmente entre 4% e 30% (DILLON et al., 1982; BAKER; EDWARDS, 1990; HICKMAN et al., 1999; MOYO et al., 2000).

Alguns estudos brasileiros revelam que o EGB também é um dos organismos mais frequentemente isolado em infecções neonatais precoces (MIURA; MARTIN, 2001; VACIOTO et al., 2002; BERALDO et al., 2004, POGERE et al., 2005; PINHEIRO et al., 2007; NOMURA et al., 2009).

A presença do EGB no trato geniturinário materno é responsável pela ocorrência de infecções maternas do tipo cistite, pielonefrite, endocardite, endometrite, celulite e sepse materna. Compromete a evolução da gestação favorecendo a ocorrência de abortamento, corioamnionite, ruptura prematura das membranas, parto prematuro e morte fetal intrauterina. Na fase puerperal, o EGB é responsável por quadros infecciosos perinatais, entre eles a endometrite, infecção do trato urinário e menos frequentemente, artrite séptica e pneumonia (SCHRAG et al., 2000).

Segundo o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), a taxa de colonização do EGB, nos EUA, em neonatos de gestantes colonizadas é de 50%, independente da via de parto e entre estes, 2% se tornam infectados (CDC, 2002).

Durante os anos 70, cerca de 50% dos neonatos infectados pelo EGB evoluíam para o óbito, porém com a melhora no atendimento pré-natal com a adoção de medidas preventivas recomendadas pelo CDC, o percentual reduziu para cerca de 4% (CDC, 2010).

A sepse neonatal é um dos principais problemas de saúde em todo o mundo. Pode ser classificada de acordo com o tempo de início da doença em sepse de início precoce, quando se instala nos primeiros sete dias de vida (ocasionada pelo EGB), e de início tardio quando se instala após o 8^o dia de vida (ocasionada por outros microrganismos).

Quando a sepse é de início precoce, acarreta um quadro infeccioso severo e usualmente se apresenta como sepse ou pneumonia, instabilidade cardiovascular e menos frequentemente como meningite e, caracteristicamente, apresenta evolução clínica desfavorável. No geral, é ocasionada pela transmissão vertical (mãe/feto) do EGB, seja pela via ascendente (através do canal de parto) ou pela via transplacentária (bacteremia materna), apresentando alto grau de morbidade e mortalidade, sendo os neonatos prematuros os que apresentam maior risco de infecção. A grande maioria tem início nas primeiras 24h de vida, progredindo rapidamente e acometendo vários órgãos (CDC, 2002).

O quadro clínico da sepse neonatal é inespecífico podendo manifestar-se com a queda do estado geral, hipo ou hipertermia, hiperglicemia, apneia com graus variados de insuficiência respiratória e choque, necessitando de internações prolongadas e terapia de suporte de alto custo (GIBBS et al., 2004). Uma ilustração do quadro clínico de sepse neonatal está apresentada na Figura 1.



Figura 1. Recém-nato acometido por sepse neonatal ocasionada por Estreptococo do grupo B.
Autor: Dr. Carol Baker, Baylor College of Medicine, Houston, Texas.

Os neonatos que sobrevivem podem apresentar sequelas importantes como perda da audição, visão e retardo mental (CDC, 1996). Segundo Afroza (2006), a cada ano cerca de 30 milhões de recém-nascidos são acometidos e de 1 a 2 milhões destes morrem.

Estudos epidemiológicos realizados nos anos 80 revelaram que os neonatos de gestantes colonizadas pelo EGB tinham 29 vezes mais chance de apresentarem a sepse neonatal precoce, quando comparados com os de gestantes com cultivos negativos para o EGB (BOYER; GOTOFF, 1986).

No período de 2000 a 2006 ocorreram nos EUA, 1.199 casos de sepse neonatal precoce. Nos anos de 2000 a 2003 houve uma diminuição da incidência da doença decrescendo de 0,52 para 0,31 casos/1.000 nascidos vivos. Entretanto, no período de 2003 a 2006 ocorreu um aumento da incidência para 0,40 casos/1.000 nascidos vivos e, atualmente, a taxa está prevista entre 0,34 a 0,37 casos/1.000 nascidos vivos (CDC, 2010).

Quando os casos são estratificados por raça, evidencia-se um aumento significativo da sepse neonatal entre recém-natos de mães de cor negra (de 0,53 para 0,86 casos/1.000 nascidos vivos), enquanto que o aumento entre os recém-natos de mães brancas não é significativo (CDC, 2009).

Em relação à idade gestacional tem-se que a média da incidência da doença foi 2,8 vezes maior entre recém natos pré termo de mães de cor negra (1,79 casos/1.000 nascidos vivos) quando comparados com recém natos de mães brancas (0,67 casos/1.000 nascidos vivos), porém com aumento da incidência em ambos os grupos. Entre os recém-natos a termo houve um importante aumento da incidência entre os de mães negras no período de 2003 a 2006, elevando-se de 0,33 para 0,70 casos/1.000 nascidos vivos (CDC, 2009)

Em 2006 foram diagnosticados 179 casos de sepse neonatal precoce sendo a taxa de caso-fatalidade de 7%. Desses, 28% dos casos ocorreram em recém-natos pré-termo com menos de 37 semanas (CDC, 2009). Atualmente esta taxa encontra-se entre 4% e 6% refletindo os avanços na assistência pré-natal (CDC, 2010).

2.3 Fatores de risco para a colonização do EGB

Dos fatores de risco anteriormente relatados, a presença do EGB colonizando o trato genital e/ou anorretal materno no momento do parto é o mais importante (CDC, 2010). Tal afirmativa advém de Boyer; Gotoff (1985), que demonstraram, em trabalho prospectivo realizado nos anos 80, que gestantes colonizadas pelo EGB tinham 25 vezes mais chance de dar a luz a um recém-nato colonizado pelo EGB do que aquelas com cultivo negativo.

Outras condições de risco que favorecem a ocorrência da sepse neonatal precoce são a presença de ruptura prematura das membranas por mais de 18h, parto prematuro (<37 semanas), febre materna (> 38° C) durante o trabalho de parto, bacteriúria por EGB durante a gestação e neonato anterior acometido da sepse neonatal precoce pelo EGB (CDC, 2002).

Cerca de 29% dos casos de sepse neonatal precoce que tem como o agente causal o EGB, ocorrem em recém-natos prematuros (< 37 semanas). O risco relativo da ocorrência da sepse neonatal precoce é inversamente proporcional a idade gestacional variando de 1,5 a 4,8 (CDC, 2005).

Segundo Pinheiro et al. (2007), em trabalho realizado em uma maternidade da cidade de Manaus/AM, a sepse neonatal precoce esteve presente em 5,3% dos casos estudados. Nesses, os principais fatores de risco foram a prematuridade, seguido da ausência de seguimento pré-natal e neonato de baixo peso. Infelizmente o autor não identificou os sorotipos e nem se as gravidezes eram de baixo ou alto risco.

2.4 Protocolos de profilaxia da infecção pelo EGB

Na década de 70, o EGB emergiu nos Estados Unidos da América do Norte como o principal patógeno causador de sepse e meningite nos primeiros dias de vida de recém-natos com índices de mortalidade de 50%. No início dos anos 80 houve a demonstração de que a

administração de antibióticos, durante o trabalho de parto nas parturientes que apresentavam riscos de transmissão vertical do EGB, poderia prevenir a ocorrência da sepse neonatal precoce (BOYER; GOTOFF, 1986).

Em 1996, o CDC juntamente com o American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) e a American Academy of Pediatrics (AAP), instituíram uma estratégia de prevenção da ocorrência da infecção pelo EGB. Essa teve por base a administração de antibiótico profilático intraparto nas parturientes que apresentavam fatores de risco para a colonização do EGB (CDC, 1996).

A referida estratégia era amparada em dois métodos de prevenção: um considerava os fatores de risco, e o outro a realização de cultivo do EGB a partir das secreções vaginal e anorretal da gestante. A estratégia dos fatores de risco era considerada positiva quando um dos fatores estivesse presentes: parto prematuro (< 37 semanas), temperatura axilar $\geq 38^{\circ}$ C ou a presença de rotura prematura das membranas por mais de 18 h. A estratégia de cultivo do EGB recomendava a realização de cultivo para o EGB em todas as gestantes entre 35 e 37 semanas de gestação, com coleta de material vaginal e anorretal. Para as gestantes que apresentassem cultivo positivo deveria ser oferecida a administração de antibiótico profilático durante o trabalho de parto.

A profilaxia deve ter início na fase ativa do trabalho de parto e continuar até a ligadura do cordão umbilical. O antibiótico de escolha é a penicilina G na dose de ataque de 5.000.000 unidades internacionais (UI) por via intravenosa (iv) e mantendo-se 2.500.000 UI/iv a cada 4 horas. A ampicilina é aceita como alternativa, nas doses de ataque de 2g/iv e 1g/iv a cada 4 horas de manutenção. No caso de gestantes com história de alergia à penicilina e baixo risco para reação anafilática, está autorizado o uso da cefazolina na dose de ataque de 2g/iv e 1g/iv a cada 8 horas como manutenção (CDC, 2002). Nos casos de cepas resistentes a penicilina deve-se utilizar a clindamicina na dose de 900 mg a cada 8 horas (SCHRAG et al., 2002). Nos

casos de resistência à clindamicina e nas gestantes alérgicas à penicilina e com elevado risco de anafilaxia, a terapêutica indicada é a vancomicina na dose de 1g/iv a cada 12 horas. Esta deve ser utilizada com critério tendo em vista a crescente resistência do EGB a este agente (CDC, 2002).

A estratégia também previa que, independente de fatores de risco presentes ou do resultado do cultivo, as gestantes que apresentassem infecção do trato urinário pelo EGB na gestação atual e aquelas que deram a luz à recém-natos com passado de sepse neonatal precoce deveriam receber profilaxia antibiótica durante o trabalho de parto. Além disso, nas gestantes com previsão de cesárea eletiva (ausência de trabalho de parto instalado) e nas em trabalho de parto com antecedente de cultivo negativo para EGB há menos de cinco semanas do início do trabalho de parto, não deve ser indicada a profilaxia anteparto.

Embora no futuro as vacinas possam se constituir como uma alternativa à antibióticoterapia, a quimioprofilaxia intraparto continua sendo o método mais eficaz na prevenção da infecção neonatal precoce pelo EGB (CDC, 2002). Entretanto, vale ressaltar que o uso da vacina irá acarretar novas preocupações como duração, distribuição e implementação nas populações e uma contínua monitoração das alterações dos sorotipos na população (CDC, 2002). Essas afirmativas ainda permanecem na revisão executada em 2010 (CDC, 2010)

Schrag et al. (2002) em um estudo retrospectivo de coorte analisou 629.912 nascimentos ocorridos durante os anos de 1998 e 1999, tanto pela estratégia de fatores de risco como pela do cultivo do EGB. Evidenciou que 62% dos recém-natos que foram acometidos pela infecção estreptocócica eram filhos de gestantes que não apresentaram qualquer fator de risco para transmissão da doença. Concluiu que o rastreamento com base no cultivo universal para o EGB é 50% mais eficaz que a estratégia focada nos fatores de risco.

Assim, em 2002, o CDC revisou as diretrizes publicadas em 1996 (CDC, 1996, 2002). Nessa revisão destacou a importância da realização do cultivo de amostras vaginal e anorretal

durante o pré-natal, como forma mais eficaz de rastrear a colonização do EGB em gestantes.

Em 2010 o CDC realizou uma nova revisão do protocolo, atualizando as condutas já preconizadas (CDC, 2010). Modificou os algoritmos que tratam da assistência a gestante com ameaça de trabalho de parto prematuro, parto prematuro instalado (< 37 semanas) e as que apresentam rotura prematura das membranas. Entre as alterações se destacam:

- a) Em gestantes admitidas com suspeita de trabalho de parto prematuro (idade gestacional < 37 semanas) deve-se proceder a coleta de material vaginal e anorretal para cultivo do EGB e iniciar de imediato a profilaxia antibiótica. Nos casos em que houver a confirmação do diagnóstico de trabalho de parto prematuro (TPP) e o cultivo mostrar-se positivo para o EGB, o antibiótico deve ser mantido até o parto. Naquelas em que o diagnóstico de TPP não foi confirmado e o cultivo foi positivo, deve-se administrar a profilaxia antibiótica quando em trabalho de parto, porém se o cultivo mostrou-se negativo a profilaxia antibiótica deve ser descontinuada. Entretanto, se a gestante alcançar a 35^a – 37^a semana de gestação, deve-se repetir o cultivo vaginal e anorretal e seguir o protocolo.
- b) Em gestantes que apresentarem rotura prematura das membranas (RPM) estando em trabalho de parto, deve-se coletar material vaginal e anorretal para cultivo e iniciar a profilaxia antibiótica. Naquelas em que a RPM ocorreu e não evoluiu para o trabalho de parto (TP) deve-se continuar a profilaxia antibiótica e de posse do resultado do cultivo tomar as seguintes condutas: se positivo ou sem resultado até o início do TP, continuar com o antibiótico até o parto; se negativo, interromper o antibiótico e repetir o exame de cultivo se chegar até 35^a – 37^a semana de gestação.

Na revisão de 2010, o CDC também incluiu a realização do Teste de Amplificação de ácidos nucleicos (NAAT – nucleic acid amplification tests), utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como técnica laboratorial para a pesquisa do EGB (CDC, 2010).

2.5 O diagnóstico Laboratorial do EGB

Conforme explanado anteriormente, no diagnóstico de infecção estreptocócica do recém-nascido o rastreamento do EGB por cultivo é 50% mais eficaz que a estratégia focada nos fatores de risco (SCHRAG et al., 2002). Para execução se faz necessário que a coleta da amostra clínica por swab seja realizada no momento da consulta de pré-natal, da região vaginal e anorretal, sem a colocação do espécuro e sem a realização de assepsia prévia (CDC, 1996).

Os procedimentos de encaminhamento das amostras clínicas evoluíram no decorrer dos anos. Inicialmente o swab da amostra clínica era encaminhado diretamente para o laboratório, onde então era atritado sobre o meio de cultivo Agar-sangue contido em placas de Petri. Entretanto, quando não se tem acesso imediato ao laboratório deve-se utilizar meio de transporte, atualmente o de Stuart ou de Amies (CDC, 2010). Assim, os swabs das amostras vaginal e anorretal devem ser imediatamente imersos no meio de transporte e acondicionados em geladeira até o momento do transporte ao Laboratório que executará o cultivo.

O processamento de cultivo da amostra deve ocorrer no período máximo de quatro dias após a coleta (STONER et al., 2004). No decorrer dos anos, os meios de cultivo utilizados no isolamento do EGB tiveram raras alterações. Efetivamente, a introdução da semeadura da amostra clínica em caldo enriquecido de Todd-Hewit por 6 horas, acrescido de dois antibióticos aos quais todas as cepas de EGB são resistentes (gentamicina e ácido nalidíxico) tem proporcionado uma melhora no isolamento do EGB em 50%. Tal fato se deve a eliminação de outras bactérias indesejáveis, visto que o caldo de Todd-Hewit com a adição dos antibióticos passa a ser um meio seletivo (CDC, 2002).

As técnicas de identificação taxonômica das colônias microbianas isoladas não tiveram alterações nos últimos 20 anos e a sorotipagem, para definição do tipo sorológico,

passou a ser efetuada por teste comercial de aglutinação positiva em látex, conforme disposto por Johnson e Ferrieri (apud CAMPBELL et al., 2000). Essa definição oferece dados sobre a epidemiologia das infecções e a associação de certos tipos com as diferentes síndromes clínicas (CDC, 2004).

A inclusão recente do teste de Amplificação de Ácidos Nucléicos, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), nas técnicas laboratoriais de pesquisa do EGB é uma novidade ainda em estudo (CDC, 2010). Os dados existentes ainda são escassos e obtidos por diferentes técnicas e genes microbianos pesquisados. Entretanto, indicam que quando o NAAT é realizado diretamente da amostra coletada tem percentuais de positividade entre 62,5% e 98,5% (AZIZ et al., 2005; ATKINS et al., 2006; GAVINO; WANG, 2007; EDWARDS et al., 2008, EL HELALI et al., 2009, ALFA et al., 2010). Quando executado a partir de alíquota de caldos enriquecidos, os percentuais de positividade variam de 92,5% a 100% (GOODRICH; MILLER, 2007; BLOCK et al., 2008; SCICCHITANO; BOURBEAU, 2009).

Resumidamente, no diagnóstico atual de EGB deve-se: coletar as amostras clínicas vaginal e anorretal pelo uso de swabs; imergir imediatamente os swabs no meio de transporte acondicionando-os em geladeira até o momento de envio ao Laboratório que executará o cultivo; retirar os swabs do meio de transporte e imergi-los em caldo de enriquecimento de Todd-Hewit, adicionado de antibióticos; semear alíquotas do caldo em placas de Petri contendo Agar-sangue; identificar e sorotipar as colônias compatíveis com o EGB; e quando possível, efetuar o teste de Amplificação de Ácidos Nucléicos, seja a partir das colônias microbianas isoladas ou de alíquotas do caldo de enriquecimento/seletivo da amostra clínica (CDC, 2010).

Atualmente, a reação em cadeia da polimerase vem sendo executada por método PCR/Real time e tem sido frequentemente utilizada na área da investigação biológica por sua capacidade de amplificar e detectar, simultaneamente, quantidades diminutas de sequências

específicas de ácidos nucléicos. Também é utilizada na avaliação da carga viral ou bacteriana, identificação da resistência a antibióticos e na determinação do prognóstico de tumores malignos (NASCIMENTO et al., 2010).

A PCR real-time propicia inúmeras vantagens quando utilizada como ferramenta de pesquisa e diagnóstico, entre elas a redução do risco de contaminação cruzada, o alto grau de sensibilidade e especificidade, o curto período de tempo necessário para a realização do método, e conseqüentemente maior rapidez na liberação dos resultados (BERGERON et al., 2000).

2.6 A prevenção da doença estreptocócica neonatal no Brasil

O Ministério da Saúde (MS) do Brasil reconhece como grave a mortalidade infantil em nosso meio. A taxa de mortalidade infantil que reflete a morte de crianças com menos de um ano de idade, é de 19,3 mortes para cada 1.000 nascidos vivos, posicionando o Brasil em 16º lugar em um grupo de 68 países (MS, 2010).

Entre os anos de 2000 e 2007, 443.946 crianças menores de um ano de idade morreram em nosso país. No nordeste foram 144.003 e na Amazônia legal (incluindo o Maranhão) 76.916. O somatório das duas regiões foi de 220.919, representando aproximadamente 50% do total nacional (MS, 2010).

Cerca de 70% das mortes de recém-nascidos foram secundárias a causas evitáveis, tais como: falta de atenção adequada à mulher durante a gestação, parto e puerpério; falta de conhecimentos; nível sócio econômico; condições sanitárias; acesso aos serviços de saúde; entre outros.

Infelizmente na rede básica de saúde não se dispõe de estratégias para o rastreamento do EGB em gestantes brasileiras. Constata-se que no mais recente Manual Técnico de Pré Natal e Puerpério – Atenção Qualificada e Humanizada do Ministério da Saúde – inexistem

protocolo direcionado a detecção, prevenção e tratamento da infecção neonatal pelo EGB (BRASIL, 2006).

Visto que talvez a pouca atenção dada pelos órgãos responsáveis seja devida à escassez de estudos nacionais, que possam sustentar a composição de diretrizes na assistência as portadoras do EGB, faz-se necessário à realização de pesquisas sobre o tema.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a colonização por *Streptococo* do grupo B (EGB) em gestantes que utilizam o serviço de pré-natal da Maternidade Estadual Balbina Mestrinho, Manaus/AM, unidade de atendimento a grávidas de baixo risco obstétrico e de referência para alto risco obstétrico.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Determinar a taxa de colonização por EGB em gestantes atendidas em serviço de pré-natal de maternidade pública com atendimento a grávidas de baixo risco obstétrico e de referência para alto risco obstétrico;
- 3.2.2 Estabelecer a sensibilidade e a especificidade da técnica de PCR tendo a cultura como padrão ouro na identificação do EGB;
- 3.2.3 Verificar a taxas de colonização pelo EGB proporcionadas pelos métodos diagnósticos utilizados (Cultivo e PCR) em relação aos diferentes locais de coleta - vaginal e retal;
- 3.2.4 Verificar se existe diferença entre grávidas com alto e baixo risco obstétrico na ocorrência da colonização vaginal e retal por EGB pelas técnicas de cultivo e PCR;
- 3.2.5 Analisar se existe relação entre antecedentes pessoais, intercorrências clínico-obstétricas e passado obstétrico com a presença de EGB.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo prospectivo e transversal do tipo detecção de casos, com o intuito de avaliar a ocorrência de colonização por *Estreptococos* do grupo B (EGB) em gestantes atendidas na maternidade Balbina Mestrinho, Manaus/AM, unidade de atendimento as grávidas de baixo risco obstétrico e de referência para alto risco obstétrico.

4.2 Universo de Estudo

4.2.1 População de Estudo

A população de estudo abrangeu as gestantes atendidas no ambulatório de pré-natal da Maternidade Estadual Balbina Mestrinho. No referido ambulatório são atendidas gestantes de baixo e alto risco obstétrico, sendo que as de alto risco são portadoras de patologias como: Diabetes, Hipertensão Arterial, Colagenoses, Púrpuras, Aids e soropositivas para HIV (vírus da imunodeficiência adquirida), entre outras.

4.2.2 Casuística, Participantes e Critérios de Elegibilidade

O estudo desenvolveu-se no período de abril a novembro de 2012 (oito meses), buscando obter a casuística estimada de 177 casos. Essa foi definida pela fórmula de população finita utilizando os parâmetros de prevalência mínima de 14% encontrada em

outras regiões do Brasil (BERALDO et al.,2004), nível de confiança de 95% e uma precisão de 4%. Entretanto, modificações estruturais no serviço de atendimento da instituição, com a diminuição do número de médicos obstetras e reformas ambulatoriais, só permitiram a participação de 153 pacientes.

Participaram do estudo as gestantes que se encontravam entre a 35^a e 37^a semana de gestação confirmada pela ultrassonografia e/ou pela data da última menstruação. No início da consulta, a gestante foi indagada se estava em uso de antibiótico nos últimos sete dias e/ou se realizou exame ginecológico nas 24 horas antecedentes. Na inexistência dos dois precedentes, as gestantes foram então convidadas a participarem do estudo, sendo nesse momento verbalmente informadas sobre os objetivos e finalidades da pesquisa, assim como esclarecidas quanto aos procedimentos a serem realizados. Visando a possibilidade de inibição de como a coleta seria realizada, também foi utilizado demonstrativo visual por imagem (Figura 3, pag. 33). Todas as gestantes convidadas aceitaram participar do estudo e foram incluídas mediante confirmação de assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice 1). Quando se tratou de uma menor de idade, a assinatura foi fornecida pelos seus responsáveis legais.

4.3 Informações Éticas e de Financiamento

Na análise crítica de benefícios e riscos da pesquisa para a saúde do homem e para a sociedade, faz-se necessário informar que o diagnóstico de colonização pelo EGB não é previsto ou executado na rede básica pública de saúde. Assim sendo, a realização do estudo teve a intenção de proporcionar benefício para as gestantes e seus neonatos, seja por realizar uma ação de prevenção da sepse neonatal, seja por prevenir as consequências psicológicas maternas da perda de um filho por uma patologia facilmente evitável.

Na análise de risco tem-se a informar que a coleta de secreções vaginais e anorretais, previstas no estudo, não é invasiva e não oferece qualquer risco para a gestante ou para o feto.

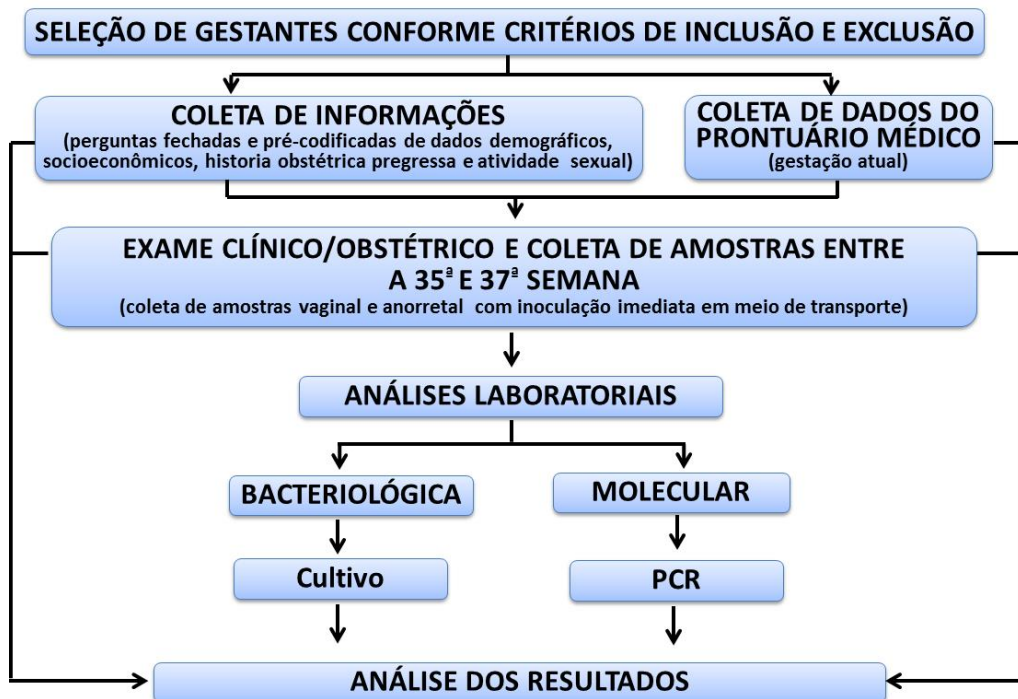
Pode no máximo proporcionar um desconforto e/ou inibição. Vale ressaltar que a única forma de obtenção das secreções para averiguação de colonização pelo EGB é a descrita no presente estudo. Assim sendo, não existem métodos alternativos para a coleta das amostras.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas sob o número CAAE 0263.0.115.115 - 11.

Quanto a financiamento específico para a realização do projeto, tem-se a informar que alguns itens de custeio foram adquiridos com recursos do Programa de Apoio a Pós-Graduação (PROAP) da Coordenação de Aperfeiçoamento de nível superior (CAPES) e outros foram disponibilizados pelo Laboratório de Biodiversidade em Saúde do Instituto Leônidas e Maria Deane da Fundação Oswaldo Cruz (LBS/ILMD/FIOCRUZ).

4.4 Fluxo de Procedimentos

Os procedimentos previstos na execução da pesquisa estão apresentados na Figura 2.



PCR= reação em cadeia da polimerase

Figura 2- Fluxo de procedimentos para investigação de colonização de gestantes por Estreptococo do grupo B (EGB).

4.5 Detalhes dos Procedimentos

4.5.1 Coleta de Informações

A coleta de informações sobre cada paciente ocorreu mediante a utilização de formulário (Apêndice 2) contendo indagações sobre os dados demográficos, socioeconômicos, história obstétrica progressiva e atividade sexual. Neste, também constaram os dados sobre a gestação atual, obtidos do prontuário médico existente no serviço da Maternidade Estadual Balbina Mestrinho.

4.5.2 Exame Clínico/Obstétrico e Coleta das amostras clínicas

Não foi introduzida qualquer modificação na rotina assistencial, exceção feita às coletas de amostras vaginal e anorretal utilizando-se swab estéril, procedimento esse considerado inócuo para a gestante e o feto. Assim, durante as consultas de pré natal no período da 35^a à 37^a semana, foi realizado o exame obstétrico usual pelo pesquisador, com acompanhamento do crescimento uterino, avaliação da estática fetal, ausculta dos batimentos cardíacos fetais e ao final, a coleta das amostras clínicas.

A coleta das amostras clínicas foram realizadas no intervalo entre a 35^a e 37^a semana de gestação, devido ao fato de terem sido as semanas com maiores índices de valores preditivos positivo e negativo encontrados por Yancey et al. (1996) e confirmado pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2010). Essas foram realizadas conforme protocolo estabelecido pelo CDC (2010), a seguir descrito:

Amostras vaginais: duas amostras foram coletadas, sucessivamente, mediante utilização de swabs estéreis. Individualmente, o swab foi introduzido no intróito vaginal até o terço distal da vagina, sem qualquer procedimento de antisepsia prévio e sem a utilização de

espécuro. Após suave movimento rotatório, cada swab foi retirado e imediatamente imerso no meio de transporte de Stuart (TEESE et al., 2003), conforme apresentado na Figura 3. Na parte externa do tubo de meio de transporte, foi registrado o nome da paciente e seu respectivo número de registro, a semana gestacional e o local correspondente a coleta realizada. Os tubos foram acondicionados em geladeira para posterior transporte ao Laboratório de Biodiversidade em Saúde, onde foram processados no período máximo de 24 horas após a coleta, conforme exposto por Rosa-Fraile et al. (2005) e recomendado pelo CDC (2010). Um dos swab foi processado pelos métodos bacteriológicos e o outro submetido a pesquisa molecular.

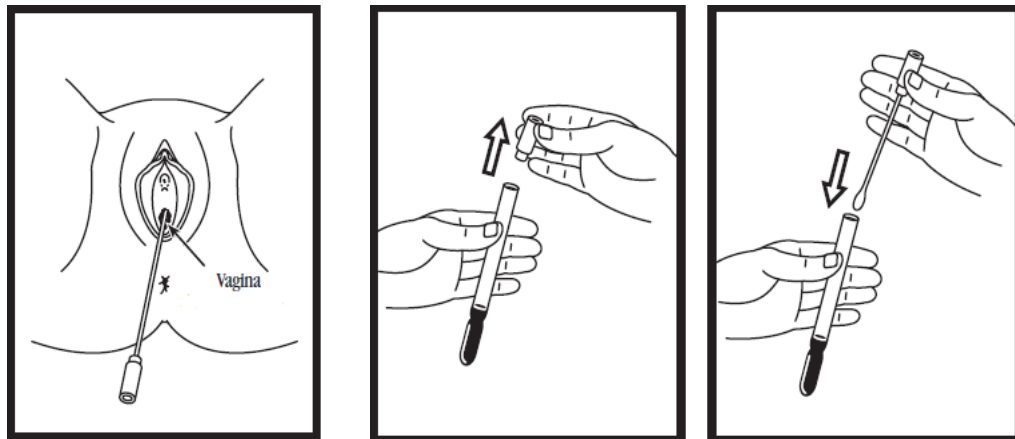


Figura 3. Coleta de amostra vaginal para isolamento de EGB
Fonte: CDC (2011)

Amostras anorretais: também foram coletadas duas amostras individuais, sendo que cada swab estéril foi introduzido no orifício anal até a parede distal do reto, sem qualquer procedimento de antissepsia prévia. Após suave movimento rotatório, foi retirado e imediatamente imerso no meio de transporte de Stuart. As demais etapas foram executadas de forma idêntica as descritas para as amostras vaginais.

4.5.3 Análises Laboratoriais

Nas análises laboratoriais foram realizados os procedimentos bacteriológicos e

moleculares. As secreções, tanto da vagina como da região anorretal, foram submetidas ao cultivo e em caso de ocorrência de isolamento do EGB, foi efetuada a identificação taxonômica das colônias bacterianas isoladas. Nos procedimentos moleculares foi realizado o Teste de Amplificação de ácidos nucleicos/PCR (NAAT – nucleic acid amplification tests). Todos os procedimentos foram executados no Laboratório de Biodiversidade em Saúde do Instituto Leônidas e Maria Deane da Fundação Oswaldo Cruz (LBS/ILMD/FIOCRUZ).

4.5.3.1 Procedimentos Bacteriológicos

Os swabs foram retirados do meio de transporte e inoculados em tubos contendo 2 ml de caldo Todd-Hewit (Difco) adicionado de gentamicina (8µg/ml) e ácido nalidíxico (15 µg/ml). Após incubação por 6 horas na temperatura de 35°C, 0,02 mL foram retirados e semeados em placas de Petri contendo meio de Agar-sangue acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C (CDC, 1996).

Após as 24 horas de incubação, as placas foram examinadas quanto à presença de colônias suspeitas de se tratarem de EGB – colônias pequenas, tamanho variando de 0,5 a 1 mm, translúcidas e apresentando alfa ou beta hemólise. Dessas, pequeno fragmento foi depositado em lâmina microscópica e corado pelo método de Gram. As colônias em cuja microscopia foram visualizados cocos isolados, em pares ou em cadeias de diferentes comprimentos, com coloração violeta escuro indicativa de serem Gram-positivo, foram repicadas para realização dos testes de identificação taxonômica.

Para a classificação taxonômica da espécie foram utilizados: teste de CAMP (WILKINSON, 1977) e as provas bioquímicas da Catalase e NaCl a 6% (KONEMEN et al.; 1997).

O Teste de CAMP foi realizado em uma placa de Petri contendo meio de Agar sangue e semeado com uma estria linear de uma cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923),

conhecida como produtora de β -lisina. Perpendicularmente à estria de *S. aureus*, foi semeada uma estria da colônia bacteriana a ser identificada, porém sem que as referidas estrias tivessem contato. A placa foi incubada em temperatura ambiente de 35/37°C, por 24 horas. Quando no teste ocorreu uma intensificação de lise das hemácias existentes no meio de cultivo, em forma de ponta de flecha e na interseção das duas estrias, teve-se a indicação da presença do fator CAMP (CAMP positivo), produzido por estreptococos do grupo B (EGB). Ilustração do teste está apresentada na Figura 4.



Figura 4. Ilustração de um resultado positivo no teste de CAMP
Fonte: ASM (2001)

Todas as amostras de EGB isoladas foram transferidas para tubos de microcentrífuga contendo caldo de Brain Heart Infusion (BHI) adicionado de glicerol (30%) e armazenadas em freezer a -20°C .

A gestante que apresentou cultivo positivo para o EGB foi imediatamente informada e, em seu prontuário médico e carteira de gestante, foram disponibilizadas as informações pertinentes às condutas a serem adotadas durante o trabalho de parto conforme protocolo do CDC.

4.5.3.2 Procedimentos Moleculares

Foram efetuadas as detecções de DNA (ácido desoxirribonucléico) pelo teste de Amplificação de ácidos nucléicos/PCR (AAN/PCR) “in house”. Além da realização do referido exame, essa atividade tem a previsão futura de também efetivar-se o sequenciamento das amostras amplificadas. As etapas realizadas estão descritas a seguir:

➤ Extração de DNA total das amostras coletadas

Após a coleta das amostras, foi adicionado 1mL de tampão TEN (Tris-HCl 100mM [pH 8,5]; EDTA 100mM; NaCl 3M), para a lavagem do swab. Em seguida foi vertido todo o conteúdo da lavagem em microtubos de 1,5mL, estéreis. As amostras foram homogeneizadas durante 2 minutos, utilizando-se um vórtex, e então foi adicionado 100µL de lisozima [20 mg/mL]. Em seguida as amostras foram incubadas por 30 min a 37°C e adicionado 120µL de SDS 10% seguido de agitação por 30 segundos. Acrescentou-se 20µL de proteinase K [10 mg/mL], e reincubou-se a 37°C por 45 minutos. A seguir foi adicionado 60µL de NaCl 3M e 150µL de Triton X-100 10%, e incubado por 10 minutos em banho-maria a 60°C. Acrescentou-se 500µL de fenol hidratado e agitou-se por inversão durante 5min. O material foi centrifugado a 3.000xg/10min à temperatura ambiente. Recuperou-se, cuidadosamente, a fase aquosa transferindo-se para microtubos novos. Adicionou-se à fase aquosa 1V de clorofórmio, sendo centrifugado a 3000xg/10min à temperatura ambiente; recuperou-se a fase aquosa transferindo para microtubos novos contendo 50µL de NaCl 3M. Retirou-se a fase aquosa para um tubo novo e acrescentou-se V/V de isopropanol a T.A. Centrifugou-se a 10.000xg durante 30 min. Lavou-se a fase aquosa com 100µL de etanol 70% gelado e realizou-se centrifugação a 10.000xg durante 30 min. Foi retirado o etanol cuidadosamente, com micropipeta e o DNA foi secado em Speed Vácuo por 10 min. à Temperatura Ambiente.

Após secagem, ressuspendeu-se o DNA em 100 μ L de TE e guardou-se a 4°C, overnight. A verificação da pureza do DNA foi realizada por espectrofotometria a 260/280 nm e a verificação da qualidade e a quantificação do DNA foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,0% - 0,5X TBE (45mM Tris-Borato, 1mM EDTA, pH 8,0). Na quantificação do DNA se utilizou um padrão de massa “Low DNA Mass Ladder” (INVITROGEN). O DNA foi armazenado a 4°C.

➤ Amplificar o gene de cada amostra

As amplificações para PCR com oligonucleotídeos iniciadores (primers) ATR (proteína transportadora de glutamina), foram realizadas num volume final de 25 μ l contendo: 1 μ l de DNA; 0,4 mM de dNTPs; 10 pM do primer ATR forward (5'-GCATTCTCTCAGCTTTGTTA-3'); 10pM do primer ATR reverse (5'-AAGAAATCTCTTGTGCGGAT-3'), 1,5 mM de MgCl₂ ; tampão 1x (200 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl); 0,5 U de TaqDNA polimerase (PROMEGA) e água Milli-Q estéril até completar o volume final. As reações foram incubadas no termociclador Eppendorf (Mastercycler®gradient), conforme o programa a seguir: desnaturação inicial por um período de 5 minutos a 94°C; trinta ciclos de incubações a 94°C por 1 minuto, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; um período final de extensão a 72°C por 10 minutos.

➤ Eletroforese horizontal dos produtos da PCR em gel de agarose

A eletroforese do DNA foi realizada em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5x (Tris-HCl 44,5mM; ácido bórico 44,5mM; EDTA 1mM). Na amostra de DNA foi adicionada de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%, EDTA 1mM), e aplicada no gel contendo 0,5 μ g/ml de brometo de etídeo. O gel foi submetido a uma voltagem de 80V em

tampão TBE 0,5x, sendo aplicados no gel 5 µL do produto de PCR de cada amostra. O DNA foi visualizado através de iluminação ultra-violeta a 512nm e fotografado em máquina digital. Os amplicons do gene ATR gerados pela PCR que possuíam um tamanho de 779 pb (ATR) foram considerados positivos para a presença do EGB na amostra.

4.6 Análise dos Resultados

As informações contidas nos formulários (Apêndice 2) e os resultados dos exames realizados foram inseridos em planilha de Excel (Microsoft Office 2010), para posterior análise estatística.

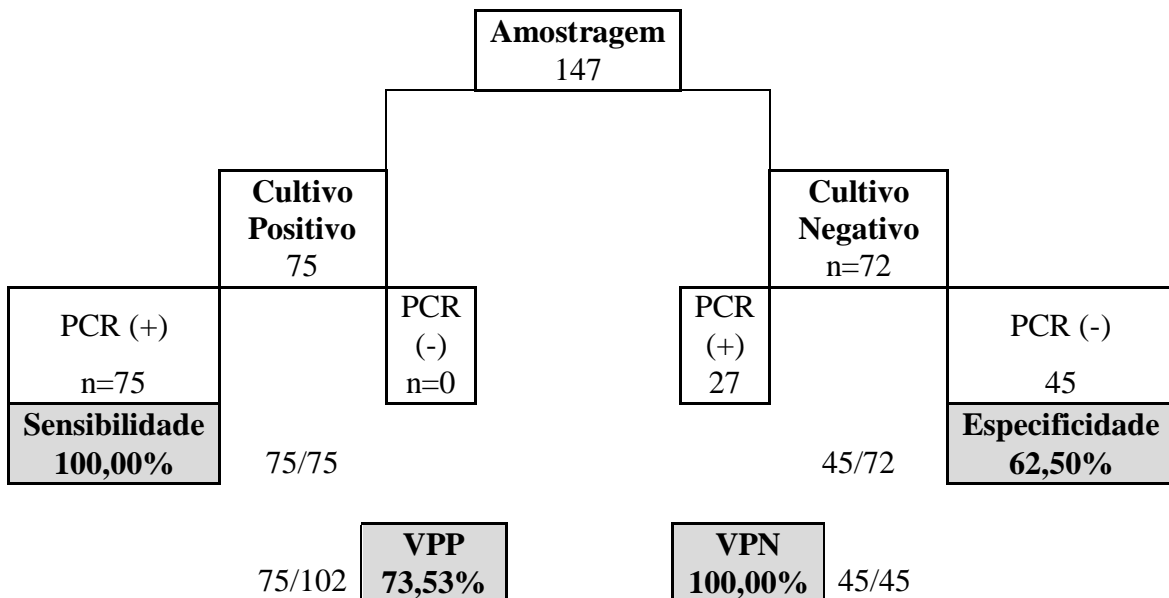
Para fins de análise dos resultados, conforme os objetivos propostos, a colonização pelo EGB foi determinada quando um ou mais dos métodos diagnósticos (cultivo ou PCR “in house”) em qualquer das amostras coletadas (vaginal e anorretal), proporcionou uma positividade para o EGB.

Para análise as variáveis foram categorizadas, calculados os percentuais de ocorrência dos eventos e a sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos, utilizando-se tabelas de contingência do tipo 2x2, assim como seus valores preditivos positivos e negativos. Também foram calculados os respectivos Intervalos de Confiança ao nível de 95% (IC95%) e na comparação das proporções o teste do Chi Quadrado (X^2) de Pearson, sendo que na impossibilidade de aplicar o teste de Pearson, aplicou-se o teste exato de Fisher.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de abril a novembro de 2012, foram rastreadas 153 gestantes para verificação de colonização por *Streptococcus β-hemolítico* do grupo B (EGB), com idade entre 14 e 46 anos, conforme os critérios de elegibilidade. Dessas, seis foram excluídas por falhas no processamento de suas amostras, resultando numa população de 147 gestantes estudadas.

Para o estudo dois métodos foram utilizados para determinar a colonização de EGB. O cultivo, considerado padrão ouro para detecção desse microrganismo, e o teste de Amplificação de Ácidos Nucléicos (NAAT), por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction). A sensibilidade e especificidade obtidas no cultivo foram relacionadas com a do PCR e os valores preditivos, positivo (VPP) e negativo (VPN), foram calculados. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.



PCR = Polymerase Chain Reaction; (+) = positivo; (-) = negativo; VPP = Valor Preditivo Positivo; VPN = Valor Preditivo Negativo.

Figura 5 – Resultados de detecção do EGB conforme a análise de acuidade e concordância com a PCR, tendo o cultivo como padrão ouro de diagnóstico.

Para melhor visualização dos dados alocados na Figura 5, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados entre o Cultivo e a PCR na detecção do EGB

PCR	CULTIVO					
	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivo	75	100,00	27	37,50	102	69,39
Negativo	0	0	45	62,50	45	30,61
Total	75	100,00	72	100,00	147	100,00

Sensibilidade: 100,00%; IC95% (99,33 – 100,00); Especificidade: 62,50%; IC95% (50,62 – 74,38); Valor preditivo (+): 73,53%; IC95% (64,48 – 82,58); Valor preditivo (-): 100,00%; IC95% (98,89 – 100,00).

Conforme os dados da Tabela 1, o método de cultivo, considerado para o presente estudo como padrão ouro, detectou a presença de EGB em 75 gestantes indicando uma taxa de colonização de 51,02%. Entretanto, o uso concomitante de cultivo e PCR elevou a taxa de colonização para 69,39%. Tais resultados tão elevados de colonização induz lembrar que a pesquisa foi realizada em maternidade pública onde a clientela é de baixa renda.

Em todos os casos em que o cultivo foi positivo teve-se PCR também positiva para EGB. Tal fato tornou o método 100% sensível. Entretanto, dentre as 72 amostras com cultivo negativo, 27 (18,37%) do total dos 147 casos estudados apresentaram PCR positiva, representando a ampliação diagnóstica fornecida pelo teste. Comparativamente ao método de cultivo determinado como padrão, a especificidade da PCR resultou em 62,50% e o resultado do VPP foi de 73,53%. Nesse sentido e atualmente, é importante destacar que nos países mais desenvolvidos uma positividade por PCR é considerado um diagnóstico de colonização pelo EGB. Tal fato é traduzido na obrigatoriedade da antibioticoprofilaxia intraparto (CDC, 2010).

Como no Brasil os estudos da ocorrência do EGB entre as gestantes são escassos, se torna difícil indicar o uso ou não do PCR como método de rastreamento de colonização de

gestantes pelo EGB. A definição se torna ainda mais complicada quando as taxas de colonização obtidas no presente trabalho foram de 51,2% e 69,39% (cultivo e PCR, respectivamente), representando um desvio bastante acentuado da média mundial situada entre 4% e 30% (DILLON et al., 1982; BAKER;EDWARDS, 1990; HICKMAN et al., 1999; MOYO et al., 2000).

Além dos fatos anteriormente expostos, a taxa de colonização de EGB detectada pelo método de cultivo no presente estudo foi bastante superior a encontrada no Brasil por autores como Beraldo et al. (2004), Pogere et al. (2005), Nomura et al. (2009), Função; Narchi (2013). Esses obtiveram taxas de 14,9%, 21,6%, 27,6% e 17,4%, respectivamente. Mediante o exposto, o presente resultado de colonização pelo EGB, detectado pelo cultivo em 51,02% das gestantes estudadas, permite concluir que existe uma questão regional bastante grave de saúde pública.

Em todos os trabalhos nacionais anteriormente citados, a técnica de cultivo foi a única metodologia utilizada para a identificação do EGB. Entretanto, na literatura analisada, encontrou-se um estudo desenvolvido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS (de-PARIS et al., 2011) onde os autores compararam as duas técnicas para identificação do EGB. Relatam uma prevalência de 15,6% pelo cultivo e 26,99% pela PCR. Essas taxas são inferiores as detectadas no presente estudo e poderiam sugerir diferenças ambientais e/ou socioculturais das regiões onde as pesquisas foram desenvolvidas. Segundo os autores a sensibilidade da PCR foi de 100%, a especificidade de 86,88%, o VPP de 59% e o VPN de 100%, valores esses que estão em de acordo com os encontrados no presente trabalho. Vale ressaltar que esse foi o único trabalho brasileiro encontrado em revista científica onde as duas metodologias foram analisadas.

Na literatura internacional o estudo de Gavino; Wang (2007), realizado em Chicago/Estados Unidos da América (EUA), determinou a taxa de colonização por cultivo no

pré-natal e fez a comparação entre o cultivo e a técnica da PCR por Real Time em amostragem intraparto. Nas atividades de pré-natal, obtiveram ocorrência do EGB em 47,3% da amostragem, dado esse semelhante ao presente estudo. Mesmo que a PCR por Real Time tenha sido comparado apenas com os resultados de cultivo realizado no intraparto, as taxas de sensibilidade e especificidade da PCR (95,8% e 64,5%, respectivamente), também foram semelhantes ao presente estudo. Os autores ressaltam que das 26 gestantes com colonização no pré-natal, seis não apresentaram esse diagnóstico durante o intraparto.

No sentido da detecção do EGB no intraparto, ressalta-se o trabalho de Straková; Motlová (2004). Os autores contataram que no universo de 285 recém-natos colonizados por EGB, 15 eram oriundos de mães com rastreamento no pré-natal negativo pelo método de cultivo. Tal fato poderia indicar que em torno de 4% da colonização materna não é detectada no pré-natal, porém esse dado não corresponde aos resultados obtidos por Gavino; Wang (2007). Conclui-se que estudos se fazem necessários para se determinar o conhecimento real das taxas de colonização do pré-natal e no momento do parto, infelizmente não realizadas durante o presente estudo.

Devido apenas o estudo de Gavino; Wang (2007) ter detectado taxas de colonização semelhantes às encontradas no presente trabalho, buscou-se identificar possíveis pontos comuns na população estudada. Constatou-se apenas que ambas as amostragens eram compostas por gestantes de baixa renda. Entretanto, os autores relatam que a amostragem utilizada tinha maior composição de afrodescendentes com indicativo de que essa população teria maior suscetibilidade à colonização pelo EGB. Esse fato tem respaldo em publicações do CDC nos anos de 2007 e 2009, tendo sido introduzido nas Diretrizes de Prevenção da Septicemia Precoce do Recém Nato pelo EGB em 2010 (CDC 2007, 2009, 2010). Mediante o exposto os resultados do presente estudo induzem concluir que a população do Estado do Amazonas apresenta susceptibilidade ao EGB, fazendo com que ações de pesquisa devam ser

efetuadas nesse sentido para verificação e definição de fator(es) indutor(es) da mesma.

Apesar de não fazer parte dos objetivos do presente trabalho, porém devido às taxas tão elevadas encontradas de colonização pelo EGB, é pertinente fazer alguns comentários sobre a questão dos custos x benefício dos testes estudados. Primeiramente não existe no Brasil um protocolo que indique a obrigatoriedade de se verificar a colonização, seja por cultivo ou PCR. Entretanto e talvez pelo conhecimento do problema, raros municípios estabeleceram a obrigatoriedade como é o caso do de alguns municípios no estado de São Paulo. Nesse sentido Nomura et al. (2009), em Campinas/SP, verificaram que a taxa de colonização era de 27,6%. Estabeleceram que o custo do material para identificação do EGB através do cultivo seria algo em torno de R\$ 9,00 (nove reais), com capacidade de detecção de 87,5%. Extrapolaram os dados para a cidade de Campinas/SP e constataram que em 2006 seriam necessários um aporte de R\$ 118.000,00 para o rastreamento das gestantes do município. Ressaltaram que não há estimativas nacionais confiáveis de gastos com os recém-nascidos infectados pelo EGB, ou mesmo de mortes por ele proporcionadas (sepse neonatal precoce) para se avaliar a grandeza da questão em termos de saúde pública.

Amaral (2005) em seus questionamentos editoriais de se rastrear ou não o EGB no Brasil, relata que no mínimo dois em cada 1.000 partos ou 1% das gestantes confirmadas com colonização pelo EGB podem ter recém-nascidos acometidos pela sepse neonatal precoce. Mas, no município de Manaus tem-se relato de taxa bem superior a colocada pela autora, como é o caso de Pinheiro et al. (2007) que analisaram fatores de risco associados com a sepse neonatal precoce em hospital terciário da cidade de Manaus. Na casuística de 302 mães e seus recém-nascidos acompanhados até sete dias após o nascimento, encontram 16 casos (5,3%) de sepse neonatal precoce, das quais 48,5% foram causadas pelo EGB. Mesclando os dados dos autores com os do presente trabalho, é indiscutível a importância de se fazer o rastreamento de EGB por cultivo e/ou PCR em gestantes amazonenses durante a assistência pré-natal, visando à diminuição da morbidade e mortalidade neonatal.

Principalmente no momento atual brasileiro, é irrefutável o impacto financeiro nas verbas para a saúde ao se incluir o rastreamento do EGB em todas as gestantes do município

de Manaus, ou mesmo do Estado do Amazonas. Além dos custos com os métodos diagnósticos, existe a necessidade de aquisições de insumos, aparelhagem e de capacitação do corpo técnico dos laboratórios da rede pública de saúde. Mas, conforme exposto por Amaral (2005) “a maior certeza é que não se pode mais alegar ignorância”.

Além da questão dos métodos laboratoriais de determinação de colonização pelo EGB, diversos estudos induziram a coleta vaginal e anorretal dos espécimes para ampliação do diagnóstico de colonização. Por isso, desde 2002, ficou estabelecido que a detecção do EGB, através do método de cultivo de material da vagina e região anorretal, se tornasse o padrão ouro de diagnóstico entre gestantes (CDC, 2010). Tal fato foi determinante na realização desse objetivo no presente trabalho e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados de colonização pelo EGB em gestantes, conforme positividade nos diferentes métodos e locais anatômicos de coleta.

Presença de EGB por Locais de coleta	Métodos Diagnósticos			
	CULTIVO		PCR	
	n	%	n	%
Só na Vagina (V)	36	48,00	16	15,69
Só Anorretal (A)	13	17,33	19	18,62
Concomitância Vagina e Anorretal (V+A)	26	34,67	67	65,68
Total	75	100,00	102	100,00

PCR = Polymerase Chain Reaction.

Segundo o CDC, observa-se um aumento de 5 a 27% de detecção do EGB quando os locais vagina e anorretal são pesquisados (CDC, 2004a). No presente estudo o aumento foi de 17,33% pelo cultivo e de 18,62% pela PCR. Por ética é importante ressaltar que os resultados positivos para EGB desse estudo, independente do método ou local de coleta, foram incluídos na ficha de atendimento pré-natal das gestantes visando que recebessem antibioticoprofilaxia intraparto.

Os resultados apresentados na Tabela 2 são concordantes com os achados de Beraldo et al. (2004) e Simões et al. (2007), que confirmaram que a dupla testagem, vaginal e anorretal, aumenta a detecção do EGB em gestantes consideradas colonizadas. Costa et al.

(2008) em trabalho realizado em uma maternidade pública da cidade de São Luis – MA constatou que se não houvesse a dupla coleta não seria diagnosticado 22% das gestantes colonizadas.

Para analisar os métodos diagnósticos em relação aos locais de coleta, tendo em consideração um ou outro local, os dados foram compilados, alocados na Tabela 3 e as análises de acuidade realizadas.

Tabela 3 – Resultados de colonização do EGB correlacionados com os locais de coleta e métodos diagnósticos.

	Locais de Coleta											
	VAGINA						ANORRETAL					
	Cultivo Pos		Cultivo Neg		Totais		Cultivo Pos		Cultivo Neg		Totais	
PCR	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Positivo	62	42,18	21	14,28	83	56,46	39	26,53	47	31,97	86	58,50
Negativo	0	0	64	43,54	64	43,54	0	0	61	41,50	61	41,50
Total	62	42,18	85	57,82	147	100,00	39	26,53	108	73,47	147	100,00

Pos= exame positivo; Neg= exame negativo; N= número absoluto; %=percentual; PCR = Polymerase Chain Reaction; Sensibilidade: 100,00%; IC95%(99,19 – 100,00); Especificidade: 75,29%; IC95%(65,54 – 85,05); Valor preditivo (+): 74,70%; IC95%(64,74 – 84,65); Valor preditivo (-): 100,00%; IC95%(99,22 – 100,00). Sensibilidade: 100,00%; IC95%(98,72 – 100,00); Especificidade: 56,48%; IC95%(46,67 – 66,29); Valor preditivo (+): 45,35%; IC95%(34,25 – 56,45); Valor preditivo (-): 100,00%; IC95%(99,18 – 100,00).

Conforme os dados apresentados na Tabela 3, constata-se uma predominância vaginal de positividade para EGB pelo cultivo, sendo 42,18% dos casos isolados na vagina contra 26,53% isolamentos anorretais, do total dos 147 casos estudados. Os resultados de sensibilidade, especificidade e de valores preditivos dos testes nos diferentes locais de coleta indicam que a PCR tem maior especificidade e valor preditivo positivo na vagina.

Também se observa na Tabela 3 que em todos os resultados com cultivo positivo a PCR forneceu também resultados positivos. Porém, dos 147 casos estudados, aparentemente em 68 tem-se cultivo negativo com PCR positiva. Tal fato é induzido nessa análise devido os casos de positividade em ambos os locais de coleta não terem sido computados separadamente. Para verificação do fato e analisando-se apenas os resultados positivos de colonização pelo EGB, os dados foram compilados e os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados com positividade de colonização pelo EGB conforme os métodos diagnósticos e locais de coleta.

Locais de Coleta	Cult P com PCR P		Cult N com PCR P		TOTAIS	
	n	%	n	%	n	%
Vagina (V)	36	48,00	2	7,41	38	37,26
Anorretal (A)	13	17,33	17	62,96	30	29,41
V + A	26	34,67	8	29,63	34	33,33
Total	75	100,00	27	100,00	102	100,00

EGB= Streptococcus β -hemolítico do grupo B; Cult P=cultivo positivo; PCR P=Polymerase Chain Reaction positiva; N=número absoluto; %=percentuais; V+A=vagina e anorretal concomitantemente; $p < 0,001$ (qui-quadrado).

Os dados expostos na Tabela 4 confirmam que existe diferença entre as proporções encontradas, indicando que cultivos positivos são mais incidentes na vagina do que no anorretal ($p < 0,001$). Entretanto, ressalta-se novamente que em 13 casos pelo cultivo e em 17 pela PCR, a detecção de colonização se deu apenas nas amostras anorretais que, se não realizadas, colocariam em risco os recém-natos destas gestantes.

Conforme exposto anteriormente, a detecção apenas anorretal tem sua importância nas atividades terapêuticas da gestante, pois para Dillon et al. (1982) e Quinlan et al.(2000) existe um carreamento anorretal para o canal vaginal tornando-o colonizado pelo EGB. Consequentemente pode propiciar que recém-natos de gestantes com EGB positivo apenas anorretal, apresentem quadros de septicemia precoce do recém-nato.

Vale ressaltar que apesar de a análise estar voltada para os locais de coleta, mais uma vez a sensibilidade do PCR pode ser constatada pelo número de gestantes com colonização anorretal, confirmando assim a importância da coleta em ambos os locais (Tabela 4). Tal resultado nos leva a concluir que a utilização da técnica de PCR deveria ser incorporada no rastreamento do EGB em gestantes da cidade de Manaus. Mostrou-se mais sensível que o cultivo na detecção do EGB e necessitou de menos tempo para a realização do exame, resultando em um menor tempo de resposta.

Quando a suscetibilidade a um microrganismo é referida, são incontáveis as variáveis que determinam essa condição. Anteriormente destacamos a suscetibilidade afrodescendente ao EGB, entretanto também se faz necessário avaliar outras variáveis. Nesse sentido o presente trabalho optou por verificar o risco obstétrico. Com esse objetivo a casuística foi dividida em dois grupos – 91 gestações de Alto Risco e 56 de Baixo Risco, perfazendo 100% do universo amostral estudado (147 gestantes). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição dos resultados de colonização pelo EGB pelos métodos diagnósticos utilizados, conforme gestação de alto e baixo risco obstétrico.

VARIÁVEIS	RISCO OBSTÉTRICO						p*
	Alto (n = 91)		Baixo (n = 56)		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Cultivo							0,132
Positivo	42	46,2	33	58,9	75	51,0	
Negativo	49	53,9	23	41,1	72	49,0	
PCR							0,430
Positivo	61	67,0	41	73,2	102	69,4	
Negativo	30	33,0	15	26,8	45	30,6	

* Qui-quadrado.

Conforme apresentado na Tabela 5, a análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos, em ambos os métodos diagnósticos de colonização pelo EGB. Conclui-se que a caracterização da gestação em alto ou baixo risco não é um fator relacionado com a predisposição de uma colonização pelo EGB e, portanto, não é um Fator de Risco Materno associado à sepse neonatal precoce.

Buscou-se também verificar se os métodos diagnósticos ao serem relacionados com os locais de coleta apresentavam diferenças entre os grupos. Os dados encontrados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados de colonização pelo EGB conforme métodos diagnósticos utilizados, gestação de alto e baixo risco obstétrico e locais de coleta.

Variáveis	Local da coleta						p*
	Anorretal P		Anorretal N		Total		
	n	%	n	%	n	%	
CULTIVO							
Gestantes de Alto Risco							<i>0,008</i>
Vagina P	13	14,29	21	23,08	34	37,36	
Vagina N	8	8,79	49	53,84	57	62,64	
Total	21	23,08	70	76,92	91	100,0	
Gestantes de Baixo Risco							<i>0,022</i>
Vagina P	13	23,21	15	26,79	28	50,0	
Vagina N	5	8,93	23	41,07	28	50,0	
Total	18	32,14	38	67,86	56	100,0	
PCR							
Gestantes de Alto Risco							<i><0,001</i>
Vagina P	37	40,66	12	13,19	49	53,85	
Vagina N	12	13,19	30	32,97	42	46,15	
Total	49	53,85	42	46,15	91	100,0	
Gestantes de Baixo Risco							<i><0,001</i>
Vagina P	30	53,57	4	7,14	34	60,71	
Vagina N	7	12,50	15	26,79	22	39,29	
Total	37	66,07	19	33,93	56	100,0	

P*= Qui-quadrado; P = positivo; N = negativo.

Valor de p em negrito itálico indica diferença estatística ao nível de 5% de significância.

Na Tabela 6 visualiza-se que em 53,84% das gestantes de alto risco não foi detectado colonização do EGB pelo método de cultivo, enquanto que nas de baixo risco a ausência de colonização ocorreu em 41,07% dos casos. Entretanto, o uso da PCR ampliou a positividade em ambos os grupos estudados. Além disso, obtiveram-se em todos os grupos analisados diferenças entre as proporções encontradas, indicando maior incidência de EGB na vagina.

Novamente ressalta-se que no cultivo obteve-se maior número e percentuais de isolamento na vagina do que anorretal, em ambos os grupos estudados (37,36% versus 23,08% no alto risco e 50% versus 32,14% no baixo risco, respectivamente). Mas quando o diagnóstico é feito por PCR ocorre um aumento considerável e as diferenças não se repetem (53,85% versus 53,85% no alto risco e 60,71% versus 66,07% no baixo risco). Esse resultado

indica maior sensibilidade da PCR independente do local de coleta. Entretanto, deve ser lembrado que a PCR detecta o DNA do microrganismo, esteja ou não viável, podendo representar apenas uma colonização passada. Esse é o motivo do padrão ouro de diagnóstico ser o cultivo, mas um resultado positivo pelo PCR tem que ser levado em consideração na antibiótico profilaxia intraparto, pois um cultivo negativo também pode ser oriundo de erros técnicos nas variáveis etapas de manuseio e inoculação da amostra em meios de cultivo.

Para uma visualização mais simplificada e apenas dos resultados positivos de colonização pelo EGB, os dados tabulados foram alocados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados de colonização pelo EGB, conforme gestação de alto e baixo risco obstétrico, diferentes métodos diagnósticos e locais anatômicos de coleta.

VARIÁVEIS	Local da coleta						Total		p
	Vagina (V)		Anorretal (A)		V + A		n	%	
	n	%	n	%	n	%			
Gestantes de Alto Risco	<i>0,003*</i>								
Cult P com PCR P	21	34,43	8	13,11	13	21,31	42	68,85	
Cult N com PCR P	2	3,28	11	18,03	6	9,84	19	31,15	
Total	23	37,70	19	31,15	19	31,15	61	100,0	
Gestantes de Baixo Risco	**								
Cult P com PCR P	15	36,59	5	12,20	13	31,71	33	80,49	
Cult N com PCR P	0	0,00	6	14,63	2	4,88	8	19,51	
Total	15	36,59	11	26,83	15	36,59	41	100,0	

EGB= Streptococcus β -hemolítico do grupo B; Cult P=cultivo positivo; PCR P=Polymerase Chain Reaction positiva;

*Qui-quadrado; ** Não é possível aplicar o teste de Pearson devido as restrições do teste qui-quadrado (VIEIRA, 2004). Valor de p em negrito itálico indica diferença estatística ao nível de 5% de significância.

Na Tabela 7 visualiza-se melhor a ocorrência mais acentuada do EGB na vagina do que anorretal em ambos os grupos de estudo e conforme os métodos diagnósticos utilizados. Também é mais bem visualizado o acréscimo de diagnóstico de colonização pelo EGB fornecido pelo uso da PCR em ambos os grupos estudados, tendo sido maior nas gestações de alto risco. Esses achados induzem a premissa de que a colonização possa ser apenas vaginal,

entretanto oriunda do trato gastrointestinal onde não manteve sua colonização por competição com os demais microrganismos ou outra causa. Também pode significar um carreamento proporcionado por infecção geniturinário.

Como último objetivo da presente pesquisa, realizou-se a análise dos antecedentes das gestantes e a colonização pelo EGB. Nesse sentido se considerou que uma gestante estava colonizada quando a PCR foi positiva, independente do local de coleta. A estratégia teve a intenção de verificar se com o aumento de colonização diagnosticado pela PCR se obteria correlação com os antecedentes pessoais, intercorrências clínico-obstétricas e passado obstétrico.

Inicialmente efetuou-se o estudo com os antecedentes pessoais e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Análise de antecedentes pessoais com a colonização pelo EGB.

VARIÁVEIS	EGB POS		EGB NEG		Total	p
	n	%	n	%		
IDADE						0,783 ^Q
	0 a 15	9	69,2	4	30,8	13
	16 a 25	26	76,5	8	23,5	34
	26 a 35	45	67,2	22	32,8	67
	36 a 45	21	65,6	11	34,4	32
	> 46	1	100,0	0	0,00	1
ESTADO CIVIL						0,785 ^Q
	CASADA	28	68,3	13	31,7	41
	OUTRO	49	72,1	19	27,9	68
	SOLTEIRA	25	65,8	13	34,2	38
TABAGISMO						0,185 ^F
	PRESENTE	0	0	2	100,0	2
	AUSENTE	102	70,3	43	29,7	145
ALCOOLISMO						0,612 ^F
	PRESENTE	0	0	1	100,0	1
	AUSENTE	102	69,9	44	30,1	146
NÚMERO DE PARCEIROS						0,149 ^F
	1	88	67,2	43	32,8	131
	2 OU MAIS	14	87,5	2	12,5	16
GRAVIDEZ PROGRAMADA						0,069 ^Q
	SIM	33	80,5	8	19,5	41
	NÃO	69	65,1	37	34,9	106

EGB = *Streptococcus β-hemolítico* do grupo B; POS = Positivo; NEG = Negativo; N = número absoluto; Q = qui-quadrado; F = Teste exato de Fisher.

Conforme apresentado na Tabela 8, nenhuma das variáveis estudadas apresentou significância com a colonização pelo EGB, mesmo utilizando a PCR como padrão ouro. Conclui-se assim que mesmo com o aumento no diagnóstico de colonização essas variáveis não possuem correlação.

É oportuno ressaltar alguns achados sociais interessantes do grupo estudado. Tem-se 8,8% da casuística composta por adolescentes com até 15 anos. A faixa etária predominante de gestantes foi entre 26 e 35 anos (45,6%). A presença de uma gestante com idade de 46 anos, cuja situação é incomum na prática obstétrica.

Em relação ao estado civil, das 147 participantes apenas 41 (27,9%) eram legalmente casadas.

Identificamos também a conscientização da população estudada em relação ao tabagismo e alcoolismo, nos quais constatamos apenas duas gestantes mantendo o hábito de fumar e apenas uma relatando o uso de bebida alcoólica.

Outro fato refere-se à falta de planejamento familiar nessa casuística, onde 106 (72,1%) das gestantes não haviam planejado a gestação atual.

Apesar de não apresentado na Tabela 8, calculou-se quantas das 91 gestantes de alto risco haviam planejado a gestação atual. Constatou-se que apenas 23 (25,3%) haviam tido essa responsabilidade com seus estados de saúde. Tal fato nos leva a questionar se antes de suas gestações haviam sido devidamente informadas sobre os riscos de uma gravidez e as consequências para a saúde do binômio mãe-feto.

Os dados obtidos na análise das intercorrências clínico-obstétricas e passado obstétrico com a colonização por EGB estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Análise das variáveis de intercorrências clínico-obstétricas e passado obstétrico com a colonização pelo EGB.

VARIÁVEIS	EGB POS		EGB NEG		Total	p
	n	%	n	%		
DOENÇAS CONCOMITANTES						0,730^Q
DIABETES	11	73,3	4	26,7	15	
HIPERTENSÃO	11	68,8	5	31,2	16	
NENHUMA	42	73,7	15	26,3	57	
OUTRAS	38	63,8	21	36,2	59	
CORRIMENTO VAGINAL						0,332^Q
AUSENTE	33	76,7	7	23,3	30	
PRESENTE	79	67,5	38	32,5	117	
INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO NA GESTAÇÃO ATUAL						0,023^Q
SIM	52	61,9	32	38,1	84	
NÃO	50	79,4	13	20,6	63	
USO DE ANTIBIÓTICO						0,097^Q
SIM	53	63,9	30	36,1	83	
NÃO	49	76,6	15	23,4	64	
Nº GESTAÇÕES						0,873^Q
PRIMIGESTA	28	66,7	14	33,3	42	
SECUNDIGESTA	16	72,7	6	27,3	22	
MULTIGESTA	58	69,9	25	30,1	83	
Nº DE PARTOS						0,950^Q
NULIPARA	38	67,9	18	32,1	56	
PRIMIPARA	21	70,0	9	30,0	30	
MULTIPARA	43	70,5	18	29,5	61	
ABORTAMENTOS						0,595^F
AUSENTE	61	70,1	26	29,9	87	
1 OU 2	39	70,9	16	29,1	55	
3 OU MAIS	2	40	3	60	5	
ANTECEDENTE PARTO PREMATURO						0,525^Q
SIM	14	63,6	8	36,4	22	
NÃO	88	70,4	37	29,6	125	
ROTURA PREMATURA DE MEMBRANAS						0,133^Q
SIM	16	84,2	3	15,8	19	
NÃO	86	67,2	42	32,8	128	
ANTECEDENTE ÓBITO NEONATAL						0,315^Q
SIM	10	58,8	7	41,2	17	
NÃO	92	70,8	38	29,2	130	

EGB = *Streptococcus β-hemolítico* do grupo B; POS = Positivo; NEG = Negativo; Q = qui-quadrado; F = Teste exato de Fisher; Valor de p em negrito itálico indica associação estatística ao nível de 5% de significância.

Conforme apresentado na Tabela 9, a idade gestacional média foi de 35,8 semanas.

Das variáveis estudadas, excetuando-se a “Infecção do trato urinário na Gestação Atual”,

nenhuma apresentou significância estatística com a colonização pelo EGB. Resultados semelhantes foram obtidos por Jerbi et al. (2007), ao analisar as mesmas variáveis estudadas no presente trabalho,

Vários fatores de risco obstétricos citados na literatura têm sido estudados na verificação de possível influência na colonização pelo EGB em gestantes. Nesse sentido são escassos os que obtiveram alguma correlação, exceção feita a infecção do trato urinário pelo EGB (CDC, 2010). Essa é referida como um fator de risco importante para a prematuridade e infecção neonatal pelo EGB.

Na presente pesquisa a Infecção do Trato Urinário (ITU) foi a única variável que teve significância estatística com a colonização pelo EGB ($p=0,023$). Conforme apresentado na Tabela 9, ocorreu em 84 (57,14%) das gestantes incluídas no estudo e destas 52 (62,0%) apresentaram colonização positiva para o EGB. Entretanto, das 63 que não apresentaram infecção urinária 50 (79,37%) estavam colonizadas por EGB. Tal fato propiciou a significância estatística indicativa de que a infecção urinária pode ser um fator de proteção para a colonização pelo EGB, independente de se ter o conhecimento dos germes causadores da mesma. As informações sobre os germes responsáveis pelas ITU, relatadas na casuística estudada, não foram coletadas dos prontuários, visto que não fazia parte dos objetivos do presente trabalho. Entretanto todas as gestantes relataram antibioticoterapia para seus quadros de ITU. Assim tem-se a premissa de que a antibioticoterapia para a ITU propiciou uma proteção contra o EGB. Tal fato tem respaldo no trabalho de Nomura et al. (2009) que encontraram correlação de bacteriúria assintomática e colonização pelo EGB, portanto sem o uso de antibioticoterapia.

Em relação ao uso de antibióticos na gestação atual, 56,46% ($n=83$) admitiram o uso e destas, 63,8% ($n=53$) apresentaram exames positivos para o EGB (Tabela 9), entretanto não configurando significância estatística ($p=0,097$). Faz-se necessário então alertar que os dados

de uso de antibiótico na gestação se referem ao uso generalizado e não específico para as ITU. Então é possível que a ausência de significância estatística de colonização pelo EGB entre as que utilizaram antibióticos e as que não fizeram uso se deva a ausência do dado específico para as ITU. Assim, não configura conflito sobre o disposto na análise da significância estatística das ITU.

Na análise das intercorrências clínico-obstétricas, entre as gestantes diabéticas ou hipertensas, a colonização pelo EGB nas hipertensas foi de 73,33% (11/15) e nas diabéticas de 68,75% (11/16). Apesar de não serem significantes, esses dados devem ser objeto de novos estudos com um número mais adequado de indivíduos para termos a verdadeira correlação entre estas intercorrências e gestantes colonizadas pelo EGB.

6. CONCLUSÕES

- 6.1** A taxa de 51,02% de colonização por EGB, obtida por método de cultivo considerado como padrão ouro de diagnóstico, permite a conclusão de que existe uma questão regional bastante grave de saúde pública, visto ser muito superior à média nacional (14,9%, a 27,6%) ou mesmo da média mundial (4% e 30%);
- 6.2** As altas taxas de colonização pelo EGB propiciam a hipótese de que a população do Amazonas pode ter susceptibilidade ao mesmo, semelhante ao que acontece com a população afrodescendente nos estados Unidos da América;
- 6.3** O uso da PCR como método diagnóstico forneceu uma ampliação diagnóstica de 18,37% na casuística estudada e com valores de acuidade que o tornam indicado no rastreamento de colonização pelo EGB. Além disso, forneceu uma taxa de colonização (69,39%) ainda mais preocupante em termos de saúde pública de gestantes e seus recém-natos;
- 6.4** No estudo dos locais de coleta constatou-se que o método de cultivo foi mais eficaz na vagina do que anorretal ($p < 0,001$). Entretanto, em 13 casos (17,33%) pelo cultivo e em 19 (18,62%) pela PCR, a detecção de colonização se deu apenas nas amostras anorretais que, se não realizadas, colocariam em risco os recém-natos destas gestantes;
- 6.5** A caracterização da gestação em alto ou baixo risco não é um fator relacionado com a predisposição de uma colonização pelo EGB e, portanto, não é um Fator de Risco Materno associado à sepse neonatal precoce. Mas, constatou-se um acréscimo de colonização fornecido pelo uso da PCR em ambos os grupos estudados, tendo sido maior nas gestações de alto risco;
- 6.6** Entre as variáveis de antecedentes pessoais, intercorrências clínico-obstétricas e passado obstétrico, confirmou-se que apenas a Infecção do Trato Urinário (ITU) tem significância

estatística com a colonização pelo EGB ($p=0,023$), indicando que é um fator de risco, porém que se tratada pode fornecer proteção contra o EGB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFROZA, S. Neonatal sepsis – a global problem: an overview. **Mymensingh Med. J., Dhaka**, v. 15, n.1, p.108-114, 2006.
- ALFA, M.J.; SEPEHRI, S.; DE GAGNE, P.; HELAWA, M.; SANDHU, G.; HARDING, G.K. Real-time PCR assay provides reliable assessment of intrapartum carriage of group B Streptococcus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 9, p. 3095-9, 2010.
- AMARAL, E. Estreptococo do grupo B: rastrear ou não rastrear no Brasil? Eis a questão. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**; v.27 n.4, p. 165-167, abr. 2005.
- ASM – American Society for Microbiology. **CAMP test image**. Disponível em www.asm.org. Acessado em 21/01/2011.
- ATKINS, K.L.; ATKINSON, R.M.; SHANKS, A.; PARVIN, C.A.; DUNNE, W.M.; GROSS, G. Evaluation of polymerase chain reaction for group B Streptococcus detection using an improved culture method. **Obstet. Gynecol.**, v. 108, n. 3 pt 1, p. 488–91. 2006.
- AZIZ, N.; BARON, E.J.; D’SOUZA, H.; NOURBAKHS, M.; DRUZIN, M.L.; BENITZ, W.E. Comparison of rapid intrapartum screening methods for group B streptococcal vaginal colonization. **J. Matern. Fetal Neonatal Med.**, v. 18, n. 4, p. 225–9, 2005.
- BAKER, C.J.; EDWARDS, M.S.; Group B streptococcal infections. In: Remington J, Klein J.O. (eds.). **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 3th ed. Philadelphia: PA Saunders; p. 742-97, 1990.
- BARCAITE E., BARTUSEVICIUS A., TAMELIENE R., KLIUCINSKAS M., MALECKIENE L., NADISAUSKIENE R. 2008. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. **Acta Obstet Gynecol Scand** 87: 260-271.
- BENCHETRIT LC, FRACALANZZA SEL, PEREGRINO H, CAMELO AA, SANCHES LA. Carriage of streptococcus agalactiae in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil. **J Clin Microbiol**. 1982;15:787-90.
- BERALDO, C.; BRITO, A.S.J.; SARIDAKIS, H.O.; MATSUO, T. Prevalência da colonização vaginal e anorretal por estreptococo do grupo B em gestantes do terceiro trimestre. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 26, n. 7, p. 543- 9, 2004.
- BERGERON, M.G.; DANBING, K.; MÉNARD, C.; PICARD, F.J.; GAGNON, M.; BERNIER, M.; OUELLETTE, M.; ROY, P.H.; MARCOUX, S.; FRASER, W.D. Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, n. 3, p. 175-179, 2000.
- BLOCK, T.; MUNSON, E.; CULVER, A.; VAUGHAN, K.; HRYCIUK, J.E. Comparison of carrot broth- and selective Todd-Hewitt broth-enhanced PCR protocols for real-time detection of Streptococcus agalactiae in prenatal vaginal/anorectal specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 11, p. 3615–20, 2008.

BOYER, K.M.; GOTOFF, S.P. Strategies for chemoprophylaxis of GBS early-onset infections. **Antibiot. Chemother.**, v. 35, n. 267-80, 1985.

BOYER, K.M.; GOTOFF, S.P. Prevencion of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. **N. Engl. J. Med.**, v. 314, p. 1665 – 1669, 1986.

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.

BREED, R.S. The present status of systematic Bacteriology. **J. Bacteriology**, v. XV, n. 3, p. 143-63, 1927.

CAMPBELL, J.R.; HILLIER, S.L.; KROHN, M.A.; FERRIERI, P.; ZALEZNIK, D.F.; BAKER, C.J. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. **Obstet. Gynecol.**, v. 96, n. 4, p. 498–503, 2000.

CASTELLANO-FILHO, D.S.; TIBIRIÇÁ, S.H.C.; DINIZ, C.G. Doença Perinatal associada aos estreptococos do Grupo B: aspectos clínico-microbiológicos e prevenção. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 34, n. 2, p. 127-134, 2008.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. **MMWR** 1996, v. 45 (No. RR-7), 1996.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. **MMWR** 2002, v. 51 (No. RR-11), 2002.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory Practices for Prenatal Group B Streptococcal Screening --- Seven States, 2003. **MMWR** 2004 / 53(23);506-509, 2004a

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Diminishing racial disparities in early-onset neonatal group B streptococcal disease - United States, 2000–2003. **MMWR** 2004, v. 53, p. 502–5, 2004b.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Early-Onset and Late-Onset Neonatal Group B Streptococcal Disease – United States, 1996-2004. **MMWR** 2005, p. 1205-07, 2005.

CDC. Perinatal group B streptococcal disease after universal screening recommendations—United States, 2003–2005. **MMWR** 2007;56: 701–5. 19.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Trends in perinatal group B streptococcal disease - United States, 2000–2006. **MMWR** 2009, v. 58:109–12, 2009.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. **MMWR** 2010, v. 59 (No. RR-10), 2010.

CDC - Center of Disease Control. **Instructions for the collection of a genital swab for the detection of a group B streptococcus (GBS)**. Disponível em http://www.cdc.gov/groupbstrep/downloads/GBS_SWAB_SHEET21.pdf, acessado em 26/01/2011.

CHIOU, J. Molecular cloning of the Streptococcus agalactiae gene encoding peptide-chain release factor. **J. Subm. Nat. Taiwan Univ.**, Jen-Ai Rd. section 1, n.1, Taipei, Taiwan 10018, Republic of China, 30 jan. 2001.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standard for antimicrobial susceptibility testing**, M100–S20. Wayne, PA; 2010.

COSTA AL, LAMY FILHO F, CHEIN MB et al. Prevalence of colonization by group B Streptococcus in pregnant women from a public maternity of Northwest region of Brazil. **Rev Bras Ginecol Obstet** 2008; 30:274-80.

DANIELS J, GRAY J, PATTISON H, GRAY R, HILLS R, KHAN K on behalf of the GBS Collaborative Group. Intrapartum tests for group B streptococcus: accuracy and acceptability of screening. **BJOG** 2011;118:257–265.

de-PARIS F, MACHADO AB, GHENO TC, ASCOLI BM, OLIVEIRA KR, BARTH AL. Group B Streptococcus detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women. **Braz J Infect Dis.** 2011 Jul-Aug;15(4):323-7.

DILLON, J.R.H.C.; GRAY, E.; PASS, M.A.; GRAY, B.M. Anorectal and vaginal carriage of group B Streptococci during pregnancy. **J. Infect. Dis.**, v. 145, n. 6, p. 794-9, 1982.

DINIZ, C.G.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R.; ROCHA, E.R.; SMITH, C. J. Differential gene expression in a Bacteroides fragilis metronidazole-resistant mutant. **J. Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 100-108, 2004.

EDWARDS, R.K.; NOVAK-WEEKLEY, S.M.; KOTY, P.P.; DAVIS, T.; LEEDS, L.J.; JORDAN, J.A. Rapid group B streptococci screening using a real-time polymerase chain reaction assay. **Obstet. Gynecol.**, v. 111, n. 6, p. 1335–41, 2008.

EL HELALI, N.; NGUYEN, J.C.; LY, A.; GIOVANGRANDI, Y.; TRINQUART, L. Diagnostic accuracy of a rapid real-time polymerase chain reaction assay for universal intrapartum group B Streptococcus screening. **Clin. Infect. Dis.**, v. 49, n. X, p. 417–231, 2009.

FACKLAM, R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 4, p. 613–630, 2002.

FIGUEIRA-COELHO J, RAMIREZ M, SALGADO MJ, MELO-CRISTINO J. Streptococcus agalactiae in a large Portuguese teaching hospital: antimicrobial susceptibility, serotype distribution and clonal analysis of macrolide-resistant isolates. **Microb Drug Res.** 2004;10(1):31-6.

FRY, R.M.; ENG, M.R.C.S. Fatal infections by haemolytic streptococcus group B. **Lancet**, London, n. 5.966, p. 199-201, 1938.

FUNÇÃO, J.M.; NARCHI, N.Z. A study of group B streptococcus in pregnant women of eastern São Paulo. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 47, n. 1, p. 22-29, 2013.

GAVINO, M.; WANG, E. A comparison of a new rapid real-time polymerase chain reaction system to traditional culture in determining group B Streptococcus colonization. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 197, p. 388.e1-e4. 2007.

GIBBS, R.S.; SCHRAG, S.; SCHUCHAT, A. Perinatal infections due to group B streptococci. **Obstet. Gynecol.**, v. 104, n. 5 pt 1, p. 1062–76, 2004.

GOODRICH J.S.; MILLER, M.B. Comparison of culture and 2 real-time polymerase chain reaction assays to detect group B *Streptococcus* during antepartum screening. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 59, p. 17–22, 2007.

HICKMAN, M.E.; RENCH, M.A.; FERRIERI, P.; BAKER, C.J. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. **Pediatrics**, v. 104, n. 2, p. 203-9, 1999.

JERBI M, HIDAR S, HANNACHI N, EL MOUEDDEB S, DJEBBARI H, BOUKADIDA J, ET AL. **Risk factors for group B streptococcal colonization in pregnant women at term: prospective study of 294 cases.** *Gynecol Obstet Fertil* 2007; 35:312-6.

KÖHLER, M.; KÖHLER, W. Zentralblatt für Bakteriologie – 100 years ago: Streptococcal mastitis of cows – long-lasting dilemmas in diagnosis and nomenclature. **Int. J. Med. Microb.**, v. 294, p. 1-6, 2004.

KONEMAN, E.W.; ALLENS, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R.W.C. In: **Color atlas and text book of diagnostic microbiology.** Lippincott. Philadelphia. Fifth edition, 1997.

LANCEFELD, R. C. A Serological Differentiation of Human and other Groups of Streptococci. **J. Exp. Med.**, v. 1, p. 571-595, 1933.

MAISEY, KELLY S. DORAN AND VICTOR NIZET (2008) Recent advances in understanding the molecular basis of group B Streptococcus virulence. **Expert Rev. Mol. Med.** Vol. 10, e27, September 2008, doi:10.1017/S1462399408000811

MEIRI-BENDEK, I.; LIPKIN, E.; FRIEDMANN, A.; LEITNER, G.; SARAN, A.; FRIEDMAN, S.; KASHI, Y. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. **J. Dairy. Sci.**, v. 85, p. 1717-23, 2002.

MIURA, E.; MARTIN, M.C.; Group B streptococcal neonatal infections in Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 43, n. 5, p. 243-6, 2001.

MOREIRA, M. **Variabilidade genética de Streptococcus mutans em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Setor Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MOYO, S.R.; MUDZORI, J.; TSWANA, A.S.; MAELAND, J.A.; Prevalence, capsular type distribution, anthropometric and obstetric factors of group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*) colonization in pregnancy. **Cent. Afr. Med.**, v. 46, p. 115-20, 2000.

MS – Ministério da Saúde, Brasil. **Mortalidade Infantil – Dados por Estado. Amazônia Legal.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=32340&janela=1>. Acesso em 12 dez. 2010.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E.R.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Rev. Med. Bras.**, v. 67, n. 10, p. 7-17, 2010.

NOMURA M.L.; PASSINI JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, U.M.; CALIL, R. Colonização materna e neonatal por estreptococo do grupo B em situações de ruptura pré-termo de membranas e no trabalho de parto prematuro. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 31, n. 8, p. 397-403, 2009.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: Teoria e Prática**, 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 596.

PINHEIRO, R.S.; FERREIRA, L.C.L.; BRUN I.R.; GUILHERME, J.P.; MONTE, R.L. Estudo dos fatores de risco maternos associados à sepse neonatal precoce em hospital terciário da Amazônia brasileira. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 29, n. 8, p. 387-95, 2007.

POGERE, A.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; FREITAS, P. F.; D'ACAMPORA, J.; ZUNINO, J. N. Prevalência da colonização pelo estreptococo do grupo B em gestantes atendidas no ambulatório de pré-natal. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 27, n. 4, p. 174-80, 2005.

QUINLAN JD, HILL DA, MAXWELL BD, BOONE S, HOOVER F, LENSE JJ. The necessity of both anorectal and vaginal cultures for group B Streptococcus screening during pregnancy. **J Fam Pract**;49:447–8, 2000.

ROSA-FRAILE, M.; CAMACHO-MUNOZ, E.; RODRIGUEZ-GRANGER, J.; LIEBANA-MARTOS, C. Specimen storage in transport medium and detection of group B streptococci by culture. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 928–30, 2005.

SCHRAG, S.J.; ZYWICKI, S.; FARLEY, M.M.; REINGOLD, A.L.; HARRISON, L.H.; LEFKOWITZ, L.B.; HADLER, J. L.; DANILA, R.; CIESLAK, P.R.; SCHUCHAT, A. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, n. 1, p. 15–20, 2000.

SCHRAG, S.J.; ZELL, E.R.; LYNFIELD, R.; ROOME, A.; ARNOLD, K.E.; CRAIG, A.S. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n. 4, p. 233-9, 2002.

SCHUCHAT, A.; ZYWICKI, S.; DINSMOOR, M.J. Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: a multicenter case-control study. **Pediatrics**, v. 105, n. 1, p. 21–6, 2000.

SCICCHITANO, L.; BOURBEAU, P. Comparative evaluation of the AccuProbe group B Streptococcus culture test, the BD GeneOhm Strep B assay, and culture for detection of group B streptococci in pregnant women. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 9, p. 3021–3, 2009.

SHOTTMULLER, H. Die Artunterscheidung der für den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar. Munch. **Med. Wochenschr**, v. 50, p. 849-853, 1903.

SIMÕES JA, ALVES VM, FRANCALANZA SE, DE CAMARGO RP, MATHIAS L, MILANEZ HM, ET AL. Phenotypical characteristics of group B streptococcus in parturients. **Braz J Infect Dis.**;11(2):261-6, 2007.

STONER, K.A.; RABE, L.K., HILLIER, S.L. Effect of transport time, temperature, and concentration on the survival of group B streptococci in Amies transport medium. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 11, p. 5385–7, 2004.

STRAKOVÁ L, MOTLOVÁ J. Active surveillance of early onset disease due to group B streptococci in newborns. **Indian J Med Res**;119(Suppl): 205-207, 2004.

TAJIK P, VAN DER HAM DP, ZAFARMAND MH, HOF MHP, MORRIS J, FRANSSEN MTM, DE GROOT CJM, DUVEKOT JJ, OUDIJK MA, WILLEKES C, BLOEMENKAMP KWM, PORATH M, WOISKI M, AKERBOOM BM, SIKKEMA JM, NIJ BIJVANK B, MULDER ALM, BOSSUYT PM, MOL BWJ. Using vaginal GBS colonisation in women with preterm premature rupture of membranes to guide the decision for immediate delivery: a secondary analysis of the PPROMEXIL trials. **BJOG**;121:1263–1273, 2014.

TEESE, N.; HENESSEY, D.; PEARCE, C.; KELLY, N.; GARLAND, S. Screening protocols for group B Streptococcus: are transport media appropriate? **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v. 11, p. 199–202, 2003.

VACILOTO, E.; RICHTMANN, R.; DE PAULA, F.C.H.; KUSANO E.J.; DE ALMEIDA, M.F.; AMARO, E.R. A survey of the incidence of neonatal sepsis by group B Streptococcus during a decade in a Brazilian maternity hospital. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 6, n. 2, p. 55-62, 2002.

VIEIRA, Sonia – Bioestatística, Tópicos Avançados – Rio de Janeiro. 2.ed. – RJ: Elsevier, 2004

WILKINSON, H.W. CAMP-disk test for presumptive identification of group B streptococci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 6, n. 1, p. 42–5, 1977.

YANCEY, M.K.; SCHUCHAT, A.; BROWN, L.K.; VENTURA, V.L.; MARKENSON, G.R. The accuracy of late antenatal screening cultures in predicting genital group B streptococcal colonization at delivery. **Obstet. Gynecol.**, v. 88, n. 5, p. 811–5, 1996.

YOUNG BC, DODGE LE, GUPTA M, et al. Evaluation of a rapid, real-time intrapartum group B streptococcus assay. **Am J Obstet Gynecol.**;205:372.e1-6, 2011.

APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os pesquisadores Carlos Henrique Esteves Freire, Júlia Ignez Salem e Patrícia Orlandi, solicitam a sua autorização para realizar as atividades do Projeto de Pesquisa “**OCORRÊNCIA DO ESTREPTOCOCO DO GRUPO B EM GESTANTES DE BAIXO E ALTO RISCO OBSTÉTRICO EM MANAUS/AM**”, colaborando como voluntária de um estudo de investigação sobre a ocorrência de bactérias de interesse médico e seu comportamento frente a antibióticos, em amostras de secreções vaginais e anorretais de grávidas atendidas no ambulatório de pré natal da maternidade Balbina Mestrinho. Ao aceitar participar, a sua colaboração com o estudo consiste em fornecer dados pessoais e de sua(s) gestações(ão) durante a consulta e permitir que sejam coletadas amostras vaginais e anorretais utilizando pequeno cotonete estéril durante o exame ginecológico, que é realizado de rotina no serviço e na ocasião de sua consulta de pré natal. Este processo não será prejudicial e nem doloroso para você e/ou seu bebê. Você não receberá nenhum retorno financeiro e nem é obrigada a participar, assim como tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, independente do motivo e sem prejuízo do seu atendimento pré natal. Seu nome será mantido em total sigilo por tempo indeterminado, tanto pelos pesquisadores como pela instituição coordenadora. Quando os resultados forem divulgados, não será mencionado seu nome.

A sua participação é muito importante para o estudo, pois além de ajudar na pesquisa, você estará contribuindo para melhorar a identificação das grávidas que têm mais chance de ter esse tipo de bactéria. Além disso, a pesquisa lhe proporcionará imenso benefício, visto que ela indicará se você está ou não com a bactéria. Caso esteja, o médico que realizar o seu parto saberá da necessidade de providenciar o seu tratamento e o do bebê, para evitar a ocorrência de infecções graves, tanto em você como no bebê.

Caso necessite de mais informações sobre a pesquisa ou sobre o seguimento dos seus exames, você poderá ter acesso ao pesquisador, **CARLOS HENRIQUE E. FREIRE**, pelo telefone do Ambulatório (92) 31824547 ou pessoal (92) 91462319. Também poderá ter contato direto no ambulatório da Maternidade Balbina Mestrinho, situada na Rua Duque de Caxias, 1142 - Praça 14 de Janeiro, todos os dias, no horário de 8 as 12 horas.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____ residente à Rua _____, nº _____, bairro _____ recebi todas as explicações sobre a minha participação na pesquisa. Por estar devidamente informada e esclarecida sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expressei meu consentimento para a inclusão nessa pesquisa e atesto que me foi entregue uma cópia deste documento.

.....

Assinatura do participante

...../...../.....

Data

Impressão do polegar, caso não saiba escrever o nome.

Nome do pesquisador

Assinatura do pesquisador

APÊNDICE 2 – Formulário de coleta de informações

Data ____/____/____

N^o Registro: _____Nome: _____ N^o prontuário: _____

Endereço: _____

Fone Contato: _____ Celular: _____

Antecedentes Pessoais

1. Idade |__|__| anos |__|__| meses

2. Estado marital: solteira casada outro 3. Cor: branca preta parda amarela 4. Escolaridade: nenhuma até 1^o grau até 2^o grau superior 5. Ocupação profissional: empregada desempregada Do lar 6. Local de Moradia: urbana periferica rural 7. Tabagismo: ausente presente 8. Alcoolismo: ausente presente 9. Doenças concomitantes: Diabetes Hipertensão Colagenoses Púrpuras Aids HIV+ Pat. Imunossupressoras

Outras: _____

10. Classificação do risco obstétrico: Baixo risco Alto risco **Fatores de risco relacionados às complicações da gestação**11. N^o de Gestações: _____ 12. N^o de Partos: _____ 13. N^o de Abortos: _____14. IG (DUM): _____ 15. IG (1^oUS): _____ 16. N^o de Consultas Pré-Natal: _____17. N^o de parceiros sexuais nos últimos 12 meses antes de engravidar: _____18. Corrimento vaginal durante a gravidez? Sim Não 19. Antecedente de trabalho de parto prematuro? Sim Não 20. Antecedente de parto prematuro? Sim Não 21. Presença de amniorrexe em gravidez anterior? Sim Não 22. Antecedente de ITU nesta gestação? Sim Não 23. Fez uso de antibióticos nesta gestação? Sim Não 24. Antecedente de infecção neonatal pelo EGB em gestação anterior? Sim Não 25. Antecedente de óbito neonatal? Sim Não 26. Atual gravidez foi planejada? Sim Não

Resultados das análises laboratoriais das amostras clínicas**Amostra vaginal:**

Cultivo: Positivo EGB Negativo

Molecular: PCR-RT amostra vaginal caldo → Positivo Negativo

Amostra anorretal:

Cultivo: Positivo EGB Negativo

Molecular: PCR-RT amostra vaginal caldo → Positivo Negativo