UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

FABRÍCIA ALMEIDA FERNANDES SANTANA

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO, PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM CEPAS DE *Streptococcus agalactiae* ISOLADAS DE GESTANTES DE VITÓRIA DA CONQUISTA – BA, BRASIL

Vitória da Conquista, BA
2018

FABRÍCIA ALMEIDA FERNANDES SANTANA

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO, PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM CEPAS DE *Streptococcus agalactiae* ISOLADAS DE GESTANTES DE VITÓRIA DA CONQUISTA – BA, BRASIL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Vasconcelos Oliveira
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA

2018

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Santana, Fabrícia Almeida Fernandes
Comparação de metodologias de identificação, perfil de suscetibilidade antimicrobiana e determinação de genes de resistência em cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de gestantes de Vitória da Conquista-BA, Brasil / Fabrícia Almeida Fernandes Santana.- 2018.
93 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Vasconcelos Oliveira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociência, 2018.

1. de *Streptococcus agalactiae*. 2. Gravidez. 3. Resistência a antibióticos. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Oliveira, Márcio Vasconcelos. III. Título.

CDU: 618.3-06

FABRÍCIA ALMEIDA FERNANDES SANTANA

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO, PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM CEPAS DE *Streptococcus agalactiae* ISOLADAS DE GESTANTES DE VITÓRIA DA CONQUISTA – BA, BRASIL.

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 02 de maio de 2018.

_____

Prof. Dr. Márcio Vasconcelos Oliveira (Orientador)
Universidade Federal da Bahia

_____

Prof. Dr. Lucas Miranda Marques (Examinador)
Universidade Federal da Bahia

_____

Profª. Drª. Milena Soares dos Santos (Examinadora)
Universidade Federal da Bahia

Ao meu esposo Marcelo que, com todo amor, carinho e compreensão, esteve ao meu lado me apoiando e fazendo tudo o que podia para que eu concluísse mais essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois se não fosse o seu amor, cuidado e misericórdia eu jamais estaria escrevendo esse texto. A Ele sou eternamente grata por me proporcionar conforto nos momentos mais difíceis e sempre me dar o direcionamento necessário para prosseguir.

Agradeço ao meu amor Marcelo por sempre estar ao meu lado, me apoiando em todos os aspectos da minha vida. Sem você, não seria possível trilhar a jornada do conhecimento, pois os desafios são grandes e as lutas diárias muitas vezes pesam e levam ao desânimo. Mas Deus em sua infinita bondade me deu você para ser o meu porto seguro e compartilhar comigo todas as experiências de vida que nos tornam mais fortes a cada dia. Te amo para sempre!

Agradeço também aos meus pais e toda a minha família, em especial a minha irmã Nandara por ser alguém que conhece toda a minha história de vida, que compartilhou vários momentos comigo e que sabe de todas as dificuldades que enfrentei para chegar até aqui.

Ao meu orientador, professor Márcio Vasconcelos, pela confiança a mim depositada, por toda ajuda acadêmica e profissional, por compartilhar comigo o seu imenso conhecimento e me inspirar a buscar sempre mais.

A todos os professores do IMS/CAT-UFBA pelos quais eu tenho grande admiração e respeito. Em especial a professora e amiga Milena Soares por ser essa excelente profissional e por me orientar em várias questões acadêmicas além de ter me amparado em vários momentos de dificuldade com palavras muito sábias que fizeram com que eu tivesse forças para prosseguir diante das dificuldades. Agradeço também a professora Maíse Mendonça por todo o carinho e torcida, ao professor Lucas Miranda por toda ajuda, dicas e conselhos, a professora e amiga Jéssica Bonfim por todo o carinho e ao professor Cláudio Lima pela força e incentivo.

Aos meus queridos colegas do mestrado em especial a turma de 2016 do Biociências: Bruna, Deivison, Cláudia, Aparecido, Igor, Fernanda, Daniel e Jeisa. Agradeço também aos queridos da turma de 2017: Suze, Maiara, Luana, Nívea e Bruno. E aos veteranos do Biociências que me ajudaram nos estudos iniciais: Manoel e a querida amiga de longas datas Mayane Oliveira. Com cada

um de vocês eu compartilhei algum momento importante desses quase dois anos no mestrado, agradeço de coração por todos eles, vocês sempre estarão presentes em minha memória e meu coração.

Meu imenso agradecimento ao querido amigo Lucas Santana principalmente pela ajuda na etapa de PCR.

Agradeço a Deus pelo presente que ganhei no mestrado que foi a minha amiga Bruna, uma pessoa tão meiga e jovem, mas de enorme sabedoria. Bruninha querida você não imagina o quanto é importante pra mim, como sou feliz por ter sua amizade e como ela fez com que esses anos fossem mais leves.

Ao meu grande amigo Deivison por todo o carinho, cuidado e por compartilhar comigo momentos felizes e os nem tanto assim, mas dos quais sempre tiramos alguma lição. É muito bom ter a certeza de que os anos passam e a nossa linda amizade continua a mesma. Você é muito especial para mim.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório Central em especial a Mauro pela confiança e por sempre me entender e me ajudar, principalmente nos momentos em que as atividades do trabalho e do mestrado eram mais intensas. Agradeço a Heloísa pela confiança, pelos conselhos, pelo incentivo e por ser um instrumento de Deus para abençoar a minha vida. Agradeço a Rejane pela confiança e por ser alguém que me inspira a ser uma pessoa melhor. Agradeço a Grazielle pela amizade e por ter me apresentado o ambiente em que eu adoro fazer parte hoje que é a Igreja Batista da Cidade.

Agradeço à querida Roberta Pagotto que fez parte como colaboradora na pesquisa, doando o seu tempo para ajudar em sua concretização. Agradeço a todos os profissionais das Unidades de Saúde em que o projeto foi realizado em especial às enfermeiras Jeane, Aline, Daniela, Cristiane, Tânia, Patrícia, Renata, Carla e Stael com as quais eu tive maior contato e que sempre estavam dispostas a colaborar. Também agradeço de forma especial às gestantes que aceitaram participar do estudo.

“Bom, às vezes a vida é dura, mas eu tenho muita coisa para agradecer.”

William P. Young – A cabana

RESUMO

SANTANA, F. A. F. **Comparação de metodologias de identificação, perfil de suscetibilidade antimicrobiana e determinação de genes de resistência em cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de gestantes de Vitória da conquista – BA, Brasil.** 93 f. 2018. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2018.

A bactéria *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus* do grupo B (SGB) tem grande relevância na infecção de recém-nascidos (RN), sendo importante causadora de meningite, sepse e pneumonia. A maioria das infecções neonatais por SGB ocorre por transmissão vertical da mãe colonizada para o RN. O rastreamento das gestantes deve ser realizado através de cultura de amostras de secreção vaginal/retal no terceiro trimestre de gestação e deve ser estabelecida antibioticoprofilaxia intraparto para prevenir a doença precoce neonatal. O objetivo do estudo foi comparar metodologias para o isolamento e identificação de SGB, avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e identificar genes de resistência em cepas de SGB isoladas de gestantes atendidas em 9 unidades básicas de saúde do município de Vitória da Conquista-BA. Foram coletados *swabs* vaginorretais de 186 gestantes entre a 32ª e a 40ª semanas de gestação. Os *swabs* foram semeados em ágar sangue de carneiro 5% e em ágar cromogênico, antes e após a inoculação em caldo seletivo. Para as amostras nas quais houve o crescimento de colônias sugestivas de SGB, foi realizada identificação confirmatória utilizando o teste de CAMP e aglutinação em látex. Foi realizado antibiograma de 32 isolados (17,2%) identificados como positivos para SGB e para aquelas em que houve resistência a clindamicina e/ou eritromicina foi realizada análise molecular para identificação dos genes de resistência *erm*B, *erm*TR, *mef*A e *lin*B. A metodologia mais sensível (96,9%) para a detecção/identificação de SGB, comparada à sorogrupagem, foi a semeadura em ágar cromogênico após incubação da amostra em caldo seletivo. As 32 cepas de SGB isoladas no estudo foram sensíveis à ampicilina, cefotaxima e vancomicina. Seis isolados (18,8%) apresentaram resistência à clindamicina, 8 (25%) foram resistentes à eritromicina e 1 isolado (3,1%) apresentou resistência à penicilina. Todas as cepas de SGB que apresentaram resistência à eritromicina e/ou clindamicina tiveram resultados negativos no D-teste. Duas cepas (25%) apresentaram fenótipo M e 6 isolados (75%) apresentaram fenótipo cMLSB. O gene *erm*B foi identificado em 4 amostras (44,4%), o gene *mef*A também foi verificado em 4 amostras (44,4%), o gene *erm*TR foi identificado em 1 isolado (11,1%) e o gene *lin*B não foi encontrado em nenhum dos isolados. O estudo evidenciou a necessidade de implantação do rastreamento para SGB no município de Vitória da Conquista-BA, que pode ser realizado por diversas metodologias, inclusive por meios cromogênicos e a quimioprofilaxia, para gestantes que não podem usar penicilina, deve ser norteada por teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*, Gravidez, Resistência a antibióticos, Brasil.

ABSTRACT

SANTANA, F. A. F. **Comparison of identification methodologies, antimicrobial susceptibility profile and determination of resistance genes in strains of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women of Vitoria da Conquista-BA.** 93 f. 2018. Dissertation (Master in Biosciences) - Multidisciplinary Institute of Health, Federal University of Bahia, Vitoria da Conquista, 2018.

The bacterium *Streptococcus agalactiae* or Group B Streptococcal (GBS) has great relevance in the infection of newborns (NB), being important cause of meningitis, sepsis and pneumonia. Most neonatal GBS infections occur through vertical transmission from the colonized mother to the NB. Screening of pregnant women should be performed by culturing vaginal/rectal secretion samples in the third trimester of gestation and intrapartum antibiotic prophylaxis should be established to prevent neonatal precocious disease. The objective of the study was to compare methodologies for the isolation and identification of GBS, to evaluate the antimicrobial susceptibility profile and to identify resistance genes in GBS strains isolated from pregnant women attended at 9 basic health units in the city of Vitória da Conquista-BA. Vaginal/rectal swabs were collected from 186 pregnant women between the 32nd and 40th weeks of gestation. The swabs were cultured on 5% sheep blood agar and on chromogenic agar before and after inoculation in selective broth. For samples in which there was growth of colonies suggestive of GBS, a confirmatory identification was made using the CAMP test and latex agglutination. An antibiogram was performed of 32 isolates (17,2%) identified as positive for GBS and for those with resistance to clindamycin and/or erythromycin, a molecular analysis was performed to identify the resistance genes *erm*B, *erm*TR, *mef*A and *lin*B. The most sensitive methodology (96.9%) for the detection/identification of GBS, compared to the serogrouping, was the culture in chromogenic agar after incubation of the sample in a selective broth. The 32 strains of GBS isolated in the study were sensitive to ampicillin, cefotaxime and vancomycin. Six isolates (18.8%) showed resistance to clindamycin, 8 (25%) were resistant to erythromycin and 1 isolate (3.1%) presented resistance to penicillin. All strains of GBS that showed resistance to erythromycin and/or clindamycin had negative D-test results. Two strains (25%) presented M phenotype and 6 isolates (75%) presented cMLSB phenotype. The *erm*B gene was identified in 4 samples (44.4%), the *mef*A gene was also verified in 4 samples (44.4%), the *erm*TR gene was identified in 1 isolate (11.1%) and the *lin*B gene was found in none of the isolates. The study evidenced the need for implantation of the screening for GBS in the city of Vitória da Conquista-BA, that can be realized by several methodologies, including by chromogenic means and chemoprophylaxis, for pregnant women who can not use penicillin, should be guided by sensitivity test to antimicrobials.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, Pregnancy, Resistance to antibiotics, Brazil.

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**16**
2	**REFERENCIAL TEÓRICO**	**19**
2.1.	Considerações sobre o gênero *Streptococcus*	19
2.2.	Características da espécie *Streptococcus agalactiae*	20
2.3	Colonização materna por *Streptococcus agalactiae*	21
2.4.	Epidemiologia das infecções neonatais causadas por *Streptococcus agalactiae*	22
2.5.	Mecanismos de virulência e patogênese da infecção neonatal por *Streptococcus agalactiae*	23
2.6.	Manifestações clínicas decorrentes da infecção de neonatos por SGB	24
2.7.	Imunodeficiência neonatal e suscetibilidade à infecção por SGB	26
2.8.	Protocolo de prevenção da infecção neonatal por SGB	27
2.9.	Métodos de rastreamento para SGB em gestantes	28
2.10.	Profilaxia antimicrobiana para SGB	30
2.11.	Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de SGB	32
2.12.	Fenótipos e genes de resistência à eritromicina e clindamicina	32
3	**OBJETIVOS**	**34**
3.1.	Objetivo geral	34
3.2.	Objetivos específicos	34
4	**METODOLOGIA**	**35**
4.1.	Desenho do estudo	35
4.2	Cenário do estudo	35
4.3	Coleta de dados	36
4.4	Critérios de inclusão e exclusão	36
4.5	Coleta de amostras biológicas	37
4.6	Isolamento e identificação bacteriana	37
4.7	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	40
4.8	Determinação dos fenótipos de resistência à eritromicina	41
4.9	Determinação do perfil genético de resistência antimicrobiana	43

4.10 Retorno às participantes do estudo 44
4.11 Considerações éticas 44
5 REFERÊNCIAS 45
CAPITULO 1 52
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 77
APÊNDICE 1 79
APÊNDICE 2 81
APÊNDICE 3 82
ANEXO 1 83
ANEXO 2 87
ANEXO 3 89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Protocolo de antibioticoprofilaxia para infecções neonatais por SGB.....	31
Figura 2	Colônias de SGB não hemolíticas em meio Ágar sangue.....	39
Figura 3	Colônias de SGB hemolíticas em meio Ágar sangue (visão anterior da placa).....	39
Figura 4	Colônias de SGB hemolíticas em meio Ágar sangue (visão posterior da placa).....	39
Figura 5	Colônias de SGB em meio Cromogênico.....	39
Figura 6	Amostras de SGB positivas no teste de CAMP.....	39
Figura 7	Amostra de SGB positiva no teste de Sorogrupagem....	39
Figura 8	Fluxograma de procedimentos.....	40
Figura 9	D-teste negativo/Fenótipo cMLSB.....	42
Figura 10	D-teste positivo/Fenótipo iMLSB.....	42
Figura 1	Eletroforese em gel de agarose 2% para os isolados de SGB resistentes à eritromicina e clindamicina	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Interpretação das zonas de inibição para os antibióticos testados.....	41
Tabela 2	*Primers* usados para detecção de genes de resistência nas cepas de SGB positivas no teste fenotípico.....	43
Tabela 1	*Primers* usados para detecção de genes de resistência nas cepas de SGB positivas no teste fenotípico	61
Tabela 2	Resultados dos métodos de Isolamento e identificação para as amostras de secreção vaginal/retal de gestantes em atendimento pré-natal (n = 186).	62
Tabela 3	Comparação da identificação de SGB isolados de gestantes em atendimento pré-natal, em meio cromogênico, antes e após o Todd Hewitt.	63
Tabela 4	Comparação do isolamento de colônias sugestivas de SGB isoladas de gestantes em atendimento pré-natal, em ágar sangue, antes e após o Todd Hewitt.	63
Tabela 5	Comparação do isolamento de colônias sugestivas de SGB isoladas de gestantes em atendimento pré-natal, em ágar sangue e identificação em meio cromogênico, antes e após o Todd Hewitt.	64
Tabela 6	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para as comparações de metodologias realizadas (p valor < 0,05).	64
Tabela 7	Perfil de suscetibilidade das amostras de SGB isoladas de gestantes em atendimento pré-natal (n = 32).	65
Tabela 8	Diâmetros das zonas de inibição para eritromicina e clindamicina, resultado do D-teste, fenótipo de resistência e genes de resistência em amostras de SGB isoladas de gestantes em atendimento pré-natal (n = 08).	65

LISTA DE SIGLAS

SGB	*Streptococcus* do Grupo B
RN	Recém-nascido
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
AAP	American Academy of Pediatrics
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen
CO_2	Dióxido de Carbono
TGI	Trato gastrointestinal
TG	Trato genital
ITU	Infecção do trato urinário
BA	Bacteriúria assintomática
LCR	Líquido cefalorraquidiano
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
FR	Frequência respiratória
SP	Surfactante pulmonar
IL-1	Interleucina – 1
IL-6	Interleucina – 6
TNF-α	Fator de necrose tumoral *alfa*
PCR	Reação em cadeia da polimerase
EUA	Estados Unidos da América
µg	Micrograma
µl	Microlitro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
C	Celsius
h	Horas
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cMLSB	Fenótipo de resistência constitutiva à Macrolídeos, Lincosamidas e Streptogramina B
iMLSB	Fenótipo de resistência indutiva à Macrolídeos, Lincosamidas e Streptograminas B
M	Fenótipo de resistência apenas aos Macrolídeos
L	Fenótipo de resistência apenas às Lincosamidas
UBS	Unidades Básicas de Saúde
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFBA	Universidade Federal da Bahia
CAT	Campus Anísio Teixeira
IMS	Instituto Multidisciplinar em Saúde
BHI	Brain Heart Infusion (Caldo Infusão de cérebro e coração)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
VPP	Valor Preditivo Positivo

VPN	Valor Preditivo Negativo
CRO1	Semeadura direta em ágar cromogênico
CRO2	Semeadura em ágar cromogênico após incubação em caldo seletivo
AS1	Semeadura direta em ágar sangue de carneiro a 5%
AS2	Semeadura em ágar sangue de carneiro a 5% após incubação em caldo seletivo
SORO	Sorogrupagem
min	Minuto
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
UV	Ultravioleta
UTI	Unidade de terapia intensiva

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus agalactiae ou *Streptococcus* do grupo B (SGB) caracteriza-se como uma bactéria que se apresenta morfologicamente como cocos Gram positivos dispostos em cadeias, que possui o antígeno polissacarídico de parede celular do grupo B, segundo a classificação de Rebeca Lancefield (KONEMAN, 2008). Esse microrganismo faz parte da microbiota de membranas mucosas de humanos e animais, colonizando principalmente os tratos intestinal e geniturinário (HONIG; MOUTON; VAN DER MEIJDEN, 2002; MEEHAN et al., 2015). Em homens, mulheres não grávidas e crianças, costuma estar associado à cistite e pielonefrite, mas a maior relevância de SGB está na infecção em recém nascidos (BORGER et al., 2005; MONEY et al., 2013).

Na década de 1970, SGB emergiu como importante causador de meningite e sepse bacteriana em neonatos, sendo também causa frequente de pneumonia. Foi verificado que a colonização materna por SGB no trato gastrointestinal e geniturinário no momento do parto representa o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença e a maioria das infecções neonatais ocorre através da transmissão vertical da mãe colonizada para o recém nascido. Na década subsequente foi demonstrado que a prevenção da doença invasiva na primeira semana de vida pode ser feita através da identificação e tratamento da gestante colonizada (CDC, 2010; KROHN; HILLIER; BAKER, 1999; LEE; LAI, 2015; THE; ACADEMY; PEDIATRICS, 2011).

Diante deste cenário, vários profissionais e organizações de saúde reuniram esforços que culminaram na proposta de um protocolo de condutas em 1996 pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) e American Academy of Pediatrics (AAP). Esse protocolo admitia o uso de duas estratégias de prevenção para a doença estreptocócica precoce em recém nascidos. A primeira consistia no rastreamento universal das gestantes entre a 35ª e 37ª semana de gestação e no uso de antimicrobianos para as gestantes colonizadas no momento do parto, e a segunda estratégia se baseava na identificação dos fatores de risco

obstétrico durante o trabalho de parto (CDC, 2010; GROUP; DISEASE, 2011; THE; ACADEMY; PEDIATRICS, 2011).

Em 2002, o CDC validou o protocolo de prevenção propondo o rastreamento universal da colonização por SGB de todas as gestantes entre a 35ª e 37ª semana de gestação como a forma mais efetiva de prevenção da doença precoce por esse agente. A implementação dessa medida precoce de prevenção associada à instituição da antibioticoprofilaxia intraparto resultou em uma redução de aproximadamente 80% na incidência de sepse neonatal por SGB nos Estados Unidos (CDC, 2010; GROUP; DISEASE, 2011).

As recomendações do CDC para o rastreamento pré-natal da colonização por SGB já são seguidas em diversos países, existindo relatos de diminuição na incidência de doença estreptocócica precoce em neonatos após a elaboração de protocolos de triagem e tratamento para SGB (COSTA et al., 2010; FREITAS; ROMERO, 2017; LE DOARE; HEATH, 2013; MUKHOPADHYAY et al., 2014). Segundo recomendações do CDC (2010) o melhor método de prevenção para a doença estreptocócica precoce por SGB é o rastreamento através de cultura. A cultura deve ser realizada com a utilização de meios de enriquecimento seletivo como o caldo Todd Hewitt e posterior semeadura da amostra biológica em meio ágar sangue, efetuando a identificação da espécie por métodos consolidados como o teste CAMP e sorogrupagem. Entretanto outros métodos de identificação estão disponíveis como meios cromogênicos e métodos moleculares. Cada um desses métodos apresenta diferentes graus de sensibilidade e especificidade e a efetividade na detecção de SGB, assim como o custo de cada técnica, apresenta variações.

No Brasil, o rastreamento da colonização por SGB não faz parte do protocolo de assistência pré-natal proposto pelo Ministério da Saúde e tendo em vista a grande demanda de gestantes atendidas nos municípios do país, verifica-se a necessidade de implantação de uma estratégia de intervenção para prevenir os casos de infecção por SGB em recém- nascidos nos locais onde o rastreamento e prevenção ainda não são realizados (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Estudos realizados no Brasil e em várias outras regiões do mundo, demonstram que a maioria das cepas de SGB apresenta sensibilidade à penicilina, entretanto, alguns isolados com sensibilidade reduzida à penicilina

foram reportados (BANNO et al., 2014; DAHESH et al., 2008; DUTRA et al., 2014; KIMURA et al., 2008). Nas últimas décadas tem havido um incremento na prevalência de cepas resistentes à eritromicina e clindamicina em muitos países, essa prevalência varia em torno de 25% a 32% para eritromicina e de 13% a 20% para clindamicina. Esses dados sugerem que a utilização da eritromicina e da clindamicina, fármacos de segunda escolha para a antibioticoprofilaxia de SGB, deve ser acompanhada por testes de suscetibilidade para escolha da terapia mais apropriada. (CDC, 2010; MATANI et al., 2016; MELO et al., 2016; MOUSAVI et al., 2016; NUMANOVIĆ et al., 2017; PINHEIRO et al., 2009).

A resistência de SGB à eritomicina e clindamicina está relacionada aos genes *erm* que conferem o fenótipo de resistência MLSB (resistente à eritomicina - resistente à clindamicina), genes *mef* (*mef*A ou *mef*E) ou *msr*A que conferem o fenótipo de resistência M (resistente à eritromicina - suscetível à clindamicina) e ao gene linB (resistência somente à clindamicina) (BOLUKAOTO et al., 2015; FASSINA; PIMENTA-RODRIGUES, 2013). Esses genes de resistência são transferidos de uma bactéria à outra por meio de plasmídeos ou transposons (MATANI et al., 2016; MELO et al., 2016; PINHEIRO et al., 2009).

Nesse contexto, surge a presente proposta de comparação de metodologias de identificação, perfil de sensibilidade e determinação de genes de resistência das cepas de SGB isoladas de gestantes em acompanhamento pré-natal nas unidades básicas de saúde do Município de Vitória da Conquista-BA. O estudo pode ser útil para elaboração de um protocolo de rastreamento da colonização por SGB, bem como construção de protocolo terapêutico para as gestantes colonizadas baseado nos dados da população atendida atrelado à realidade terapêutica disponível. Os dados encontrados no estudo podem contribuir para minorar a colonização em gestantes no momento do parto, o que pode refletir não somente na diminuição da mortalidade infantil do município, como na diminuição de custos com internamentos prolongados de recém nascidos infectados por SGB.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Considerações sobre o gênero *Streptococcus*

As bactérias do gênero *Streptococcus* pertencem ao domínio Bacteria, filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales* e família *Streptococcaceae* (WHILEY; HARDIE, 2015). Cerca de 90 espécies compõem o gênero e se apresentam como cocos Gram positivos (0,5 a 2µm de diâmetro), dispostos aos pares ou em cadeias curtas em amostras clínicas e cadeias maiores em cultura. São catalase negativos, imóveis e não formam esporos (FASSINA; PIMENTA-RODRIGUES, 2013).

São microrganismos que apresentam exigências nutricionais complexas, portanto é de suma importância para o crescimento *in vitro* a utilização de meios de cultura enriquecidos pela adição de sangue, numa concentração de 5%. São anaeróbios facultativos e homofermentadores, sendo o ácido lático o produto final de fermentação da glicose, sem formação de gás. Algumas espécies do gênero se multiplicam mais rapidamente em atmosfera rica em dióxido de carbono (CO_2), em torno de 5 a 10% (KONEMAN, 2008).

Estreptococos podem ser classificados de acordo com a capacidade de lisar células sanguíneas por meio da produção de enzimas chamadas hemolisinas. Dependendo do tipo de hemólise observada em meio sólido, enriquecido com 5% de sangue de carneiro, podem ser classificados como beta hemolíticos - quando provocam a lise total das células sanguíneas, onde há formação de uma zona de cor amarelada ao redor da colônia; alfa hemolíticos - quando lisam de modo parcial as células, ocorrendo uma zona esverdeada ao redor da colônia e gama ou não hemolíticos - caracterizado pela ausência de hemólise sem modificação no meio em torno da colônia (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Em 1932 foi estabelecido por Rebeca Lancefield um sistema de classificação fenotípica em grupos sorológicos de acordo com a composição antigênica de polissacarídeos e ácidos lipoteicoicos da parede celular. Essa classificação inicialmente dividiu o gênero em cinco grupos sorológicos (A, B, C, D e E) (LANCEFIELD, 1932). Estudos posteriores ampliaram o número de grupos sorológicos e os estreptococos grupáveis que são causadores de

doenças em humanos pertencem aos grupos A, B, C, D, F e G. Os antígenos dos diferentes grupos sorológicos podem ser facilmente identificados por ensaios imunológicos e essa metodologia é amplamente aceita para identificação confirmatória dessas espécies (KONEMAN, 2008).

2.2. Características da espécie *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae possui características morfológicas e nutricionais peculiares ao gênero *Streptococcus*, apresentando variabilidade nas características hemolíticas, pois apesar de a grande maioria das cepas serem β-hemolíticas, um percentual de 11% pode ser não hemolítico (KONEMAN, 2008). A β-hemolisina é considerada um dos fatores de virulência mais importantes desse microrganismo, sendo a maioria das infecções invasivas causadas por cepas que a apresentam (SAGAR et al., 2013).

As colônias de SGB em ágar sangue de carneiro são pequenas, transparentes ou acinzentadas, podem apresentar ou não halo de β-hemólise. Embora muito importantes essas características coloniais não fornecem grande auxílio para a identificação, pois algumas espécies de *Enterococcus* apresentam características semelhantes. Entretanto, algumas características fisiológicas auxiliam na identificação de SGB sendo importante destacar que são incapazes de crescer na presença de bile, apresentam resistência ao antibiótico bacitracina, quase todas as cepas são resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim, hidrolisam o hipurato de sódio aos seus constituintes glicina e ácido benzóico e produzem um pigmento carotenóide vermelho-alaranjado em determinados meios de cultura como o caldo Granada (KONEMAN, 2008).

SGB secreta uma proteína denominada fator CAMP, descrito em 1944 por Christie, Atkins e Munch-Petersen (cujas iniciais deram origem à sigla CAMP) e essa propriedade é muito utilizada para sua identificação presuntiva (CHRISTINE; ATKINS; MUNCH-PETERSEN, 1944; KONEMAN, 2008). Esse fator exacerba a β-hemólise produzida por uma cepa padrão de *Staphylococcus aureus*, levando ao aparecimento de hemólise sinérgica em forma cabeça de seta em ágar sangue de carneiro ou ágar Todd Hewitt

sangue, quando esses dois microrganismos são semeados em forma de estrias perpendiculares (DARLING, 1975).

O antígeno do grupo B é um polissacarídeo composto por ramnose, N-acetil-glicosamina e galactose. Essa composição polissacarídica é comum a todos os membros do grupo B, entretanto a espécie *Streptococcus agalactiae* é, até o momento, a única espécie representante do grupo B de Lancefield causadora de doenças em humanos, as demais espécies do grupo são associadas a infecções em bovinos (CURTIS; KRAUSE; LOUIS, 1964; WHILEY; HARDIE, 2015).

Além do antígeno de parede celular grupo-específico, SGB possui antígenos capsulares polissacarídicos tipo-específicos e proteínas antigênicas. Esses microrganismos são sempre encapsulados e pertencem a um de dez sorotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX) (DUTRA et al., 2014; SLOTVED et al., 2007). Os tipos capsulares são constituídos de glicose, galactose, N-acetil-glicosamina e ácido N-acetil-neuramínico e a especificidade de sorotipo é determinada pelos diferentes arranjos destes quatro componentes em cada um dos dez tipos capsulares. Essa variedade de sorotipos são os principais fatores de virulência, que auxiliam na proteção das bactérias contra a opsonização, fagocitose subsequente e destruição intracelular (KONEMAN, 2008; SPELLERBERG, 2000). Em relação à distribuição global dos sorotipos, há uma prevalência geral de cinco sorotipos (Ia, Ib, II, III e V) que representam mais de 85% dos sorotipos em todas as regiões globais (BERARDI et al., 2015; SPELLERBERG, 2000). No Brasil, os sorotipos Ia, Ib, II, III e V também são os mais prevalentes, representando um percentual de 90% dos isolados (FIOLO et al., 2012). A identificação dos sorotipos é muito importante para estudos clínicos e epidemiológicos, além de serem alvos importantes para o desenvolvimento de estratégias vacinais (FIOLO et al., 2012; HEATH, 2016; KENCHINGTON; LAMONT, 2017).

2.3. Colonização materna por *Streptococcus agalactiae*

Apesar de poder ser isolado de material de orofaringe e amostras genitais masculinas, os principais reservatórios de SGB são o trato gastrointestinal (TGI) e trato genital feminino (TG). Na realidade, a colonização

genital reflete uma colonização do reto devido à proximidade anatômica desses órgãos (KONEMAN, 2008). A colonização vaginal é normalmente assintomática, embora tenham sido publicados relatos de vaginite devido à colonização maciça (SAVINI et al., 2013). SGB também figura como causador de várias formas de infecção do trato urinário (ITU), incluindo bacteriúria assintomática (BA), cistite e pielonefrite (LECLERCQ et al., 2016).

Estudos realizados em diferentes países, inclusive no Brasil, mostram que a prevalência de colonização por SGB em gestantes varia de 10-35% (BORGER et al., 2005; CDC, 2010; FUNÇÃO; NARCHI, 2013; LEE; LAI, 2015; MATANI et al., 2016; MENGIST; KANNAN; ABDISSA, 2016; NAJMI et al., 2013; OLIVEIRA; TELES; VIANA, 2013). A colonização pode ocorrer de forma crônica, intermitente ou transitória, e cerca de 60% das mulheres colonizadas são portadoras do microrganismo de forma intermitente (BERARDI et al., 2015; HANSEN et al., 2004).

A colonização do trato genital da gestante por SGB pode resultar em infecção do recém-nascido no momento do parto (HANSEN et al., 2004). A maioria das infecções acontece por ascensão da bactéria para o útero, atingindo o líquido amniótico, e a aspiração do líquido contaminado pela criança leva ao desenvolvimento da doença invasiva (CDC, 2010). A ruptura prematura das membranas amnióticas aumenta o risco de infecção, entretanto a penetração de SGB através de membranas intactas também pode ocorrer levando a quadros graves de infecção intra-uterina, trabalho de parto pré-termo, ruptura prematura das membranas, aborto e baixo peso ao nascer (SPELLERBERG, 2000). As complicações decorrentes da colonização por SGB não são restritas ao período gestacional, há relatos de associação de SGB a casos de endometrite, infecções da parede abdominal, abscessos pélvicos, tromboflebite pélvica, osteomielite e meningite (EL BEITUNE; DUARTE; MAFFEI, 2005; LE DOARE; HEATH, 2013).

2.4. Epidemiologia das infecções neonatais causadas por *Streptococcus agalactiae*

A transmissão vertical de SGB ocorre em cerca de 50% dos recém-nascidos de mães colonizadas (LE DOARE; HEATH, 2013; REINHEIMER et

al., 2016). Na ausência de profilaxia adequada, estima-se que de 1-4% de lactentes a cada 1000 nascidos vivos desenvolvam a doença que pode ocorrer de forma precoce ou tardia (LE DOARE; HEATH, 2013). A doença de início precoce representa aproximadamente 60-70% de todos os casos e os sorotipos Ia, II, III e V estão associados a essa forma da doença. Em contraste, a doença de início tardio é predominantemente causada pelo sorotipo III, e em até 50% dos casos se apresenta com meningite (LE DOARE; HEATH, 2013).

A doença de início precoce tem incidência que varia de 0,7 a 3,7 em cada 1000 nascidos vivos e está associada à aquisição de SGB *in utero* ou durante o período perinatal (LE DOARE; HEATH, 2013). Do total de recém-nascidos colonizados por SGB, cerca de 1-2% desenvolvem a forma precoce da doença que se inicia na primeira semana de vida (CDC, 2010; IROH TAM; DELAIR; OBARO, 2015). A taxa de mortalidade varia de 2-8% nos recém-nascidos prematuros, mais suscetíveis à doença (LE DOARE; HEATH, 2013).

A doença de início tardio ocorre com incidência de 0,5 a 1,8 em cada 1000 nascidos vivos, torna-se clinicamente evidente dentro de 7 dias a 3 meses, estando associada à aquisição no canal de parto ou por contaminação nosocomial ou comunitária pós parto (CDC, 2010; LE DOARE; HEATH, 2013). Na forma tardia a taxa de mortalidade associada é em torno de 10-15% (LE DOARE; HEATH, 2013).

Independente da forma de manifestação clínica da doença estreptocócica neonatal, as sequelas neurológicas crônicas são as principais e mais dispendiosas consequências entre os sobreviventes (KONEMAN, 2008). A meningite provocada por SGB é caracterizada por início agudo e progressão rápida com complicações em 62% dos pacientes após a hospitalização (ZENG et al., 2016).

2.5. Mecanismos de virulência e patogênese da infecção neonatal por *Streptococcus agalactiae*

Durante o curso da infecção, SGB coloniza e invade vários sítios do hospedeiro. A patogenicidade do microrganismo está associada a moléculas dispostas na superfície bacteriana ou liberadas no ambiente (SPELLERBERG, 2000). Apesar dos antígenos capsulares de SGB atuarem como importantes

fatores de virulência, esta é complexa e multifatorial. Há o envolvimento de diversos determinantes na adesão e invasão de células do hospedeiro, bem como na evasão do sistema imunológico, sobretudo através de mecanismos que prejudicam a opsonização e fagocitose (DUTRA et al., 2014; MELIN, 2011).

A cápsula constitui o fator de virulência mais importante de SGB por inibir a ligação do fator C3b do complemento ativado à superfície da bactéria, impedindo a ativação da via alternativa do complemento (SPELLERBERG, 2000). Os danos pulmonares e cerebrais provocados por SGB decorrem principalmente da ação citopática da β-hemolisina nas células epiteliais pulmonares e endoteliais do cérebro e a grande maioria das infecções invasivas são causadas por cepas β-hemolíticas (BARNETT et al., 2015; SAGAR et al., 2013; SPELLERBERG, 2000). O fator CAMP produzido por SGB além de provocar lise na membrana de eritrócitos, apresenta interação com a porção Fc de IgM e IgG humanas (SPELLERBERG, 2000).

Estudos demonstraram que a proteína de ligação ao fibrinogênio denominada FbsC é necessária para invasão eficiente de SGB em células humanas e espécies reativas de oxigênio produzidas por SGB estão envolvidas na indução de apoptose em células epiteliais respiratórias humanas (BUSCETTA et al., 2014; EMY NAGAO et al., 2016). Além disso, diversas proteínas como Cα, Cβ, Rib, a proteína de ligação à laminina, algumas enzimas tais como a peptidase C5a, hialuronidases e toxinas estão associadas com virulência em SGB (BERARDI et al., 2015; UDO; BOSWIHI; AL-SWEIH, 2013). A peptidase C5a é uma proteína de superfície que cliva o componente quimiotático C5a do complemento e causa recrutamento leucocitário deficiente para os locais de infecção (SPELLERBERG, 2000).

2.6. Manifestações clínicas decorrentes da infecção de neonatos por SGB

O quadro clínico correlacionado com SGB pode variar desde uma bacteremia assintomática à sepse, muitas vezes de evolução para óbito. A sintomatologia da infecção precoce é inespecífica, podendo se apresentar com taquipneia (Frequência respiratória ≥ 50/min), distensão abdominal, letargia,

recusa alimentar, icterícia, hipotermia e má perfusão periférica (GRASSI; DINIZ; VAZ, 2001). A sintomatologia inespecífica aliado às diferentes formas clínicas torna difícil o diagnóstico da doença estreptocócica neonatal.

A infecção por SGB em 60-80% dos casos manifesta-se nas primeiras 24 horas de vida e geralmente tem como apresentação inicial um quadro de pneumonia extensa e com evolução grave. O quadro clínico inclui também bacteremia, meningite e sepse (GRASSI; DINIZ; VAZ, 2001). A colonização da mucosa pulmonar do neonato é rapidamente seguida pelo desenvolvimento de pneumonia e a ruptura da barreira da mucosa leva à sepse grave (FREITAS; ROMERO, 2017; GIANNONI et al., 2016; SPELLERBERG, 2000). Os sintomas e achados radiográficos são indistinguíveis da doença de membranas hialinas e o exame patológico de amostras de pulmões revela inúmeras bactérias e fibrina nas membranas (SPELLERBERG, 2000). A deficiência de surfactante pulmonar (SP) ocorre de forma secundária à infecção por SGB, o que interfere na sua função levando a aumento da tensão superficial dentro do alvéolo. Já foi demonstrado que a deficiência de SP parece contribuir para a evolução fatal da infecção por SGB. Além disso, outro achado relevante é que recém-nascidos (RN) com pneumonia por SGB tendem ao declínio da série branca com desenvolvimento de neutropenia (GRASSI; DINIZ; VAZ, 2001).

Sepse por SGB ocorre após a invasão intravascular de bactérias e falha do hospedeiro para eliminar o patógeno. O quadro clínico se caracteriza por alterações hemodinâmicas extensas que levam a diminuição do débito cardíaco, acidose metabólica e falência múltipla de órgãos. As alterações hemodinâmicas observadas são mediadas através de tromboxanos A2 e B2 e metabólitos de prostaciclinas, sendo a hipertensão pulmonar o achado mais proeminente. Em lactentes com doença invasiva por SGB observa-se uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-1, IL-6 e TNF-α (SPELLERBERG, 2000). O leucograma apresenta baixa sensibilidade e especificidade no diagnóstico da sepse neonatal e é difícil diferenciar a sepse por SGB de outras doenças infecciosas (GRASSI; DINIZ; VAZ, 2001).

A meningite é o achado clínico predominante em casos da doença de início tardio (LEVY et al., 2015). As bactérias deixam os capilares cerebrais, entram no líquido céfalo raquidiano (LCR) e iniciam cascata inflamatória no espaço subaracnóideo. A parede celular da bactéria Gram-positiva induz

potente liberação e transmigração de citocinas e leucócitos polimorfonucleares para o LCR. O fluxo sanguíneo cerebral é alterado, ocorrendo isquemia. Essas mudanças circulatórias em paralelo com a resposta inflamatória resultam em danos neuronais permanentes (SPELLERBERG, 2000).

O diagnóstico da infecção neonatal pode ser realizado por meio da identificação do agente infeccioso ou pela detecção de antígeno no sangue, urina, LCR, secreção traqueal, secreção faríngea ou aspirado gástrico. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada no sangue e na urina, demonstrando elevadas sensibilidade e especificidade no diagnóstico (GRASSI; DINIZ; VAZ, 2001).

2.7. Imunodeficiência neonatal e suscetibilidade à infecção por SGB

O sistema imunológico neonatal possui limitações que o torna mais suscetível à infecção por SGB. Além disso, SGB exibe capacidade para burlar as defesas devido às suas estratégias de invasão e fatores de virulência. O fato de que SGB também está associado a infecções em idosos e indivíduos imunocomprometidos demonstram que as condições ideais para a patogênese da infecção ocorrem quando o sistema de defesa está comprometido (KORIR; MANNING; DAVIES, 2017).

O sistema imune adaptativo tem exposições limitadas a antígenos *in utero* e os neonatos dependem principalmente do sistema imune inato para responder a patógenos. De maneira primordial, o neonato depende da transferência materna de anticorpos para sua defesa, pois há uma carência de células imunes de memória preexistentes (KORIR; MANNING; DAVIES, 2017).

O sistema imune relativamente subdesenvolvido inclui um número reduzido de células imunes disponíveis que podem estar presentes em populações diferentes e em diferentes locais em relação às populações de células imunes adultas. Além disso, as células de defesa por diversas razões são ineficientes em combater a infecção (KUMAR; BHAT, 2016).

Em recém nascidos prematuros, o risco de infecção é ainda maior, pois a transferência de anticorpos maternos anti-polissacarídeos capsulares ocorre principalmente nas últimas oito semanas de gestação (GRASSI; DINIZ; VAZ, 2001; KUMAR; BHAT, 2016). Neste caso, observa-se uma população

diminuída de macrófagos alveolares fazendo com que exista maior chance de quadros de pneumonia decorrente da infecção por SGB (SPELLERBERG, 2000). A menor concentração de imunoglobulinas da classe IgG aliada à imaturidade anatômica, bioquímica e imunológica pulmonar do recém nascido, particularmente daqueles de muito baixo peso, favorecem a multiplicação rápida de SGB e a evolução da doença (GRASSI; DINIZ; VAZ, 2001).

2.8. Protocolo de prevenção da infecção neonatal por SGB

Os primeiros relatos da doença estreptocócica em recém nascidos ocorreram na década de 70 nos EUA e nesta época a evolução para mortalidade acontecia em até 50% dos casos. Na década de 80 diversos estudos clínicos demonstraram que a administração de antibióticos intravenosos às gestantes colonizadas durante o trabalho de parto poderia prevenir a doença invasiva na primeira semana de vida. Na década de 90 houve redução significativa nas taxas de mortalidade pela doença com a emissão das recomendações para a profilaxia intraparto pelo ACOG, CDC e AAP (CDC, 2010; THE; ACADEMY; PEDIATRICS, 2011).

A redução nas taxas de mortalidade a partir da década de 90 nos EUA foi resultado dos grandes avanços nos cuidados de neonatalogia e dos esforços coletivos de diversos profissionais e organizações de saúde que resultaram na elaboração em 1996 de um protocolo de condutas para a profilaxia da doença estreptocócica neonatal precoce. Esse protocolo admitia duas estratégias, a primeira consistia no rastreamento universal de todas as gestantes no terceiro trimestre de gestação e no uso de antibióticos no momento do parto para as gestantes colonizadas. A segunda estratégia era baseada na identificação dos fatores de risco obstétricos durante o trabalho de parto, sendo eles: febre intraparto, ruptura prematura de membranas (antes de 37 semanas), tempo de ruptura das membranas amnióticas igual ou superior a 18 horas, ocorrência de ITU por SGB durante a gestação ou doença estreptocócica em recém nascidos anteriores (CDC, 2010; FREITAS; ROMERO, 2017; MELIN, 2011).

Em 2002, o CDC, endossado pela AAP e pelo ACOG, validou o protocolo de prevenção da infecção neonatal por SGB, propondo o

rastreamento universal de todas as gestantes entre a 35ª e a 37ª semanas através de cultura como a forma mais efetiva de prevenção da sepse por esse agente, já que metade dos casos de sepse precoce em recém-nascidos ocorria sem relação com os fatores de risco (FUNÇÃO; NARCHI, 2013). Ressalta-se que após 2002, houve redução de 30% na incidência de doença invasiva nos EUA. Entretanto no Brasil esse rastreamento ainda não faz parte do protocolo de assistência pré-natal proposto pelo Ministério da Saúde (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Dessa forma, a adoção da profilaxia acaba sendo baseada nos fatores de risco na maioria dos serviços de saúde, pois são poucos os municípios do Brasil que adotam as recomendações do CDC, fazendo uso de protocolos de rastreamento e profilaxia.

2.9. Métodos de rastreamento para SGB em gestantes

A identificação de gestantes colonizadas por *S. agalactiae* deve ser realizada seguindo as recomendações do CDC que aponta que o melhor método de prevenção para a doença estreptocócica precoce por SGB é o rastreamento através de cultura de todas as gestantes com o posterior estabelecimento de antibioticoterapia profilática para as gestantes colonizadas (CDC, 2010; GROUP; DISEASE, 2011; THE; ACADEMY; PEDIATRICS, 2011). Entretanto para que esse método apresente a sensibilidade esperada, é necessário considerar vários fatores relacionados com a coleta do material, transporte e métodos microbiológicos a serem utilizados (BORGER et al., 2005; COSTA et al., 2010).

Como o estado de colonização pode variar durante a gravidez, o momento para a coleta da amostra é importante. A colonização no início da gestação pode ser transitória e não é capaz de predizer a doença precoce por SGB em neonatos, ao passo que a gestante pode não estar colonizada no início da gestação, mas passar a estar no último trimestre. Diante disso, a colonização no terceiro trimestre é utilizada como indicativo da colonização intraparto e a triagem para SGB é indicada para ocorrer entre a 35ª e 37ª semana de gestação (CDC, 2010).

O protocolo de cultura recomendado pelo CDC envolve a coleta de amostra do terço médio inferior da vagina e da região anorretal, já tendo sido

demonstrado que amostras obtidas apenas da região vaginal apresentam um índice de positividade menor (CDC, 2010; EL BEITUNE; DUARTE; MAFFEI, 2005). As amostras devem ser colhidas com *swab* de algodão estéril, podendo ser um único *swab* ou um para cada sítio anatômico. O uso de semeadura imediata do swab ou semeadura tardia não altera a taxa de detecção de SGB, desse modo, após a coleta as amostras devem ser transportadas em meio de transporte semi-sólido como o Amies ou Stuart para garantir a viabilidade do material por até 24 horas, tendo em vista que dificilmente é possível realizar o processamento imediato (CRISP et al., 1998; ROSA-FRAILE et al., 2005; TEESE et al., 2003).

Para aumentar a sensibilidade da cultura, inicialmente as amostras devem ser inoculadas em um meio de cultura enriquecido e seletivo para SGB, sendo o caldo Todd Hewitt o mais utilizado para essa finalidade. O período de incubação deve ser entre 18-24 horas a 35-37°C. O caldo Todd Hewitt tem em sua formulação os antibióticos gentamicina (8 µg/ml) e ácido nalidíxico (15 µg/ml), agentes antimicrobianos que inibem o crescimento da maioria dos microrganismos Gram-negativos encontrados na microbiota vaginal e retal, e dessa forma, tornam o caldo seletivo para o isolamento de SGB. A utilização desse meio incrementa em até 50% a detecção de gestantes colonizadas quando comparado com o cultivo diretamente na placa de meio de cultura (DÍAZ; NIEVES, 2008).

Após incubação no meio seletivo, a amostra da gestante deve ser semeada em ágar sangue de carneiro em atmosfera de 5% de carbono por 24 horas. A observação do crescimento de colônias pequenas, acinzentadas, com halo discreto de β-hemólise ou sem hemólise, as características após a coloração de Gram, teste da catalase negativo e prova de CAMP positiva, sugerem de forma presuntiva que o microrganismo em questão se trata de SGB. Entretanto para identificação confirmatória da espécie é necessário submeter as colônias a um ou mais testes confirmatórios, sendo a determinação do antígeno do grupo B através de testes de aglutinação em látex a metodologia mais utilizada. Esse teste apresenta sensibilidade e especificidade em torno de 100%, contudo quando é realizado diretamente da amostra clínica, antes da cultura, apresenta sensibilidade de apenas 65%(EL

BEITUNE; DUARTE; MAFFEI, 2005; FASSINA; PIMENTA-RODRIGUES, 2013).

Apesar de o ágar sangue ser amplamente utilizado para cultura de SGB, foi demonstrado que a sensibilidade é de 78% em comparação a meios cromogênicos como o ChromID^{TM} strepto B da bioMérieux que apresenta sensibilidade de 100% (MORITA et al., 2014; SALEM; ANDERSON, 2015). Esse método tem como princípio a caracterização do microrganismo por sistemas enzimáticos que metabolizam o substrato para liberar o cromógeno, permitindo que a bactéria exiba uma coloração típica. Além da alta taxa de detecção, a utilização do meio cromogênico confere benefícios adicionais como a fácil visualização das colônias em comparação com o ágar sangue, pois as bactérias diferentes de SGB exibem colorações distintas ou são inibidas por antibióticos. Outra vantagem seria a detecção de cepas hemolíticas e não hemolíticas através de uma única coloração de colônia, evitando confundimento das cepas não hemolíticas com outras espécies de microrganismos. Por fim as placas de meio cromogênico não necessitam ser incubadas em ambiente anaeróbico (MORITA et al., 2014).

A detecção das gestantes colonizadas pode ser feita no momento do parto através de métodos de biologia molecular como PCR em tempo real, com a vantagem de detecção diretamente da amostra clínica. O teste Xpert® GBS da Cepheid é um exemplo de teste rápido para triagem intraparto, que fornece resultados positivos em 35 minutos e negativos em 52 minutos com 91,9% de sensibilidade e 95,6% de especificidade. Apesar da sensibilidade e especificidade elevadas, devido aos altos custos, métodos como esse ainda não são muito utilizados na prática clínica (GAVINO; WANG, 2007; MONEY et al., 2013).

2.10. Profilaxia antimicrobiana para SGB

A profilaxia antimicrobiana intravenosa intraparto das gestantes colonizadas é indicada para prevenir a transmissão vertical de SGB e já foi demonstrada sua eficácia na prevenção da doença estreptocócica precoce (BOYER; GOTOFF, 1986). A quimioprofilaxia consiste na administração de antibióticos às gestantes no período de 2-4 horas antes do parto e visa

alcançar níveis adequados na circulação fetal e líquido amniótico, sem causar efeitos neurotóxicos na mãe e no feto (CDC, 2010).

Como a maioria das cepas de SGB é uniformemente suscetível às penicilinas, o fármaco de primeira escolha é a penicilina G, pois o seu estreito espectro de ação diminui o risco de pressão seletiva sobre outros microrganismos, apesar de também poder ser utilizada a ampicilina (MONEY et al., 2013). Para gestantes alérgicas à penicilina e quando o risco de anafilaxia é baixo, a cefotaxima é recomendada. Mas quando o risco de anafilaxia é alto, clindamicina e eritromicina são os fármacos de escolha. Caso a gestante seja alérgica à penicilina e a cepa de SGB identificada seja resistente à eritomicina e clindamicina, ou quando a suscetibilidade a essas drogas é desconhecida, a vancomicina deve ser utilizada (MELO et al., 2016). Esse protocolo terapêutico está demonstrado abaixo, na figura 1.

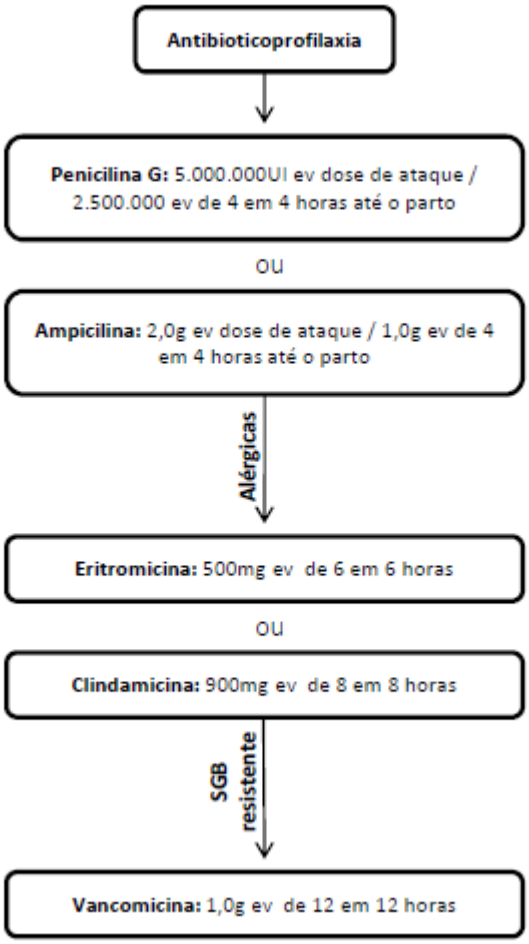


Figura 1 - Protocolo de antibioticoprofilaxia para infecções neonatais por SGB.

2.11. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de SGB

A maioria das cepas de SGB apresenta sensibilidade à penicilina, entretanto, alguns isolados com sensibilidade reduzida a este antimicrobiano foram reportados (BANNO et al., 2014; DAHESH et al., 2008; DUTRA et al., 2014; KIMURA et al., 2008). Nas últimas décadas tem havido um incremento na prevalência de cepas resistentes à eritromicina e clindamicina em muitos países. Essa prevalência varia em torno de 25% a 32% para eritromicina e de 13% a 20% para clindamicina. Devido à alta prevalência de cepas de SGB resistentes a esses antimicrobianos, diminuem as opções terapêuticas para realização da antibioticoprofilaxia e cada vez mais é necessário lançar mão do uso de antimicrobianos de maior espectro, que exercem pressão seletiva sobre outros microrganismos, contribuindo ainda mais para o aumento da resistência antimicrobiana (CDC, 2010; MATANI et al., 2016; MELO et al., 2016; MOUSAVI et al., 2016; NUMANOVIĆ et al., 2017; PINHEIRO et al., 2009).

A resistência à eritromicina tem sido mais associada a isolados de SGB do sorotipo V (FRÖHLICHER et al., 2014; SENDI; FRÖHLICHER, 2015). Até o momento, não tem sido evidenciadas cepas de SGB resistentes à vancomicina (FASSINA; PIMENTA-RODRIGUES, 2013; MENGIST; KANNAN; ABDISSA, 2016; MOUSAVI et al., 2016).

Até que uma vacina segura e eficaz seja desenvolvida, é necessário monitorar as possíveis consequências da antibioticoprofilaxia intraparto como o surgimento de resistência de cepas de SGB à penicilina e a transferência de genes de resistência de SGB através de plasmídeos e transposons para outros microrganismos, alterando o microbioma neonatal e aumentando o número de mortes por outros patógenos neonatais (BERARDI et al., 2015; CDC, 2010; EMANEINI et al., 2016).

2.12. Fenótipos e genes de resistência à eritromicina e clindamicina

A resistência de SGB à eritomicina está relacionada a dois mecanismos diferentes. O primeiro é a metilação do RNA ribossômico 23S por metilases específicas codificadas por genes *erm*. Essa metilação bloqueia a ligação da eritomicina com a subunidade ribossomal 50S, conferindo o fenótipo de resistência MLSB (resistente à eritomicina - resistente à clindamicina), cuja

expressão fenotípica pode ser indutível ou constitutiva. O segundo mecanismo de resistência é uma bomba de efluxo, que retira o fármaco ativamente do microrganismo, codificada pelos genes *mef* (*mef*A ou *mef*E) ou *msr*A, que confere o fenótipo de resistência M (resistente à eritromicina - suscetível à clindamicina). A resistência somente à clindamicina é pouco frequente e está associada ao gene linB, o qual codifica uma nucleotidiltransferase que inativa o antibiótico por adenilação (BOLUKAOTO et al., 2015; FASSINA; PIMENTA-RODRIGUES, 2013). Esses genes de resistência são transferidos de uma bactéria à outra por meio de plasmídeos ou transposons (MATANI et al., 2016; MELO et al., 2016; PINHEIRO et al., 2009).

Apesar da relevância do impacto clínico e epidemiológico das infecções neonatais por SGB e das tendências de aumento de resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento dessas infecções, ainda não existem muitos trabalhos demonstrando o perfil de sensibilidade das cepas nos diferentes municípios brasileiros. O que há disponível são publicações internacionais e poucos estudos sobre o perfil de sensibilidade das cepas de SGB em algumas regiões brasileiras isoladas. Diante disso, destaca-se a importância da monitorização em âmbito local das características fenotípicas e genotípicas de sensibilidade das cepas de SGB circulantes para verificar se os achados são compatíveis com a literatura e escolha da terapia mais adequada, baseada nos dados da população em questão.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Comparar metodologias para o isolamento e identificação, avaliar o perfil de suscetibilidade fenotípico e genotípico aos antimicrobianos em cepas de SGB isoladas de gestantes atendidas nas Unidades Básicas de Saúde do município de Vitória da Conquista-BA.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, custo, complexidade de realização, tempo de execução e qualidade nos resultados para as diferentes metodologias de isolamento e identificação de SGB, incluídas no estudo.
- Avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos através de método fenotípico das cepas de SGB isoladas das gestantes incluídas no estudo.
- Verificar os fenótipos de resistência (MLSBc, MLSBi, Fenótipo M e Fenótipo L) para as cepas resistentes à eritromicina e/ou clindamicina.
- Determinar a presença dos genes de resistência à eritromicina (*erm*B, *erm*TR e *mef*A) e clindamicina (*lin*B).

4 METODOLOGIA

4.1. Desenho do estudo

Os dados utilizados para esse trabalho foram extraídos do projeto de pesquisa intitulado "*Streptococcus agalactiae",* que trata-se de um estudo transversal quantitativo e que teve como objetivo principal estimar a prevalência de colonização e avaliar o perfil de sensibilidade de cepas de *S. agalactiae* em gestantes atendidas no pré-natal de unidades básicas de saúde da zona urbana de vitória da conquista, utilizando um estudo comparativo de metodologias para isolamento e identificação de SGB. Como parte do estudo principal, o presente estudo objetiva contribuir fazendo comparação de metodologias de identificação de SGB, além de verificar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de SGB encontradas.

Antecedente ao presente estudo foi realizado estudo piloto no ano de 2012 no Hospital Esaú Matos, situado no município de Vitória da Conquista, com a finalidade de verificar a prevalência de colonização por SGB nas gestantes do ambulatório de pré-natal de alto risco desse hospital, tendo também como objetivo verificar a adequação dos procedimentos para que as adaptações necessárias fossem realizadas. A prevalência de colonização por SGB encontrada no estudo piloto foi de 17,4%.

4.2. Cenário do estudo

Vitória da Conquista é um município pertencente ao estado da Bahia com uma população de 348.718 habitantes, segundo estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em levantamento realizado no ano de 2017. Os dados demográficos fazem do município o terceiro maior do estado da Bahia. Segundo o DATASUS o número de partos realizados no município no ano de 2017 foi de Cinco mil duzentos e noventa e oito (5.298) e mesmo realizando um grande número de partos, trata-se de um município que não implantou no segmento pré-natal a triagem para SGB.

No projeto *Streptococcus agalactiae* a amostra para a realização do estudo foi composta por 209 gestantes atendidas em nove Unidades Básicas de Saúde (UBS), selecionadas de forma a representar todas as regiões

geográficas da zona urbana do município. As unidades de saúde selecionadas foram: UBS Nelson Barros, UBS Nestor Guimarães, UBS Régis Pacheco, UBS da Vila Serrana, UBS do Miro Cairo, UBS da Urbis V, Policlínica de Atenção Básica Dr. Admário Silva Santos, UBS da Vila Serrana e CAE II. O cálculo amostral foi obtido levando em consideração os 5170 partos realizados no município no ano de 2015 e a prevalência de colonização de 17% encontrada no estudo piloto realizado por Oliveira et al (2013), com admissão de um erro de 5% e intervalo de confiança de 95%. Para realização do presente trabalho, o tamanho amostral foi constituído por amostras de 186 gestantes incluídas no projeto *Streptococcus agalactiae.*

4.3. Coleta de dados

Os dados do estudo foram colhidos entre os meses de Janeiro de 2017 a fevereiro de 2018 de gestantes em atendimento pré-natal nas UBSs acima mencionadas, que aceitaram participar do estudo de forma voluntária.

Antes da coleta de dados, foram apresentados os objetivos do estudo com linguagem adequada às participantes do mesmo, seguido da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1). Todas as participantes do estudo também responderam a um questionário com 12 questões que foi aplicado com a finalidade de obter informações referentes à saúde e condições socioeconômicas das gestantes, buscando a identificação da participante, idade, etnia, peso, idade gestacional, escolaridade, renda familiar, número de gestações anteriores, fatores de risco para colonização por SGB e patologias presentes (Apêndice 3). O banco de dados do projeto principal foi construído em planilhas do pacote *Microsoft Office Excel* 2007 e as análises estatísticas: descritiva, univariada e multivariada foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico EPI-INFO versão 3.5.1.

4.4. Critérios de inclusão e exclusão

Foram critérios de inclusão para a seleção: gestantes com 32 a 40 semanas de gestação e provenientes da zona urbana do município. Para exclusão foram utilizados os seguintes critérios: gestantes fora do período

gestacional adequado, que utilizaram antibióticos nos últimos 7 dias antecedentes à coleta e que eram residentes na zona rural.

4.5. Coleta de amostras biológicas

As coletas das amostras biológicas ocorreram nos consultórios das unidades de saúde selecionadas para o estudo e foram realizadas pelos profissionais responsáveis pelo atendimento pré-natal durante as consultas, com treinamento prévio ou pelos profissionais responsáveis pelo estudo.

As amostras biológicas foram colhidas com um único *swab* vaginal/retal, sem a utilização de espéculo, colhendo primeiro material da região do terço médio inferior da vagina seguido da coleta de material da região perianal, respeitando rigorosamente essa ordem. As amostras foram acondicionadas em meio de transporte Stuart e transportadas em caixas para material biológico em temperatura ambiente até o processamento no laboratório, em intervalos de tempo inferiores a 8 horas após a coleta.

As amostras coletadas foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal da Bahia – Campus Anísio Teixeira/ Instituto Multidisciplinar em Saúde (UFBA – IMS/CAT), situado no mesmo município da coleta de dados para realização das análises.

4.6. Isolamento e Identificação bacteriana

As amostras foram semeadas por esgotamento no meio cromogênico para *Streptococcus* chromID^{TM} Strepto B (BIOMERIÉUX) e também em ágar sangue de carneiro a 5% e incubadas na temperatura de 35-37°C por 24 horas. As amostras semeadas em ágar sangue foram incubadas com atmosfera de 5% de CO_2. Depois disso, o *swab* contendo a amostra foi incubado no caldo Todd Hewitt (BIOMERIÉUX) a 35-37°C por 24 horas.

Para as culturas de ágar sangue nas quais ocorreu crescimento de colônias sugestivas de SGB, pequenas, com padrão acinzentado, circundadas por halo discreto de β-hemólise ou sem hemólise (conforme as figuras 2, 3 e 4), essas colônias foram submetidas ao teste de catalase, coloração de Gram convencional e análise microscópica. Para essas colônias não foram realizados testes de identificação confirmatórios para SGB devido à escassez de recursos

e por ser o método recomendado pelo CDC para o isolamento. Desse modo, a observação de colônias sugestivas de SGB no ágar sangue foi comparada ao resultado final para os isolados confirmados por sorogrupagem.

Para as culturas em ágar cromogênico quando observado o crescimento de colônias róseas ou avermelhadas (figura 5) que, conforme as orientações do fabricante, foram identificadas como colônias de SGB (ANEXO 1). Essas colônias foram submetidas ao teste de CAMP utilizando o KIT composto por ágar Todd Hewitt e Hemolisinabac (PROBAC DO BRASIL) como ilustrado na figura 6 e sorogrupagem utilizando o KIT SLIDEX® Strepto Plus B (BIOMERIÉUX) para confirmação da espécie como mostra a figura 7.

Após a incubação do *swab* contendo a amostra no caldo Todd Hewitt a 35-37°C por 24 horas, esse *swab* era novamente semeado em ágar cromogênico e ágar sangue e realizada a incubação a 35-37°C por 24 horas. Para as culturas de ágar sangue após o Todd Hewitt nas quais ocorreu crescimento de colônias sugestivas de SGB, essas colônias também foram submetidas ao teste de catalase, coloração de Gram e análise microscópica. Para as amostras em que houve crescimento de colônias róseas ou avermelhadas no ágar cromogênico após o Todd Hewitt também eram realizados os testes de CAMP e sorogrupagem para confirmação do resultado.

Para toda amostra com identificação de SGB, era dado encaminhamento para realização do antibiograma e colônias do microrganismo eram encaminhadas para armazenamento sob refrigeração a -20°C utilizando o caldo BHI com adição de glicerol a 15% para análises posteriores. O fluxograma dos procedimentos está ilustrado na figura 8.

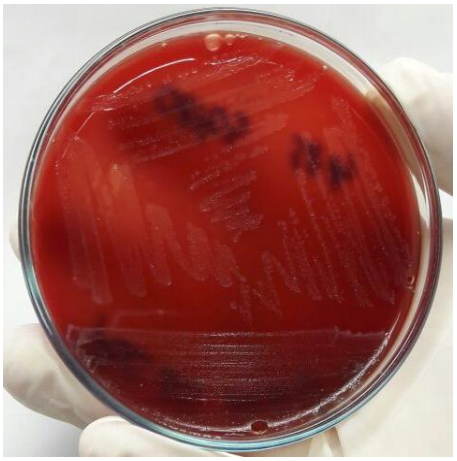


Figura 2 – Colônias de SGB não hemolíticas em Ágar sangue

Figura 3 – Colônias de SGB hemolíticas em Ágar sangue (visão anterior da placa)

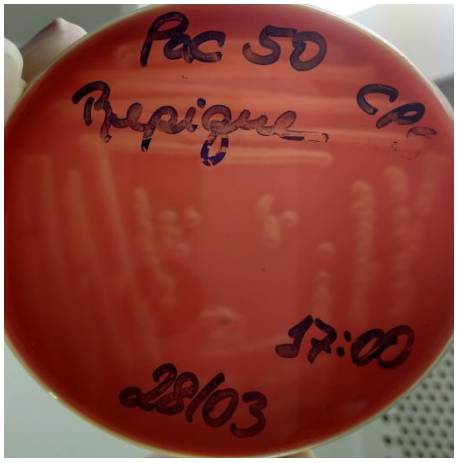


Figura 4 – Colônias de SGB hemolíticas em Ágar sangue (visão posterior da placa)

Figura 5 – Colônias de SGB em Ágar Cromogênico

Figura 6 – Amostras de SGB positivas no teste de CAMP

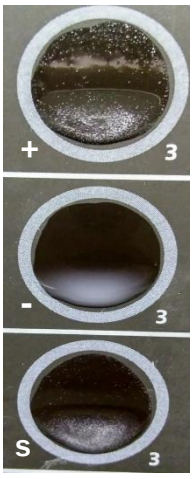


Figura 7 – Amostra de SGB positiva no teste de Sorogrupagem

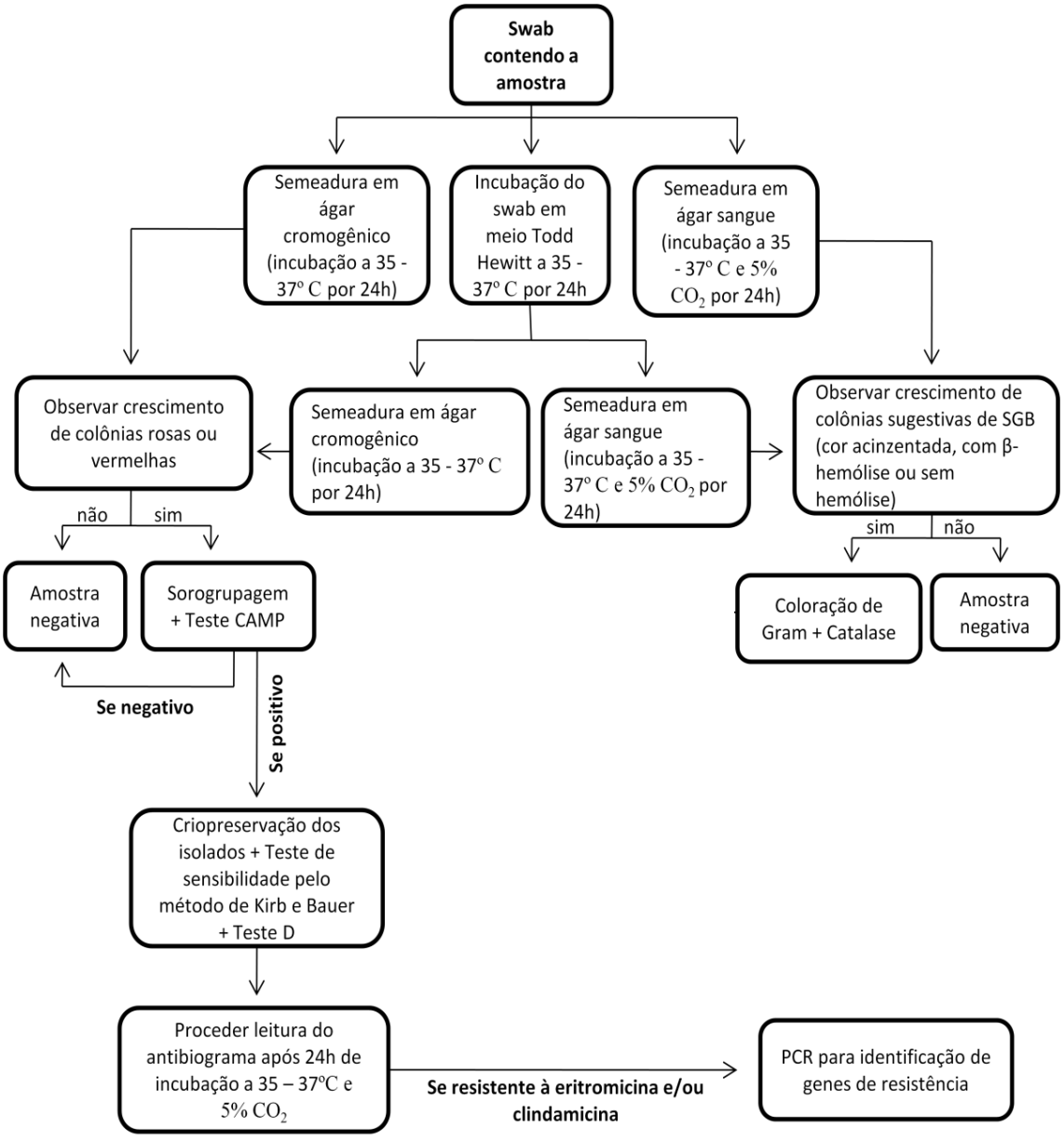


Figura 8 – Fluxograma de procedimentos

Ao final da coleta de todas as amostras, os resultados do isolamento e identificação por todas essas metodologias foram comparadas levando em consideração a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, custo, complexidade de realização, tempo de execução e qualidade nos resultados.

4.7. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

Para todas as amostras em que houve confirmação da espécie em pelo menos um dos testes utilizados (ágar cromogênico, CAMP e sorogrupagem) foi

dado encaminhamento para determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pela técnica de difusão em disco (Kirby e Bauer), conforme o manual do *Clinical and Laboratory Standards Institute* ((CLSI), 2017).

Para a realização da técnica foi utilizado o meio de cultura ágar Mueller Hinton suplementado com sangue de carneiro a 5%, distribuído em placas de Petri de 150mm x 90mm. A partir das culturas recentes foram preparadas suspensões das amostras bacterianas em solução fisiológica (0,9%) estéril, com uma turvação equivalente a 0,5 na escala de Mac Farland. A suspensão bacteriana foi semeada no meio de cultura com um *swab* por disseminação e os discos com antimicrobianos a serem testados foram distribuídos com o auxílio de uma pinça estéril. As placas foram incubadas à temperatura de 35-37ºC a 5% CO_2. A leitura foi realizada após 18 a 24 horas de incubação. Os halos de inibição do crescimento foram medidos e interpretados de acordo o CSLI – 2017, como ilustrado na tabela 1.

A escolha dos antibióticos foi feita de acordo com as recomendações do CLSI – 2017 e para escolha dos antimicrobianos dentro das classes recomendadas pelo CLSI foi levada em consideração a disponibilidade dos mesmos no elenco de antimicrobianos na rede pública de saúde do município de Vitória da Conquista.

Tabela 1 – Interpretação das zonas de inibição para os antibióticos testados.

		Interpretação do diâmetro das zonas de inibição (mm)		
Antibiótico	**Concentração**	**Sensível**	**Intermediário**	**Resistente**
Penicilina	10 unidades	≥24	-	-
Ampicilina	10 µg	≥24	-	-
Cefotaxima	30 µg	≥24	-	-
Eritromicina	15 µg	≥21	16-20	≤15
Clindamicina	2 µg	≥19	16-18	≤15
Vancomicina	30 µg	≥17	-	-

Fonte: Adaptado de CLSI (2017)

4.8. Determinação dos Fenótipos de Resistência à Eritromicina

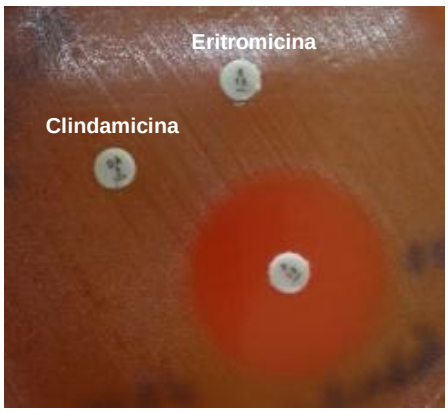
A determinação dos fenótipos de resistência à eritromicina foi realizada em paralelo ao teste de sensibilidade aos outros antimicrobianos, utilizando discos comerciais de Eritromicina (15µg) e Clindamicina (2µg) colocados sobre a placa de ágar Mueller Hinton e distantes um do outro por 12mm ((CLSI),

2017). As placas foram incubadas a 35-37ºC a 5% CO_2 e observadas após 24 horas, objetivando verificar o halo de inibição de crescimento bacteriano ao redor da eritromicina e clindamicina.

A resistência tanto à eritromicina como à clindamicina foi tida como indicador do fenótipo MLSB constitutivo (denominado cMLSB), indicando a produção contínua da enzima metilase (figura 9). A redução do halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco de clindamicina na região próxima ao disco de eritromicina caracterizava para o espécime o fenótipo MLSB indutivo (denominado iMLSB), neste caso, a redução do halo de inibição aparece como resultado da indução da resistência à clindamicina, exercida pela eritromicina difundida no meio de cultura (figura 10). A sensibilidade à clindamicina indicava o fenótipo M (resistência apenas aos macrolídeos) e a sensibilidade à clindamicina caracterizava o fenótipo L (resistência apenas às lincosamidas) (BOLUKAOTO et al., 2015; FASSINA; PIMENTA-RODRIGUES, 2013).

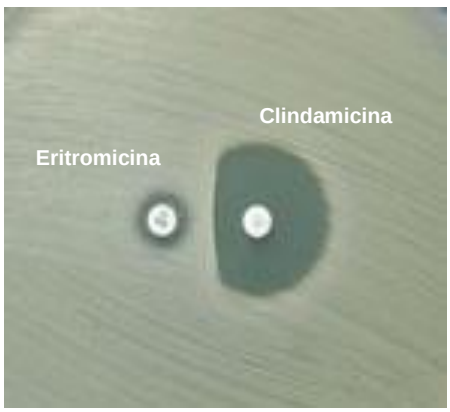
Esse método é denominado D-teste e ele deve ser sempre realizado, pois caso o resultado seja positivo, ou seja, caso haja resistência a clindamicina induzida pela eritromicina, a clindamicina deve ser liberada como resistente no laudo, mesmo que o halo de sensibilidade seja maior ou igual a 22mm. Pode ocorrer falha terapêutica caso a clindamicina seja usada em pacientes cujo isolado foi positivo no D-teste.

Figura 9 – D-teste negativo/Fenótipo cMLSB



Fonte: Própria.
Projeto *Streptococcus agalactiae.*

Figura 10 – D-teste Positivo/Fenótipo iMLSB



Fonte: ANVISA.
Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/sta7.html

4.9. Determinação do Perfil Genético de Resistência Antimicrobiana

Foi determinada a presença dos genes de resistência em cepas que apresentaram resistência à eritromicina e/ou clindamicina no teste fenotípico, mediante a realização de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) convencional multiplex das amostras criopreservadas após repique das mesmas em ágar cromogênico.

Todas as amostras que apresentaram resistência no teste fenotípico foram testadas quanto à presença de genes de resistência à eritromicina (*erm*B, *erm*TR e *mef*A) e clindamicina (*lin*B), usando *primers* específicos (tabela 2). Os *primers* foram sintetizados conforme descrito por Bolukaoto et al. (2015) pela Invitrogen Brasil Ltda. O DNA bacteriano para a realização da PCR foi extraído das amostras por método de fervura (FAN; KLEVEN; JACKWOOD, 1995).

Tabela 2 – *Primers* usados para detecção de genes de resistência nas cepas de SGB positivas no teste fenotípico.

Gene	*Primers*	Sequência de *primers* (5' – 3')	Tamanhos dos produtos (pb)
ermB	ermB1	5'_-GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA-3'_(F)	640
	ermB2	5'_-AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC-3'_(R)	
ermTR	ermTR1	5'_-GAA GTT TAG CTT TCC TAA-3'_(F)	400
	ermTR2	5'_-GCT TCA GCA CCT GTC TTA ATT GAT-3'_(R)	
mefA	mefA1	5'_-AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC-3'_(F)	348
	mefA2	5'_-TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG-3'_(R)	
linB	linB1	5'_-CCT ACC TAT TGT TTG TGG AA-3'_(F)	944
	linB2	5'_-ATA ACG TTA CTC TCC TAT TC-3'_(R)	

Fonte: Adaptado de Bolukaoto et al. (2015).

As amplificações foram efetuadas com mix de volume de 50µl contendo 2,5mM de Tris-HCl pH 8.6, 2,5mM de KCl, 2,5mM de $MgCl_2$, 5Mm de dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Brasil Ltda), água para PCR e 1µM de pares de *primers* diretos e reversos. Um total de 5µl de DNA molde foi usado na PCR.

Para as condições de ciclagem no termociclador seguiram-se as descrições de Bolukaoto et al. (2015) que consistiram em um único ciclo de 95°C durante 3 min seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1

min, anelamento a 57°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. Um passo de extensão final foi realizado a 72°C por 5 min.

Os resultados da PCR foram analisados de acordo com a presença ou ausência de bandas em gel de agarose a 2% em TAE 1x, corado com brometo de etídeo. Após a corrida eletroforética o gel foi visualizado em um transiluminador UV. Uma cepa de referência de *Streptococcus agalactiae* foi utilizada como controle negativo.

4.10. Retorno às participantes do estudo

Foi disponibilizado às gestantes incluídas no estudo um laudo laboratorial com o resultado da identificação para SGB e antibiograma, nos casos positivos (Apêndice 2). Os laudos foram entregues aos profissionais que acompanharam às gestantes no pré-natal e para os casos positivos foram elaborados relatórios que foram anexados ao cartão da gestante para que a mesma levasse essas informações para maternidade. Todas as gestantes foram orientadas a levarem os resultados para a maternidade, pois seria possível realizar a antibioticoprofilaxia, caso a equipe média achasse necessário. Desse modo, algumas gestantes receberam tratamento para SGB.

4.11. Considerações éticas

O estudo foi desenvolvido em conformidade aos preceitos da resolução 466/12 do Ministério da Saúde e, desta forma, os participantes da pesquisa foram informados sobre o objetivo do estudo, sigilo das informações, voluntariedade na participação e possibilidade de deixar de participar da pesquisa em qualquer momento. O início da coleta de dados e amostras biológicas ocorreu após anuência da Comissão de Ensino e Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Vitória da Conquista (Anexo 2), seguido da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Multidisciplinar em Saúde – Campus Anísio Teixeira da Universidade Federal da Bahia (IMS-CAT/UFBA) sob o número de protocolo 58104116.8.000.5556 (Anexo 3).

5 REFERÊNCIAS

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27ª ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

BANNO, H. et al. Characterization of multidrug-resistant group b streptococci with reduced penicillin susceptibility forming small non-beta-hemolytic colonies on sheep blood agar plates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2169–2171, 2014.

BARNETT, T. C. et al. Streptococcal toxins: Role in pathogenesis and disease. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 1721–1741, 2015.

BERARDI, A. et al. Group B streptococcal infections in the newborn infant and the potential value of maternal vaccination. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 13, n. 11, p. 1387–1399, 2015.

BOLUKAOTO, J. Y. et al. Antibiotic resistance of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p. 6–12, 2015.

BORGER, I. L. et al. Streptococcus agalactiae em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 10, p. 575–579, 2005.

BOYER, K. M.; GOTOFF, S. P. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. **The New England Journal of Medicine**, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica**. Atenção ao pré-natal de baixo risco / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica - Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BUSCETTA, M. et al. FbsC, a novel fibrinogen-binding protein, promotes Streptococcus agalactiae-host cell interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 30, p. 21003–21015, 2014.

CDC. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. **MMWR**, v. 59, n. No. RR-10, p. 1–32, 2010.

CHRISTINE, R.; ATKINS, N.; MUNCH-PETERSEN, E. A note on a lytic phenomenon shown by group B Streptococci. **Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science**, v. 22, p. 197–200, 1944.

COOPER, K.; ABBOTT, F.; GOULD, I. M. Reduced penicillin susceptibility of group B Streptococcus: An assessment of emergence in Grampian, Scotland. **British Journal of Biomedical Science**, v. 73, n. 1, p. 25–27, 2016.

COSTA, N. D. V. L. et al. Gestantes colonizadas pelo Streptococcus do grupo B e seus recémnascidos: Análise crítica da conduta adotada no Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, n. 2, p. 155–161, 2010.

CRISP, B. J. et al. Effect of delayed inoculation of selective media in antenatal detection of group B streptococci. **Obstetrics and gynecology**, v. 92, n. 6, p. 923–925, 1998.

CURTIS, B. Y. S. N.; KRAUSE, R. M.; LOUIS, S. Antigenic relationships between B and G streptococci *. **Washington University, School of Medicine**, 1964.

DAHESH, S. et al. Point mutation in the group B streptococcal pbp2x gene conferring decreased susceptibility to β-lactam antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2915–2918, 2008.

DARLING, C. L. Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of Streptococcus agalactiae (Lancefield group B) in clinical material. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 171–174, 1975.

DÍAZ, T. M.; NIEVES, B. M. Comparación de medios de cultivos y procedimientos para detectar colonización por Streptococcus agalactiae en mujeres embarazadas. **Revista chilena de infectología**, v. 25, n. 2, p. 108–113, 2008.

DUTRA, V. G. et al. Streptococcus agalactiae in Brazil: Serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.

EL AILA, N. A. et al. Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B streptococcus carriage in pregnant women. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, 2010.

EL BEITUNE, P.; DUARTE, G.; MAFFEI, C. M. L. Colonization by Streptococcus agalactiae during pregnancy: maternal and perinatal prognosis. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 276–282, 2005.

EMANEINI, M. et al. Characterization of virulence factors, antimicrobial resistance pattern and clonal complexes of group B streptococci isolated from neonates. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 119–122, 2016.

EMY NAGAO, P. et al. Reactive oxygen species involved in apoptosis induction of human respiratory epithelial (A549) cells by Streptococcus agalactiae. **Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 94–99, 2016.

FAN, A. H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of Polymerase Chain Reaction with Arbitrary Primers to Strain Identification of Mycoplasma

gallisepticum. **American Association of Avian Pathologists**, v. 39, n. 4, p. 729–735, 1995.

FASSINA, J. R.; PIMENTA-RODRIGUES, M. V. Aspectos Laboratoriais da Identificação de Streptococcus agalactiae em Gestantes: uma mini revisão. **Interbio**, v. 7, n. 1, p. 26–40, 2013.

FIOLO, K. et al. Taxa de infecção e sorotipos de Streptococcus agalactiae em amostras de recém-nascidos infectados na cidade de Campinas (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 34, n. 12, p. 544–549, 2012.

FREITAS, F. T. DE M.; ROMERO, G. A. S. Early-onset neonatal sepsis and the implementation of group B streptococcus prophylaxis in a Brazilian maternity hospital: a descriptive study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 92–97, 2017.

FRÖHLICHER, S. et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of group B streptococci in pregnant women: Results from a Swiss tertiary centre. **Swiss Medical Weekly**, v. 144, n. March, p. 1–6, 2014.

FUNÇÃO, M. J.; NARCHI, N. Z. Pesquisa do estreptococo do Grupo B em gestantes da zona leste de São Paulo. **Rev Esc Enferm USP**, 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. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 197, n. 4, p. 1–4, 2007.

GIANNONI, E. et al. Incidence and Outcome of Group B Streptococcal Sepsis in Infants in Switzerland. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 35, n. 2, p. 222–224, 2016.

GRASSI, M. S.; DINIZ, E. M. DE A.; VAZ, F. A. C. Métodos laboratoriais para diagnóstico da infecção neonatal precoce pelo Streptococcus beta hemolítico do grupo B. **Pediatria (São Paulo)**, v. 23, n. 3, p. 232–40, 2001.

GROUP, E.; DISEASE, S. Committee opinion No. 485: Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns. **Obstetrics and Gynecology**, v. 117, n. 4, p. 1019–1027, 2011.

GUERRERO, C. et al. Use of Direct Latex Agglutination Testing of Selective Broth in the Detection of Group B Strepptococcal Carriage in Pregnant Women. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 61–62, 2004.

HANSEN, S. M. et al. Dynamics of Streptococcus agalactiae Colonization in Women during and after Pregnancy and in Their Infants Dynamics of Streptococcus agalactiae Colonization in Women during and after Pregnancy and in Their Infants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 83–89,

2004.

HEATH, P. T. Status of vaccine research and development of vaccines for GBS. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2876–2879, 2016.

HONIG, E.; MOUTON, J. W.; VAN DER MEIJDEN, W. I. The epidemiology of vaginal colonisation with group B streptococci in a sexually transmitted disease clinic. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 105, p. 177–180, 2002.

IROH TAM, P.-Y.; DELAIR, S. F.; OBARO, S. K. Neonatal group B streptococcus disease in developing countries: are we ready to deploy a vaccine? **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 11, p. 1401–1403, 2015.

KENCHINGTON, A. L.; LAMONT, R. F. Group B streptococcal immunisation of pregnant women for the prevention of early and late onset Group B streptococcal infection of the neonate as well as adult disease. **Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 1, p. 15–25, 2017.

KIMURA, K. et al. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2890–2897, 2008.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: [s.n.].

KORIR, M. L.; MANNING, S. D.; DAVIES, H. D. Intrinsic maturational neonatal immune deficiencies and susceptibility to group B streptococcus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 973–989, 2017.

KROHN, M. A.; HILLIER, S. L.; BAKER, C. J. Maternal peripartum complications associated with vaginal group B streptococci colonization. **The Journal of infectious diseases**, v. 179, n. 6, p. 1410–1415, 1999.

KUMAR, S. K. M.; BHAT, B. V. Distinct mechanisms of the newborn innate immunity. **Immunology Letters**, v. 173, p. 42–54, 2016.

LANCEFIELD, B. R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. (From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research). v. 1919, n. 1, p. 571–595, 1932.

LE DOARE, K.; HEATH, P. T. An overview of global GBS epidemiology. **Vaccine**, v. 31, n. S4, p. D7–D12, 2013.

LECLERCQ, S. Y. et al. Pathogenesis of Streptococcus urinary tract infection depends on bacterial strain and β-hemolysin/cytolysin that mediates cytotoxicity, cytokine synthesis, inflammation and virulence. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–14, 2016.

LEE, W. T.; LAI, M. C. High prevalence of Streptococcus agalactiae from

vaginas of women in Taiwan and its mechanisms of macrolide and quinolone resistance. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, n. 5, p. 510–516, 2015.

LEVY, C. et al. Late-onset Group B Streptococcal Meningitis, Potential Effectiveness of a Vaccine by Maternal Immunization? **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 34, n. 9, p. 1039, 2015.

MATANI, C. et al. Streptococcus agalactiae:Prevalence of antimicrobial resistance in vaginal and rectal swabs in Italian pregnant women. **Infezioni in Medicina**, v. 24, n. 3, p. 217–221, 2016.

MEEHAN, M. et al. Real-time polymerase chain reaction and culture in the diagnosis of invasive group B streptococcal disease in infants: a retrospective study. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 12, p. 2413–2420, 2015.

MELIN, P. Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. **Special Issue: Infections and pregnancy.**, v. 17, n. 9, p. 1294–1303, 2011.

MELO, S. C. C. S. DE et al. Antimicrobial susceptibility of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. 1, p. 83, 2016.

MENGIST, A.; KANNAN, H.; ABDISSA, A. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of anorectal and vaginal group B Streptococci isolates among pregnant women in Jimma, Ethiopia. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 9–13, 2016.

MONEY, D. et al. The Prevention of Early-Onset Neonatal Group B Streptococcal Disease. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 35, n. 10, p. 939–948, 2013.

MORITA, T. et al. Evaluation of chromID strepto B as a screening media for Streptococcus agalactiae. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 2–5, 2014.

MOUSAVI, S. M. et al. Survey of strain distribution and antibiotic resistance pattern of group B streptococci (Streptococcus agalactiae) isolated from clinical specimens. **GMS hygiene and infection control**, v. 11, n. M, p. Doc18, 2016.

MUKHOPADHYAY, S. et al. 2010 Perinatal GBS Prevention Guideline and Resource Utilization. **Pediatrics**, v. 133, n. 2, p. 196–203, 2014.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2014.

MWAMAKAMBA, L. W.; ZUCCHI, P. Cost estimate of hospital stays for premature newborns of adolescent mothers in a Brazilian public hospital. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 12, n. 2, p. 223–229, 2014.

NAJMI, N. et al. Maternal genital tract colonisation by Group-B Streptococcus: A hospital based study. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 63, n. 9, p. 1103–1107, 2013.

NUMANOVIĆ, F. et al. Presence and resistance of Streptococcus agalactiae in vaginal specimens of pregnant and adult non-pregnant women and association with other aerobic bacteria. **Med Glas (Zenica)**, v. 14, n. 1, p. 98–105, 2017.

OLIVEIRA, M. V.; TELES, M. F.; VIANA, T. A. Prevalência e fatores de risco associados à colonização por Streptococcus agalactiae em gestantes atendidas no hospital municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista – BA. **C&D-Revista Eletrônica da Fainor,** v. 6, n. 1, p. 172–184, 2013.

PERRY, J. D. et al. Evaluation of a new chromogenic agar medium for isolation and identification of Group B streptococci. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 615–618, 2006.

PINHEIRO, S. et al. Prevalence and mechanisms of erythromycin resistance in Streptococcus agalactiae from healthy pregnant women. **Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology & Disease**, v. 15, n. 2, p. 121–124, 2009.

REINHEIMER, C. et al. Group B streptococcus infections in neonates admitted to a German NICU: Emphasis on screening and adherence to pre-analytical recommendations. **Early Human Development**, v. 103, p. 37–41, 2016.

ROSA-FRAILE, M. et al. Specimen storage in transport medium and detection of group B streptococci by culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 928–930, 2005.

SAGAR, A. et al. The ??-Hemolysin and Intracellular Survival of Streptococcus agalactiae in Human Macrophages. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

SALEM, N.; ANDERSON, J. J. Evaluation of four chromogenic media for the isolation of Group B Streptococcus from vaginal specimens in pregnant women. **Pathology**, v. 47, n. 6, p. 580–582, 2015.

SAVINI, V. et al. Streptococcus agalactiae vaginitis: Nonhemolytic variant on the Liofilchem® Chromatic StreptoB. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 6, n. 8, p. 1693–1695, 2013.

SENDI, P.; FRÖHLICHER, S. Association between capsular serotype v and macrolide resistance in group B Streptococcus. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 4, p. 754–756, 2015.

SLOTVED, H. C. et al. Serotype IX, a proposed new Streptococcus agalactiae serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2929–2936, 2007.

SPELLERBERG, B. Pathogenesis of neonatal Streptococcus agalactiae infections. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 14, p. 1733–1742, 2000.

TAZI, A. et al. Comparative evaluation of Strepto B ID®chromogenic medium and Granada media for the detection of Group B streptococcus from vaginal samples of pregnant women. **Journal of Microbiological Methods**, v. 73, n. 3, p. 263–265, 2008.

TEESE, N. et al. Screening protocols for group B streptococcus: Are transport media appropriate? **Infectious Disease in Obstetrics and Gynecology**, v. 11, n. 4, p. 199–202, 2003.

THE, F.; ACADEMY, A.; PEDIATRICS, O. F. Recommendations for the Prevention of Perinatal Group B Streptococcal (GBS) Disease. **Pediatrics**, v. 128, n. 3, 2011.

UDO, E. E.; BOSWIHI, S. S.; AL-SWEIH, N. Genotypes and virulence genes in group B streptococcus isolated in the maternity hospital, Kuwait. **Medical Principles and Practice**, v. 22, n. 5, p. 453–457, 2013.

WHILEY, R. A.; HARDIE, J. M. **Streptococcus**. [s.l: s.n.].

ZENG, S. J. et al. Clinical analysis of cases of neonatal Streptococcus agalactiae sepsis. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, p. 1–7, 2016.

Capítulo 1

Comparação de metodologias de identificação e perfil de suscetibilidade antimicrobiana em cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de gestantes de Vitória da Conquista – BA, Brasil.

Fabrícia Almeida Fernandes Santana[1], Taís Andrade Viana[1], Marcelo Barreto de Sousa Filho[3], Cláudio Lima Souza[1], Lucas Miranda Marques[1,2], Márcio Vasconcelos Oliveira[1*].

[1]Multidisciplinary Institute of Health, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brazil.
[2]University of Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade, Ilhéus, Brazil.
[3]Laboratório Oliveira Ltda (LABO). Vitória da Conquista, Brazil.

Multidisciplinary Institute of Health: Rua Rio de Contas, 58 – Quadra 17 – Lote 58, Bairro Candeias – CEP: 45.029-094, Vitória da Conquista, BA, Brazil.

*Address correspondence to: Phone: +55 77 3429-2710. E-mail: marciomvof@gmail.com (Márcio Vasconcelos Oliveira)

Resumo

O objetivo do estudo foi comparar metodologias para o isolamento e identificação de SGB, avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e identificar genes de resistência em cepas de SGB isoladas de gestantes atendidas no Município de Vitória da Conquista-BA. Entre os meses de janeiro de 2017 a fevereiro de 2018 foram coletados *swabs* vaginorretais de 186 gestantes entre a 32ª e a 40ª semanas de gestação. Os *swabs* foram semeados em ágar sangue de carneiro 5% e em ágar cromogênico, antes e após a inoculação em caldo seletivo. Para as amostras nas quais houve o crescimento de colônias sugestivas de SGB, foi realizada identificação confirmatória utilizando o teste de CAMP e aglutinação em látex. Foi realizado antibiograma das amostras identificadas como positivas e para aquelas em que houve resistência a clindamicina e/ou eritromicina foi realizada análise molecular para identificação dos genes de resistência *erm*B, *erm*TR, *mef*A e *lin*B. 32 amostras (17,2%) foram identificadas como positivas para SGB. A metodologia mais sensível (96,9%) para a detecção/identificação de SGB, comparada à sorogrupagem, foi a semeadura em ágar cromogênico após incubação da amostra em caldo seletivo. As 32 cepas de SGB isoladas no estudo foram sensíveis à ampicilina, cefotaxima e vancomicina. 6 amostras (18,8%) apresentaram resistência à clindamicina, 8 (25%) foram resistentes à eritromicina e 1 isolado (3,1%) apresentou resistência à penicilina. Todas as cepas de SGB que apresentaram resistência à eritromicina e/ou clindamicina tiveram resultados negativos no D-teste. 2 cepas (25%) apresentaram fenótipo M e 6 isolados (75%) apresentaram fenótipo cMLSB. O gene *erm*B foi identificado em 4 amostras (44,4%), o gene *mef*A também foi verificado em 4 amostras (44,4%), o gene *erm*TR foi identificado em 1 isolado (11,1%) e o gene *lin*B não foi encontrado em nenhum dos isolados. O estudo evidenciou a necessidade de implantação do rastreamento para SGB no município de Vitória da Conquista-BA, que pode ser feito por diversas metodologias, inclusive por meios cromogênicos e a quimioprofilaxia para gestantes que não podem usar penicilina deve ser norteada por teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

Introdução

Streptococcus agalactiae (*Streptococcus* do grupo B, SGB) é uma bactéria que habita principalmente o trato gastrointestinal e genital feminino como parte da microbiota normal e sua relevância clínica está na infecção de neonatos (HONIG; MOUTON; VAN DER MEIJDEN, 2002; MEEHAN et al., 2015). A colonização da gestante por SGB no momento do parto representa o principal fator de risco para o desenvolvimento de infecção em recém nascidos através da transmissão vertical da mãe colonizada para o neonato que pode desenvolver pneumonia, meningite e sepse (CDC, 2010; LEE; LAI, 2015).

A prevalência de colonização por SGB em gestantes é em torno de 10-35% como demonstrado em estudos realizados em diversos países do mundo, inclusive no Brasil (BORGER et al., 2005; CDC, 2010; FUNÇÃO; NARCHI, 2013; LEE; LAI, 2015; MATANI et al., 2016; MENGIST; KANNAN; ABDISSA, 2016; NAJMI et al., 2013; OLIVEIRA; TELES; VIANA, 2013).

A transmissão vertical de SGB ocorre em cerca de 50% dos recém-nascidos de mães colonizadas e, na ausência de profilaxia adequada, estima-se que de 1-4% dos lactentes a cada 1000 nascidos vivos desenvolvam a doença estreptocócica que pode ocorrer de forma precoce ou tardia (LE DOARE; HEATH, 2013; REINHEIMER et al., 2016).

Para prevenir de forma efetiva as infecções por esse agente deve ser realizada a identificação das gestantes colonizadas através de rastreamento por cultura no período entre a 32ª e a 37ª semana de gestação com o posterior estabelecimento de antibioticoterapia profilática para as gestantes colonizadas no momento do parto (CDC, 2010; GROUP; DISEASE, 2011; THE; ACADEMY; PEDIATRICS, 2011).

Para o rastreamento das gestantes recomenda-se a coleta de amostras de secreção vaginal/retal que devem ser inoculadas em um meio de cultura enriquecido e seletivo para SGB, sendo o caldo Todd Hewitt o mais utilizado para essa finalidade e após isso a amostra deve ser cultivada em meio ágar sangue de carneiro a 5% (CDC, 2010; EL BEITUNE; DUARTE; MAFFEI, 2005). Além da cultura em ágar sangue, outros métodos podem ser utilizados para identificação de SGB como o teste de CAMP, sorogrupagem, meios cromogênicos e métodos moleculares. Cada um desses métodos apresenta

diferentes graus de sensibilidade e especificidade na detecção de SGB, assim como custo variável.

Uma vez que a maioria das cepas de SGB apresenta suscetibilidade às penicilinas, a penicilina G tem sido o fármaco de primeira escolha para a antibioticoprofilaxia de SGB (MONEY et al., 2013). Para gestantes alérgicas à penicilina com alto risco de anafilaxia, clindamicina e eritromicina são os fármacos prioritários. Caso a gestante seja alérgica à penicilina e a cepa de SGB identificada seja resistente à eritomicina e clindamicina, ou quando a suscetibilidade a essas drogas é desconhecida, a vancomicina deve ser utilizada (MELO et al., 2016). Nas últimas décadas tem havido um incremento na prevalência de cepas resistentes à eritromicina e clindamicina em muitos países e essa prevalência varia em torno de 25% a 32% para eritromicina e de 13% a 20% para clindamicina (CDC, 2010; PINHEIRO et al., 2009). A resistência de SGB à eritomicina e clindamicina está relacionada aos genes *erm* que conferem o fenótipo de resistência MLSB (resistente à eritomicina - resistente à clindamicina), genes *mef* (*mef*A ou *mef*E) ou *msr*A que conferem o fenótipo de resistência M (resistente à eritromicina - suscetível à clindamicina) e ao gene linB (resistência somente à clindamicina) (BOLUKAOTO et al., 2015; FASSINA; PIMENTA-RODRIGUES, 2013). Esses genes de resistência são transferidos de uma bactéria à outra por meio de plasmídeos ou transposons (MATANI et al., 2016; MELO et al., 2016; PINHEIRO et al., 2009).

Apesar do impacto clínico e epidemiológico das infecções neonatais por SGB e das tendências de aumento de resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento dessas infecções, existem poucos estudos demonstrando o perfil de sensibilidade das cepas nos diferentes municípios brasileiros. O que há disponível são publicações internacionais em sua maioria, que não representam o perfil de sensibilidade de SGB em todas as regiões geográficas do mundo. Diante disso, destaca-se a importância da monitorização em âmbito local das características fenotípicas e genotípicas de sensibilidade das cepas de SGB circulantes para verificar se os achados são compatíveis com a literatura e de crucial importância se fazer a escolha da terapia mais adequada, baseada nos dados da população em questão.

O presente estudo objetivou a realização de uma comparação de metodologias de identificação e verificação do perfil de sensibilidade e

determinação de genes de resistência das cepas de SGB isoladas de gestantes em acompanhamento pré-natal nas unidades básicas de saúde do município de Vitória da Conquista-BA. Os resultados obtidos através deste trabalho poderão subsidiar a elaboração de protocolos para rastreamento da colonização por SGB em gestantes, bem como protocolos terapêuticos para as gestantes colonizadas, que sejam baseados nos dados da população local e atrelados à realidade terapêutica disponível, o que poderá refletir não somente na diminuição da mortalidade infantil do município, como na diminuição de custos com internamentos prolongados de recém nascidos infectados por SGB.

Materiais e Métodos

Desenho do estudo, período, local e população

Trata-se de um estudo transversal quantitativo, cujo tamanho amostral foi constituído por amostras de 186 gestantes atendidas em nove Unidades Básicas de Saúde da Família (UBS) do município de Vitória da Conquista-BA, Brasil. O cálculo amostral da pesquisa foi obtido levando em consideração os 5170 partos realizados no município no ano de 2015 e a prevalência de colonização de 17% encontrada no estudo piloto realizado por Oliveira et al. (2013), com admissão de um erro de 5% e intervalo de confiança de 95%. A coleta de dados foi realizada entre os meses de Janeiro de 2017 a fevereiro de 2018.

Critérios de inclusão e exclusão

Foram critérios de inclusão para a seleção: gestantes com 32 a 40 semanas de gestação e provenientes da zona urbana do município. Para exclusão foram utilizados os seguintes critérios: gestantes fora do período gestacional adequado, que utilizaram antibióticos nos últimos 7 dias antecedentes à coleta e que eram residentes na zona rural.

Coleta das amostras

As amostras biológicas foram colhidas com um único *swab* vaginal/retal, sem a utilização de espéculo, colhendo primeiro material da região do terço

médio inferior da vagina seguido da coleta de material da região perianal, respeitando rigorosamente essa ordem. As amostras foram acondicionadas em meio de transporte Stuart e transportadas em caixas para material biológico em temperatura ambiente até o processamento no laboratório, em intervalos de tempo inferiores a 8 horas após a coleta. As amostras coletadas foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal da Bahia – Campus Anísio Teixeira/ Instituto Multidisciplinar em Saúde (UFBA – IMS/CAT), situado no mesmo município da coleta de dados, para realização das análises.

Isolamento e identificação bacteriana

As amostras foram semeadas por esgotamento no meio cromogênico para *Streptococcus* chromID^{TM} Strepto B (BIOMERIÉUX) e também no ágar sangue de carneiro a 5% e incubadas em estufa bacteriológica na temperatura de 35-37°C por 24 horas. As amostras semeadas em ágar sangue foram incubadas com atmosfera de 5% de CO_2. Depois disso, o *swab* contendo a amostra foi incubado no caldo Todd Hewitt (BIOMERIÉUX) a 35-37°C por 24 horas.

Para as culturas de ágar sangue nas quais ocorreu crescimento de colônias sugestivas de SGB (pequenas, com padrão acinzentado, circundadas por halo discreto de β-hemólise ou sem hemólise), foram submetidas ao teste de catalase, coloração de Gram convencional e análise microscópica. Para essas colônias não foram realizados testes de identificação confirmatórios para SGB por ser o método recomendado pelo CDC para o isolamento. Desse modo, a observação de colônias sugestivas de SGB no ágar sangue foi comparada ao resultado final para os isolados confirmados por sorogrupagem.

Quando observado o crescimento de colônias róseas ou avermelhadas no ágar cromogênico, que seguindo as orientações do fabricante, eram identificadas como colônias de SGB, foram submetidas ao teste de CAMP utilizando o KIT composto por ágar Todd Hewitt e Hemolisinabac (PROBAC DO BRASIL) e sorogrupagem utilizando o KIT SLIDEX® Strepto Plus B (BIOMERIÉUX), para confirmação da espécie.

Após a incubação do *swab* contendo a amostra no caldo Todd Hewitt por 24 horas, esse *swab* foi novamente semeado em ágar cromogênico e ágar sangue e realizada a incubação em estufa bacteriológica na temperatura de 35-37°C por 24 horas. Para as culturas de ágar sangue após o Todd Hewitt nas quais ocorreu crescimento de colônias sugestivas de SGB essas colônias também foram submetidas ao teste de catalase, coloração de Gram e análise microscópica. Para as amostras em que houve crescimento de colônias róseas ou avermelhadas no ágar cromogênico após o Todd Hewitt também foram realizados os testes de CAMP e sorogrupagem para confirmação do resultado.

Todos os isolados confirmados por sorogrupagem foram criopreservados a -20°C em caldo BHI a 15% de glicerol.

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi determinado pela técnica de difusão em disco (Kirby e Bauer), conforme orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* ((CLSI), 2017). Os antimicrobianos testados foram penicilina (10 unidades), ampicilina (10µg), cefotaxima (30 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg) e vancomicina (30 µg) que foram selecionados de acordo com as recomendações do CLSI - 2017 e para escolha dos antimicrobianos dentro das classes recomendadas pelo CLSI foi levada em consideração a disponibilidade dos mesmos no elenco de antimicrobianos na rede pública de saúde do município de Vitória da Conquista.

Para a realização da técnica foi utilizado o meio de cultura ágar Mueller Hinton suplementado com sangue de carneiro a 5%. A partir das culturas recentes foram preparadas suspensões das amostras bacterianas em solução fisiológica (0,9%) estéril, com uma turvação equivalente a 0,5 na escala de Mac Farland. A suspensão bacteriana foi semeada no meio de cultura com um *swab* por disseminação e os discos com antimicrobianos a serem testados foram distribuídos com o auxílio de uma pinça estéril. As placas foram incubadas à temperatura de 35-37ºC a 5% CO_2. A leitura foi realizada após 18 a 24 horas de incubação. Os halos de inibição do crescimento foram medidos e interpretados de acordo com o CSLI – 2017.

Determinação dos Fenótipos de Resistência à Eritromicina

Utilizou-se discos comerciais de Eritromicina (15µg) e Clindamicina (2µg) colocados sobre placa de ágar Mueller Hinton, suplementada com sangue a 5%, e distantes um do outro por 12mm (CLSI, 2017) com incubação a 35-37ºC a 5% CO_2 por 24 horas e observação do halo de inibição de crescimento bacteriano ao redor da eritromicina e clindamicina. A resistência tanto à eritromicina como à clindamicina foi considerada indicador do fenótipo MLSB constitutivo (cMLSB). A redução do halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco de clindamicina na região próxima ao disco de eritromicina caracterizou para o espécime o fenótipo MLSB indutivo (iMLSB). A sensibilidade somente à clindamicina indicou o fenótipo M (resistência apenas aos macrolídeos) e a sensibilidade somente à eritomicina caracterizou o fenótipo L (resistência apenas às lincosamidas) (BOLUKAOTO et al., 2015; FASSINA; PIMENTA-RODRIGUES, 2013).

Determinação do Perfil Genético de Resistência

Foi determinada a presença dos genes de resistência em cepas que apresentaram resistência à eritromicina e/ou clindamicina no teste fenotípico, mediante a realização de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) convencional multiplex das amostras congeladas após repique das mesmas em ágar cromogênico.

Todas as amostras que apresentaram resistência no teste fenotípico foram testadas quanto à presença de genes de resistência à eritromicina (*erm*B, *erm*TR e *mef*A) e clindamicina (*lin*B), usando *primers* específicos (tabela 1). Os *primers* foram sintetizados conforme descrito por Bolukaoto et al. (2015) pela Invitrogen Brasil Ltda. O DNA bacteriano para a realização da PCR foi extraído das amostras por método de fervura (FAN; KLEVEN; JACKWOOD, 1995).

As amplificações foram efetuadas com mix de volume de 50µl contendo 2,5mM de Tris-HCl pH 8.6, 2,5mM de KCl, 2,5mM de $MgCl_2$, 5Mm de dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Brasil Ltda), água para PCR e 1µM de pares de *primers* diretos e reversos. Um total de 5µl de DNA molde foi usado na PCR.

Para as condições de ciclagem no termociclador seguiram-se as descrições de Bolukaoto et al. (2015) que consistiram em um único ciclo de 95°C durante 3 min seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 min, anelamento a 57°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. Um passo de extensão final foi realizado a 72°C por 5 min.

Tabela 1 – *Primers* usados para detecção de genes de resistência nas cepas de SGB positivas no teste fenotípico.

Gene	*Primers*	Sequência de *primers* (5' – 3')	Tamanho dos produtos (pb)
ermB	ermB1	5'_-GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA-3'_(F)	640
	ermB2	5'_-AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC-3'_(R)	
ermTR	ermTR1	5'_-GAA GTT TAG CTT TCC TAA-3'_(F)	400
	ermTR2	5'_-GCT TCA GCA CCT GTC TTA ATT GAT-3'_(R)	
mefA	mefA1	5'_-AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC-3'_(F)	348
	mefA2	5'_-TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG-3'_(R)	
linB	linB1	5'_-CCT ACC TAT TGT TTG TGG AA-3'_(F)	944
	linB2	5'_-ATA ACG TTA CTC TCC TAT TC-3'_(R)	

Fonte: Adaptado de Bolukaoto et al. (2015)

Os resultados da PCR foram analisados de acordo com a presença ou ausência de bandas em gel de agarose a 2% em TAE 1x, corado com brometo de etídio. Após a corrida eletroforética o gel foi visualizado em um transiluminador UV. Uma cepa de referência de *Streptococcus agalactiae* foi utilizada como controle negativo.

Análises estatísticas

O banco de dados da pesquisa foi construído em planilhas do pacote *Microsoft Office Excel* 2007 e as tabulações cruzadas e os testes de estatística descritiva foram realizados com o auxílio do pacote estatístico EPI-INFO versão 3.5.1. Um p valor de <0,05 foi considerado indicativo de significância estatística. A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram calculados para todas as metodologias de identificação utilizando a sorogrupagem como teste "*padrão-ouro*" (GUERRERO et al., 2004).

Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Pólo de Educação da Secretaria Municipal de Saúde de Vitória da Conquista, seguido da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Multidisciplinar em Saúde – Campus Anísio Teixeira da Universidade Federal da Bahia (IMS-CAT/UFBA) sob o número de protocolo 58104116.8.000.5556. Antes da entrevista e da coleta de amostra biológica, foram apresentados os objetivos do estudo com linguagem adequada às participantes do mesmo, seguido da assinatura do TCLE.

Resultados

Os resultados obtidos para o isolamento e detecção de SGB pelas metodologias utilizadas no estudo estão apresentados em comparação aos resultados de identificação positiva para SGB por sorogrupagem (padrão-ouro) na tabela 2. Em um total de 186 amostras, 32 foram identificadas como SGB através de sorogrupagem, o que representa uma prevalência de colonização de 17,2%.

Tabela 2 – Resultados dos métodos de Isolamento e identificação para as amostras de secreção vaginal/retal de gestantes em atendimento pré-natal (n = 186).

Resultado	MÉTODO					
	CRO1 n (%)	**CRO2** n (%)	**AS1** n (%)	**AS2** n (%)	**CAMP** n (%)	**SORO** n (%)
Positivo	26 (14,0)	32 (17,2)	32 (17,2)	44 (23,6)	32 (17,2)	32 (17,2)
Negativo	160 (86,0)	154 (82,8)	154 (82,8)	142 (76,4)	154 (82,8)	154 (82,8)

Legenda: (CRO1) Meio cromogênico antes do Todd Hewitt, (CRO2) Meio cromogênico após o Todd Hewitt, (AS1) Ágar sangue antes do Todd Hewitt, (AS2) Ágar sangue após o Todd Hewitt, (CAMP) Teste de Christie, Atkins e Munch-Petersen e (SORO) Sorogrupagem.

Foram detectadas 26 amostras com colônias de SGB no CRO1 e para 1 dessas amostras não houve confirmação por sorogrupagem. Já para o CRO2 foram identificadas 32 amostras com colônias de SGB e somente 1 não foi confirmada por sorogrupagem. A detecção de SGB tanto pelo CRO1 como pelo

CRO2 ocorreu em 25 amostras. Para 1 amostra houve identificação apenas no CRO1 e para 7 amostras houve identificação apenas no CRO2, que foram confirmadas por sorogrupagem (tabela 3).

Tabela 3 – Comparação da identificação de SGB isolados de gestantes em atendimento pré-natal, em meio cromogênico, antes e após o Todd Hewitt.

Resultado	MÉTODO				
	CRO1 n (%)	**CRO2** n (%)	**CRO1 e CRO2** n (%)	**Somente CRO1** n (%)	**Somente CRO2** n (%)
Positivo	26 (14,0)	32 (17,2)	25 (13,4)	01 (0,5)	07 (3,8)
Negativo	160 (86,0)	154 (82,8)	153 (82,2)	07 (3,8)	01 (0,5)

Legenda: (CRO1) Meio cromogênico antes do Todd Hewitt e (CRO2) Meio cromogênico após o Todd Hewitt.

O isolamento de colônias sugestivas de SGB no AS1 ocorreu em 32 amostras do estudo e para 44 amostras houve isolamento de colônias sugestivas de SGB no AS2. O isolamento de colônias sugestivas de SGB tanto pelo AS1 como pelo AS2 ocorreu em 14 amostras (tabela 4).

Tabela 4 – Comparação do isolamento de colônias sugestivas de SGB isoladas de gestantes em atendimento pré-natal, em ágar sangue, antes e após o Todd Hewitt.

Resultado	MÉTODO		
	AS1 n (%)	**AS2** n (%)	**AS1 e AS2** n (%)
Positivo	32 (17,2)	44 (23,6)	14 (7,5)
Negativo	154 (82,8)	142 (76,4)	131 (70,4)

Legenda: (AS1) Ágar sangue antes do Todd Hewitt e (AS2) Ágar sangue após o Todd Hewitt.

Ao comparar o crescimento de colônias sugestivas de SGB nos meios de cultura antes e após a utilização do caldo de enriquecimento seletivo foi observado que para as 32 amostras com isolamento de colônias sugestivas de SGB no AS1 apenas 13 foram detectadas no CRO1. Enquanto que para as 44 amostras em que houve crescimento de colônias sugestivas de SGB no AS2, 28 foram detectadas no CRO2 (tabela 5).

Tabela 5 – Comparação do isolamento de colônias sugestivas de SGB isoladas de gestantes em atendimento pré-natal, em ágar sangue e identificação em meio cromogênico, antes e após o Todd Hewitt.

Resultado	MÉTODO					
	AS1 n (%)	**CRO1** n (%)	**AS1 e CRO1** n (%)	**AS2** n (%)	**CRO2** n (%)	**AS2 e CRO2** n (%)
Positivo	32 (17,2)	26 (14,0)	13 (7,0)	44 (23,6)	32 (17,2)	28 (15,0)
Negativo	154 (82,8)	160 (86,0)	141 (75,8)	142 (76,4)	154 (82,8)	138 (74,2)

Legenda: (CRO1) Meio cromogênico antes do Todd Hewitt, (CRO2) Meio cromogênico após o Todd Hewitt, (AS1) Ágar sangue antes do Todd Hewitt e (AS2) Ágar sangue após o Todd Hewitt.

Os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para as comparações entre as metodologias estão sumarizados na tabela 6. A detecção de SGB através do CRO2 foi o método que apresentou sensibilidade mais elevada no estudo (96,9%).

Tabela 6 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para as comparações de metodologias realizadas (p valor < 0,05).

Comparação de métodos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
CRO1 X CRO2	78,1	99,3	96,1	95,6
CRO1 X SORO	78,1	99,3	96,1	95,6
CRO2 X SORO	96,9	99,3	96,9	99,3
AS1 X AS2	47,7	92,2	65,6	85,1
AS1 X SORO	43,7	88,3	43,7	88,3
AS2 X SORO	87,5	89,6	63,6	97,2
AS1 X CRO1	50,0	88,1	40,6	91,5
AS2 X CRO1	84,6	86,2	50,0	97,2
AS1 X CRO2	43,7	88,3	43,7	88,3
AS2 X CRO2	87,5	89,6	63,6	97,2

Legenda: (VPP) Valor preditivo positivo, (VPN) Valor preditivo negativo, (CRO1) Meio cromogênico antes do Todd Hewitt, (CRO2) Meio cromogênico após o Todd Hewitt, (SORO) Sorogrupagem, (AS1) Ágar sangue antes do Todd Hewitt e (AS2) Ágar sangue após o Todd Hewitt.

O perfil de suscetibilidade revelou que as 32 (100%) cepas de SGB confirmadas por sorogrupagem no estudo foram sensíveis à ampicilina, cefotaxima e vancomicina. 6 (18,8%) amostras positivas para SGB apresentaram resistência à clindamicina, 8 (25,0%) foram resistentes à eritromicina e 1 (3,1%) apresentou resistência à penicilina (tabela 7).

Todos os 8 isolados de SGB que apresentaram resistência à eritromicina e/ou clindamicina tiveram resultados negativos no D-teste. Apenas 2 cepas

(25%) apresentaram fenótipo M e 6 isolados (75%) apresentaram fenótipo cMLSB (tabela 8).

Tabela 7 – Perfil de suscetibilidade das amostras de SGB isoladas de gestantes em atendimento pré-natal (n = 32).

Antibiótico	Suscetível n (%)	Resistente n (%)
Penicilina (10 unidades)	31 (96,9)	1 (3,1)
Ampicilina (10µg)	32 (100,0)	0 (0%)
Cefotaxima (30µg)	32 (100,0)	0 (0%)
Eritromicina (15µg)	24 (75,0)	8 (25,0)
Clindamicina (2µg)	26 (81,25)	6 (18,8)
Vancomicina (30µg)	32 (100,0)	0 (0%)

Tabela 8 – Diâmetros das zonas de inibição para eritromicina e clindamicina, resultado do D-teste, fenótipo de resistência e genes de resistência em amostras de SGB isoladas de gestantes em atendimento pré-natal (n = 08).

ID das amostras	Diâmetro da zona de inibição (mm) Eritromicina	Clindamicina	Teste D	Fenótipo	Genes
32	13 (R)	0 (R)	Negativo	cMLSB	mefA, ermB
79	20 (I)	0 (R)	Negativo	cMLSB	mefA
98	18 (I)	32 (S)	Negativo	M	mefA
128	0 (R)	0 (R)	Negativo	cMLSB	ermB
136	11 (R)	0 (R)	Negativo	cMLSB	ermTR
174	15 (R)	25 (S)	Negativo	M	mefA
177	15 (R)	0 (R)	Negativo	cMLSB	ermB
209	0 (R)	0 (R)	Negativo	cMLSB	ermB

Legenda: (ID) Código de identificação das amostras, (R) Resistente (I) Intermediário e (S) Sensível.

A figura 1 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose a 2% para os isolados de SGB que apresentaram resistência à eritromicina ou clindamicina no teste fenotípico, tendo sido realizada investigação genotípica através de PCR. A resistência em 4 isolados (44,4%) foi associada a genes *erm*B, o gene *mef*A foi verificado em 4 isolados (44,4%) e o gene ermTR foi associado a um único isolado (11,1%). Para 7 isolados (87,5%) foi detectada a presença de apenas um gene de resistência (*erm*B ou *erm*TR ou *mef*A). Para uma única amostra (12,5%) verificou-se a presença de dois genes de resistência (*mef*A + *erm*B). Nenhuma das cepas carregava o gene *lin*B.

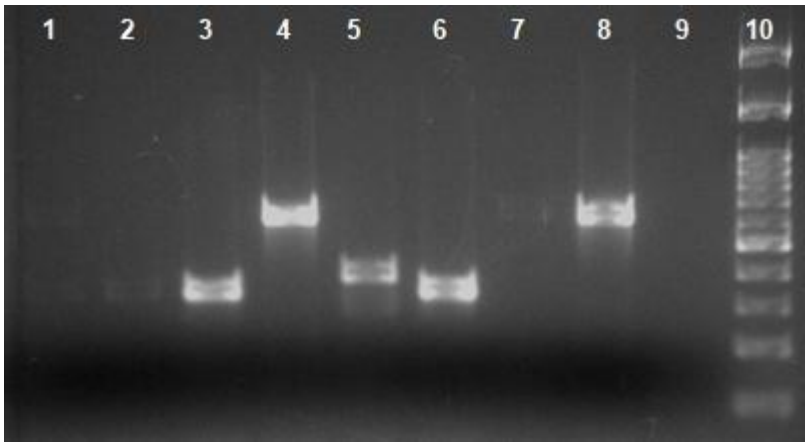


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 2% para os isolados de SGB resistentes à eritromicina e clindamicina. Linhas 1, 2, 3 e 6 (amostras 32, 79, 98 e 174): presença do gene *mef*A (348pb). Linha 5 (amostra 136): presença do gene *erm*TR (400pb). Linhas 1, 4, 7 e 8 (amostras 32, 128, 177 e 209): presença do gene *erm*B (640pb). Linha 9: controle negativo. Linha 10: Marcador de peso molecular (100kb).

Discussão

A prevalência de 17,2% de colonização por SGB encontrada no presente estudo está de acordo com a encontrada no estudo piloto (17,4%), com o CDC (2010) que aponta a prevalência de colonização entre 10-30% e com a encontrada em outras pesquisas brasileiras como a de Borger et al. (2005) que encontrou prevalência de 19,2%, e a de Função e Narchi (2013) com prevalência de 17,4%. A prevalência encontrada em nosso estudo também se assemelha a relatada em estudos internacionais como o de Lee e Lai (2015) realizado em Taiwan com prevalência de 21,8%, o de Matani et al. (2016) na Itália que encontrou prevalência de 25,5%, o de Mengist et al. (2016) na Etiópia com prevalência de 19,0% e o de Najmi et al. (2013) realizado no Paquistão que encontrou prevalência de colonização de 17%. Como o município de Vitória da Conquista-BA não realiza o rastreamento das gestantes para SGB na avaliação pré-natal, essa prevalência de colonização pode refletir no número de recém-nascidos que podem desenvolver doenças graves em decorrência da infecção por esse microrganismo e essa prevalência justifica a necessidade de inserção de um protocolo de triagem para SGB na rede de saúde do município.

Em relação a triagem para SGB, a detecção convencional utilizando um caldo de enriquecimento seletivo, como o Todd Hewitt, com cultivo subsequente em ágar sangue de carneiro a 5% e identificação presuntiva por CAMP com identificação confirmatória por sorogrupagem são as recomendações das diretrizes do CDC (2010). Essa recomendação se baseia

na justificativa de que a semeadura direta da amostra vaginoretal em qualquer meio de cultura, sem antes passar por um caldo de enriquecimento seletivo, faz com que a chance de identificar resultados falso-negativos seja elevada. Além disso, apesar de mencionar o uso de meios cromogênicos para identificação de SGB, o CDC destaca que os meios até então disponíveis não eram capazes de identificar cepas não-hemolíticas, que representam até 4% do total de cepas de SGB, já tendo sido demonstrado que as cepas não hemolíticas também estão associadas com infecções graves em recém nascidos (CDC, 2010; SALEM; ANDERSON, 2015; TAZI et al., 2008).

Alguns estudos já demonstraram que a inoculação de amostras vaginoretais diretamente em meios de cultura cromogênicos é tão sensível como o método recomendado pelo CDC (EL AILA et al., 2010; MORITA et al., 2014; PERRY et al., 2006; SALEM; ANDERSON, 2015). Em nosso estudo, houve diferença de sensibilidade importante entre o isolamento e identificação de SGB utilizando semeadura direta em meio cromogênico (78,1%) e após utilização do caldo Todd Hewitt (96,9%) confirmado por sorogrupagem. Em relação à especificidade não houve diferença, verificou-se especificidade de 96,3% para cada um dos desses métodos.

No presente estudo 32 amostras foram isoladas/identificadas no CRO2, dessas para apenas 1 não houve a confirmação por sorogrupagem, revelando dessa forma, sensibilidade de 96,9% e especificidade de 99,3%. Ao passo que sete das amostras identificadas como positivas para SGB por sorogrupagem não foram isoladas/identificadas no CRO1, mas somente no CRO2. Isso mostra que além da sensibilidade elevada (96,9%), o alto valor preditivo negativo (99,3%) da detecção pelo CRO2 faz com que ele se destaque no presente estudo como o melhor método para *screening* da colonização por SGB, já que a minimização de resultados falso-negativos que, neste caso, podem produzir um alto risco de infecção neonatal por SGB, é um dos requisitos mais importantes para um protocolo de triagem.

Uma pesquisa relatou 100% de sensibilidade para a detecção de SGB pelo meio chromID^{TM} Strepto B (BIOMERIÉUX) em comparação a 78% de sensibilidade para o ágar sangue, mesmo após enriquecimento em meio seletivo (MORITA et al., 2014). Em nosso estudo, quando comparamos o isolamento/identificação de colônias de SGB no meio cromogênico após o

Todd Hewitt e os resultados da sorogrupagem houve concordância de 96,9% entre as duas metodologias. Apesar dos fabricantes dos meios cromogênicos e CDC sugerirem confirmação da detecção das colônias características de SGB no meio cromogênico por testes bioquímicos ou imunológicos, os resultados encontrados no presente estudo sugerem que o meio cromogênico pode ser utilizado sem necessidade de testes confirmatórios, se configurando também como um método mais fácil e rápido de ser realizado. Atualmente, além das altas taxas de detecção, os meios cromogênicos oferecem alguns benefícios adicionais como a fácil visualização das colônias através de cores, detecção de cepas hemolíticas e não hemolíticas e incubação em ambiente aeróbico (MORITA et al., 2014).

Foi observado neste trabalho que a utilização do caldo de enriquecimento seletivo incrementa de forma significativa a sensibilidade do isolamento de SGB também para o meio ágar sangue. A sensibilidade e o VPN do AS1 para o crescimento de colônias sugestivas de SGB foi de 43,7% e 88,3%, respectivamente, comparado a sensibilidade e VPN para o AS2 que foi de 87,5% e 97,2%, respectivamente. Para as 32 amostras em que houve crescimento de colônias sugestivas de SGB no AS1 apenas 14 tiveram o resultado final confirmado por sorogrupagem, já para as 44 amostras com colônias sugestivas de SGB no AS1, 28 dessas tiveram resultado final confirmado por sorogrupagem. Esses dados mostram que apesar do cultivo em ágar sangue de carneiro a 5% ser indicado pelo CDC para o isolamento de SGB, este não é um meio seletivo e o crescimento de outras bactérias pode dificultar a detecção do microrganismo de interesse, principalmente as do gênero *Enterococcus,* por possuírem colônias muito semelhantes às de SGB, de tamanho pequeno, acinzentadas e poder ser não hemolíticas. Desse modo, um grande nível de experiência é exigido do analista para realizar a identificação do SGB (MORITA et al., 2014; PERRY et al., 2006).

Apesar do AS2 ter se mostrado melhor do que o AS1 para o isolamento de SGB, ainda assim, a semeadura no ágar sangue não apresentou um nível de sensibilidade tão elevado quanto a observada para o meio cromogênico. A sensibilidade de 87,5% e VPN de 97,2% fazem com que o AS2 seja categorizado neste estudo como o segundo melhor método para o isolamento de SGB. Entretanto, mesmo quando a amostra é inicialmente inoculada em um

caldo de enriquecimento contendo antibióticos que inibem boa parte da microbiota vaginal/retal, as colônias de SGB podem ser muito semelhantes às de outros microorganismos sendo necessário o uso de testes confirmatórios para identificar a espécie. Esse trabalho adicional pode ser evitado caso escolha-se utilizar um meio que além do crescimento permita a identificação da espécie na própria placa como o meio cromogênico.

O teste de CAMP, apesar de ter apresentado 100% de sensibilidade em relação à sorogrupagem, não pode ser utilizado como método confirmatório para identificação de SGB. Este deve ser usado apenas como método presuntivo, pois atualmente já se sabe que o fator CAMP não é totalmente específico para SGB, outras bactérias também podem ser CAMP-positivas como algumas cepas de *Streptococcus* do grupo A, C, F, G e cepas de *Listeria monocytogenes* (WHILEY; HARDIE, 2015). Nosso estudo revelou também que a execução do teste de CAMP deve acontecer de forma extremamente minuciosa, utilizando cepa padrão de *Staphylococcus aureus* que não tenha muito tempo de congelamento e placas de ágar sangue preferencialmente comerciais, caso contrário é possível que a técnica não funcione. A utilização de kits comerciais também não parece ser muito vantajosa devido ao curto prazo de validade e após abertura do kit as placas e fitas de hemolisina ressecarem rapidamente.

Além do estudo comparativo de metodologias, nos propomos a investigar o perfil de sensibilidade das cepas de SGB circulantes no município de Vitória da Conquista-BA, pois para instituir a antibioticoprofilaxia adequada e diminuir a incidência de doença estreptocócica neonatal é importante conhecer o perfil de sensibilidade das cepas. Nas últimas décadas o uso de eritromicina e clindamicina tem aumentado, sobretudo em pacientes alérgicas à penicilina, e a resistência a esses fármacos tem aumento de forma significativa em diferentes países (BORGER et al., 2005; PINHEIRO et al., 2009).

Neste estudo, as taxas de resistência à eritromicina (25%) e clindamicina (18,8%) foram superiores às encontradas em outros estudos brasileiros como o de Borger et al. (2005) que verificou resistência de 9,4% e 6,2%, respectivamente para eritromicina e clindamicina, Dutra et al. (2014) encontrou resistência de 4,1% para eritromicina e de 3,0% para clindamicina e Melo et al. (2016) relatou taxa de resistência de 8,1% para eritromicina e 5,9% para

clindamicina. A prevalência de resistência à eritromicina e clindamicina encontradas no presente estudo também foram superiores às relatadas em estudos realizados em outros países, que inclusive já implantaram protocolos de antibioticoprofilaxia para SGB. Pode ser citado o estudo de Bolukaoto et al. (2015) realizado na África do Sul que encontrou resistência de 21,1% e 17,2% para eritromicina e clindamicina, respectivamente, o de Frohlicher et al. (2014) na Suíça com 14,5% de resistência à eritromicina e 8,2% à clindamicina, o de Mengist et al. (2016) na Etiópia com taxa de resistência à eritomicina de 6,5% e à clindamicina de 3,2% e o estudo de Pinheiro et al. (2009) em Portugal com prevalência de resistência à eritromicina e clindamicina de 15% e 9,6%, respectivamente. Esses dados sugerem que o uso de eritromicina e clindamicina como fármacos de segunda escolha para gestantes alérgicas à penicilina deve ser acompanhada de testes de suscetibilidade de rotina para escolha da terapia mais apropriada.

As taxas de resistência fenotípica e genotípica encontradas neste estudo têm implicações clínicas em relação ao estabelecimento de opções terapêuticas, pois confirmam que isolados de SGB com resistência ao macrolídeo estão circulando na região onde o estudo foi realizado e devido ao fato desses genes poderem ser transferidos por plasmídeos e transposons, o monitoramento da resistência antimicrobiana para SGB deve ser realizada regularmente. Devido à alta prevalência de cepas de SGB resistentes aos antimicrobianos, diminuem as opções terapêuticas para realização da antibioticoprofilaxia e cada vez mais é necessário lançar mão do uso de antimicrobianos de maior espectro, que exercem pressão seletiva sobre outros microrganismos, contribuindo ainda mais para o aumento da resistência antimicrobiana (CDC, 2010; MATANI et al., 2016; MELO et al., 2016; MOUSAVI et al., 2016; NUMANOVIĆ et al., 2017; PINHEIRO et al., 2009).

Apesar da grande maioria dos estudos mostrarem que a suscetibilidade à penicilina para SGB é uniforme, a redução na sensibilidade já foi relatada por alguns autores (COOPER; ABBOTT; GOULD, 2016; DAHESH et al., 2008; KIMURA et al., 2008). No presente estudo, observamos apenas um isolado de SGB que apresentou resistência à penicilina no teste fenotípico, entretanto é necessário um estudo genotípico para confirmar essa resistência.

Os resultados do D-teste foram negativos para 100% das cepas de SGB isoladas que apresentaram resistência à eritromicina, ou seja, para nenhuma amostra foi observada redução de sensibilidade à clindamicina induzida pela eritromicina. Os fenótipos de resistência observados foram cMLSB (75%) e fenótipo M (25%). Em estudos semelhantes realizados no Brasil por Dutra et al. (2014) e em Portugal por Pinheiro et al. (2009) além dos fenótipos cMLSB e fenótipo M, também foi verificado o fenótipo iMLSB. Já no estudo de Bolukaoto et al. (2015) os quatro fenótipos (cMLSB, iMLSB, fenótipo M e fenótipo L) foram encontrados.

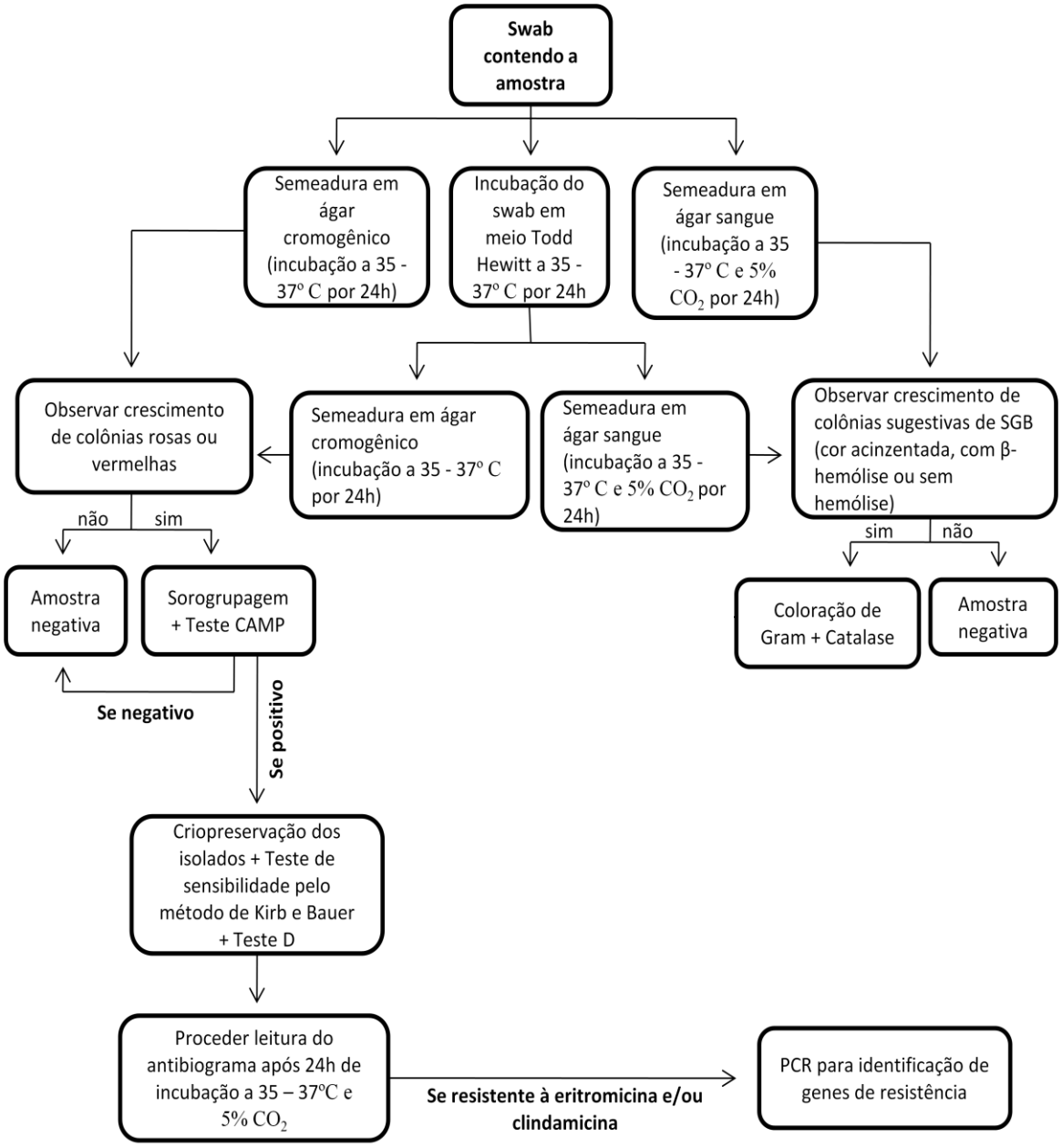
Para as duas amostras que no teste fenotípico apresentaram fenótipo M foi verificada a presença do gene *mef*A no teste molecular, achado perfeitamente compatível já que a literatura aponta que o gene *mef*A confere resistência apenas aos macrolídeos (BOLUKAOTO et al., 2015). Outro achado que demonstrou concordância entre o teste fenotípico e o teste molecular foram as 5 amostras com fenótipo cMLSB no teste fenotípico que apresentaram apenas o gene *erm*B ou o gene ermTR, genes da família *erm* que conferem resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (BOLUKAOTO et al., 2015). O gene *mef*A e o gene *erm*B foram associados a um isolado que apresentou fenótipo cMLSB, mostrando que para esta cepa, dois genes diferentes estão promovendo a resistência antimicrobiana. O fato de termos encontrado em nosso estudo uma amostra com fenótipo cMLSB que no teste genotípico só foi detectado o gene *mef*A, que confere resistência apenas aos macrolídeos, nos mostra que a resistência à clindamicina neste caso pode estar associada a outro gene não testado. O estudo de Dutra et al. (2014) que determinou genes de resistência de cepas de SGB em diferentes regiões do Brasil, não detectou a presença do gene *mef*A, fato que contrasta com nossos achados para este gene.

Este estudo destaca-se como pioneiro no município de Vitória da Conquista-BA no que se refere à comparação de metodologias de identificação e verificação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de SGB, fornecendo informações valiosas que podem impulsionar ações de saúde pública, fomentando e embasando a elaboração de protocolos de triagem e antibioticoprofilaxia para esse microrganismo, tendo em vista a minimizar a colonização em gestantes por SGB no momento do parto, o que poderá refletir

não somente na diminuição da mortalidade infantil do município como na diminuição de custos com internamentos prolongados de recém nascidos infectados por SGB.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Fluxograma de Procedimentos



Referências

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27ª ed. CLSI supplementt M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

BOLUKAOTO, J. Y. et al. Antibiotic resistance of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p. 6–12, 2015.

BORGER, I. L. et al. Streptococcus agalactiae em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 10, p. 575–579, 2005.

CDC. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. **MMWR**, v. 59, n. No. RR-10, p. 1–32, 2010.

COOPER, K.; ABBOTT, F.; GOULD, I. M. Reduced penicillin susceptibility of group B Streptococcus: An assessment of emergence in Grampian, Scotland. **British Journal of Biomedical Science**, v. 73, n. 1, p. 25–27, 2016.

DAHESH, S. et al. Point mutation in the group B streptococcal pbp2x gene conferring decreased susceptibility to β-lactam antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2915–2918, 2008.

DUTRA, V. G. et al. Streptococcus agalactiae in Brazil: Serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.

EL AILA, N. A. et al. Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B streptococcus carriage in pregnant women. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, 2010.

EL BEITUNE, P.; DUARTE, G.; MAFFEI, C. M. L. Colonization by Streptococcus agalactiae during pregnancy: maternal and perinatal prognosis. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 276–282, 2005.

FAN, A. H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of Polymerase Chain Reaction with Arbitrary Primers to Strain Identification of Mycoplasma gallisepticum. **American Association of Avian Pathologists**, v. 39, n. 4, p. 729–735, 1995.

FASSINA, J. R.; PIMENTA-RODRIGUES, M. V. Aspectos Laboratoriais da Identificação de Streptococcus agalactiae em Gestantes: uma mini revisão. **Interbio**, v. 7, n. 1, p. 26–40, 2013.

FRÖHLICHER, S. et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of group B streptococci in pregnant women: Results from a Swiss tertiary centre. **Swiss Medical Weekly**, v. 144, n. March, p. 1–6, 2014.

FUNÇÃO, M. J.; NARCHI, N. Z. Pesquisa do estreptococo do Grupo B em gestantes da zona leste de São Paulo. **Rev Esc Enferm USP**, 2013.

GROUP, E.; DISEASE, S. Committee opinion No. 485: Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns. **Obstetrics and Gynecology**, v. 117, n. 4, p. 1019–1027, 2011.

GUERRERO, C. et al. Use of Direct Latex Agglutination Testing of Selective Broth in the Detection of Group B Strepptococcal Carriage in Pregnant Women. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 61–62, 2004.

HONIG, E.; MOUTON, J. W.; VAN DER MEIJDEN, W. I. The epidemiology of vaginal colonisation with group B streptococci in a sexually transmitted disease clinic. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 105, p. 177–180, 2002.

KIMURA, K. et al. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2890–2897, 2008.

LE DOARE, K.; HEATH, P. T. An overview of global GBS epidemiology. **Vaccine**, v. 31, n. S4, p. D7–D12, 2013.

LEE, W. T.; LAI, M. C. High prevalence of Streptococcus agalactiae from vaginas of women in Taiwan and its mechanisms of macrolide and quinolone resistance. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, n. 5, p. 510–516, 2015.

MATANI, C. et al. Streptococcus agalactiae:Prevalence of antimicrobial resistance in vaginal and rectal swabs in Italian pregnant women. **Infezioni in Medicina**, v. 24, n. 3, p. 217–221, 2016.

MEEHAN, M. et al. Real-time polymerase chain reaction and culture in the diagnosis of invasive group B streptococcal disease in infants: a retrospective study. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 12, p. 2413–2420, 2015.

MELO, S. C. C. S. DE et al. Antimicrobial susceptibility of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. 1, p. 83, 2016.

MENGIST, A.; KANNAN, H.; ABDISSA, A. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of anorectal and vaginal group B Streptococci isolates among pregnant women in Jimma, Ethiopia. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 9–13, 2016.

MONEY, D. et al. The Prevention of Early-Onset Neonatal Group B Streptococcal Disease. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 35, n. 10, p. 939–948, 2013.

MORITA, T. et al. Evaluation of chromID strepto B as a screening media for Streptococcus agalactiae. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 2–5, 2014.

MOUSAVI, S. M. et al. Survey of strain distribution and antibiotic resistance pattern of group B streptococci (Streptococcus agalactiae) isolated from clinical specimens. **GMS hygiene and infection control**, v. 11, n. M, p. Doc18, 2016.

NAJMI, N. et al. Maternal genital tract colonisation by Group-B Streptococcus: A hospital based study. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 63, n. 9, p. 1103–1107, 2013.

NUMANOVIĆ, F. et al. Presence and resistance of Streptococcus agalactiae in vaginal specimens of pregnant and adult non-pregnant women and association with other aerobic bacteria. **Med Glas (Zenica)**, v. 14, n. 1, p. 98–105, 2017.

OLIVEIRA, M. V.; TELES, M. F.; VIANA, T. A. Prevalência e fatores de risco associados à colonização por Streptococcus agalactiae em gestantes atendidas no hospital municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista – BA. **C&D-Revista Eletrônica da Fainor,** v. 6, n. 1, p. 172–184, 2013.

PERRY, J. D. et al. Evaluation of a new chromogenic agar medium for isolation and identification of Group B streptococci. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 615–618, 2006.

PINHEIRO, S. et al. Prevalence and mechanisms of erythromycin resistance in Streptococcus agalactiae from healthy pregnant women. **Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology & Disease**, v. 15, n. 2, p. 121–124, 2009.

REINHEIMER, C. et al. Group B streptococcus infections in neonates admitted to a German NICU: Emphasis on screening and adherence to pre-analytical recommendations. **Early Human Development**, v. 103, p. 37–41, 2016.

SALEM, N.; ANDERSON, J. J. Evaluation of four chromogenic media for the isolation of Group B Streptococcus from vaginal specimens in pregnant women. **Pathology**, v. 47, n. 6, p. 580–582, 2015.

TAZI, A. et al. Comparative evaluation of Strepto B ID®chromogenic medium and Granada media for the detection of Group B streptococcus from vaginal samples of pregnant women. **Journal of Microbiological Methods**, v. 73, n. 3, p. 263–265, 2008.

THE, F.; ACADEMY, A.; PEDIATRICS, O. F. Recommendations for the Prevention of Perinatal Group B Streptococcal (GBS) Disease. **Pediatrics**, v. 128, n. 3, 2011.

WHILEY, R. A.; HARDIE, J. M. **Streptococcus**. [s.l: s.n.].

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Identificou-se uma prevalência de 17,2% de colonização por SGB nas gestantes do município. Por meio da comparação de metodologias pôde-se observar que a utilização do meio cromogênico após inoculação da amostra de secreção vaginal/retal em caldo de enriquecimento seletivo apresentou alta sensibilidade para ser utilizado como método de triagem para SGB. Além da alta sensibilidade, esse método é de fácil execução e possibilita resultados mais rápidos.

Quanto à verificação do perfil de sensibilidade das cepas de SGB isoladas no presente estudo, foram encontradas taxas significativas de resistência à eritromicina (25%) e clindamicina (18,8%) no teste fenotípico e na análise molecular foram identificados os genes de resistência ermB, ermTR e mefA. Esses dados sugerem que o uso de macrolídeos e lincosamidas para prevenção de infecção por SGB só deve ser realizado após obtenção do perfil de sensibilidade da amostra frente a esses antimicrobianos. Tais achados chamam atenção para a formulação de estratégias que contemplem o monitoramento contínuo do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, bem como políticas para o uso racional de antimicrobianos, principalmente os macrolídeos, uma vez que a ocorrência de resistência está diretamente relacionada ao consumo da droga.

Deste modo, o estudo em questão evidenciou a necessidade de implantação de protocolos de rastreamento e quimioprofilaxia para SGB no Município de Vitória da Conquista-BA. Os dados aqui apresentados poderão ser utilizados como base para escolha do melhor método de triagem para SGB e seleção da estratégia antimicrobiana mais adequada para prevenção das infecções neonatais. Uma vez adotadas essas medidas, certamente haverá reflexo na diminuição da mortalidade infantil do município assim como na redução de custos com o tratamento de recém-nascidos com a doença estreptocócica.

O custo médio mensal para manutenção de um recém-nascido na Unidade de terapia intensiva (UTI) neonatal devido a infecções é em torno de 30 mil reais (MWAMAKAMBA; ZUCCHI, 2014) e o custo para rastrear todas as gestantes do município no período de um ano seria em torno de 90 mil reais (valores extraídos de insumos do Comprasnet.BA). O número de partos que

ocorrem em média no município por ano é de 5 mil e nosso estudo encontrou uma prevalência de colonização por SGB de 17,2%. Considerando que 17,2% corresponde a 860 gestantes colonizadas por SGB e que cerca de 1-2% dos filhos dessas podem desenvolver doença invasiva, gera uma média de 12 recém nascidos que podem necessitar de internamento em UTI decorrente de infecção por SGB a cada ano no município.

Desse modo é perceptível que o custo para rastrear todas as gestantes no período de um ano é bem inferior àquele para manter na UTI esses neonatos que podem vir a desenvolver a doença, podendo gerar até 270 mil reais de excedente que poderia ser investido em outros programas e outras aquisições. E ainda que não houvesse esse excedente, seria extremamente importante o rastreamento pelo fato de disponibilizar leitos em UTI neonatal para casos em que as causas não são evitáveis.

APÊNDICE 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto Multidisciplinar em Saúde
Campus Anísio Teixeira

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

O estudo denominado "*Streptococcus agalactiae*: prevalência, perfil de sensibilidade e comparação de métodos para identificação, em gestantes atendidas no pré-natal das unidades básicas de saúde de Vitória da Conquista – BA", é uma pesquisa idealizada e coordenada por professores da Universidade Federal da Bahia (UFBA) - Campus Anisio Teixeira (CAT): professor Márcio Vasconcelos Oliveira e professor Cláudio Lima Souza.

O *Streptococcus agalactiae* ou estreptococo do grupo B (EGB) é uma bactéria que causa meningite e infecção generalizada grave em recém nascidos. Sendo a colonização materna por EGB o principal fator de risco para a infecção neonatal, assim é importante investigar a presença da bactéria nas gestantes com o objetivo de prevenir as infecções no recém-nascido. A sua contribuição será permitir que um profissional de saúde devidamente habilitado durante a consulta pré-natal realize uma pequena entrevista e colete amostras de secreção da vagina e da região anorretal com auxílio de um *swab*, que não lhe causará dor ou nenhum outro tipo de desconforto.

Esse estudo trará como benefício a realização do diagnóstico de colonização pelo EGB, além do perfil de sensibilidade aos antibióticos, possibilitando a você o tratamento caso apresente positividade, diminuindo os riscos de infecções no recém nascido.

Você pode aceitar participar desta pesquisa ou não, sem que isto interfira no seu atendimento pré-natal. Caso você aceite participar, não terá se quer nenhum tipo de custo, assim também como será assegurado o sigilo das informações prestadas, buscando assegurar sua integridade física, psíquica, moral, intelectual e social.

Se houver necessidade de solicitar a exclusão de sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis por meio dos seguintes telefones:

Márcio Vasconcelos – Telefone: (77) 99146-4018. Endereço: Rua Teodoro Sampaio, 391, centro.

Cláudio Lima – Telefone: (77) 99954-0509. Endereço: Via de Acesso D, casa 01, Condomínio Green Ville.

Fabrícia Fernandes – Telefone: (77) 98803-2499. Endereço: Rua Ernesto Ribeiro, 80, casa 07, Candeias.

Taís Andrade – Telefone: (77) 99191-0958. Endereço: Rua Mário Batista, 94, Recreio.

CEP Seres Humanos IMS/UFBA – Telefone: (77)3429-2720. Endereço: Rua Rio de Contas, 58, Qd 17, Lote 58, Candeias.

Após todos os esclarecimentos acerca da pesquisa, caso concorde em participar, assinará duas cópias deste presente termo que também será assinado pelo pesquisador responsável, ficando você de posse com uma delas.

Eu, _____, aceito livremente participar do estudo intitulado "*Streptococcus agalactiae*: prevalência, perfil de sensibilidade e comparação de métodos para identificação, em gestantes atendidas no pré-natal das unidades básicas de saúde de Vitória da Conquista – BA" sob a responsabilidade dos Professores Márcio Vasconcelos Oliveira e Cláudio Lima Souza da Universidade Federal da Bahia - Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira (UFBA). Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento.

Data: __/__/__

_____
Assinatura do Pesquisador responsável

_____
Assinatura da participante

Impressão digital

APÊNDICE 2

Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas
IMS/CAT - UFBA

LAUDO DE EXAME LABORATORIAL

Nome: Data da coleta:
Unidade de Saúde:

Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* (EGB)

Material: Secreção vaginal/ Secreção Retal

Resultado: (Positivo ou Negativo para *Streptococcus agalactiae*)

Antibiograma
Método Kirb Bauer

Sensível a:

Resistente a:

Prof. Dr. Márcio Vasconcelos Oliveira
SIAPE: 1739574
IMS - UFBA

Analista Responsável

APÊNDICE 3

Questionário

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto multidisciplinar em Saúde
Campus Anísio Teixeira

Nome: _____ **Idade (anos):** ____

Cor: branca ( ) negra ( ) parda ( ) outra **Peso(Kg):**____

Idade Gestacional:_____

Escolaridade: ( )Sem instrução ( )até 5 anos ( )5-9 anos ( )10 ou mais anos

Estado Conjugal: ( ) com companheiro ( ) Sem companheiro

Renda familiar (em salários):
( ) menor que 1 salário ( ) 1 a menos de 2 salários ( ) 2 a menos de 4 salários ( ) 4 ou mais salários
n^0 de gestações passadas: _____

Já sofreu aborto?( ) Sim ( ) Não

Já teve filho prematuro?( ) Sim ( ) Não

Utilizou antibióticos nesta gestação? ( ) sim ( ) não

Citar o(s) antibiótico(s) utilizado(s) e se possível quando

_____

È portadora de alguma destas doenças?

Pressão alta( )

Reumatismo ( )

Diabetes ( )

Outra ( ) _____

Utiliza algum(ns) medicamento(s)? ( ) Sim ( ) Não

Se utiliza, informe qual(is) _____

*Adapatado de Borger (2005)

ANEXO 1

REF 43 461

13327 **G** - ptBR - 2011/01

Gelose chromID™ Strepto B (STRB)

IVD

Meio cromogênico seletivo para a detecção dos estreptococos do grupo B (*S. agalactiae)*

INTRODUÇÃO E OBJETIVO DO TESTE

A gelose chromID™ Strepto B é um meio cromogênico seletivo utilizado para a detecção de *S. agalactiae* em mulheres grávidas e em recém-nascidos a partir de amostras de origem clínica.

O *S. agalactiae* é responsável por infecções graves no recém-nascido (meningite). A sua detecção é particularmente importante para a prevenção, o tratamento e o acompanhamento das infecções (1, 2, 3, 4, 5).

PRINCÍPIO

A gelose chromID™ Strepto B é constituída por uma base nutritiva que associa diferentes peptonas, 3 substratos cromogênicos e antibióticos. Estes componentes permitem detectar o *S. agalactiae* através do aparecimento espontâneo de colônias rosa pálido a vermelho. A maioria das outras espécies bacterianas e leveduras não se desenvolvem neste meio ou não formam colônias características.

APRESENTAÇÃO

	Meios prontos para usar
REF 43 461	Embalagem de 2x10 placas (90 mm) STRB *

* impresso em cada placa
1 folheto informativo a partir de www.biomerieux.com/techlib

COMPOSIÇÃO

Fórmula teórica.

Este meio pode ser ajustado e/ou suplementado em função dos critérios de qualidade impostos:

Peptona de caseína e de carne (bovina ou suína)	8 g
Extrato de coração cérebro (bovino ou suína)	5 g
Extrato de carne (bovino ou suíno)	2 g
Sais	1,085 g
Carboidratos	3 g
Mistura de tampão	1,15 g
Gelose	13 g
Mistura de antibióticos	17,3 mg
Substratos cromogênicos	0,58 g
Água destilada	1 l

pH 7,4

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

- Estufa de bacteriologia.

REAGENTES COMPLEMENTARES

Reagentes:

- Caldo de enriquecimento Todd Hewitt + antibióticos (Ref. 42 116)
- SLIDEX® Strepto Plus B (Réf. 58 819)

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- **Somente para diagnóstico *in vitro***
- **Somente para uso profissional.**
- Este dispositivo contém componentes de origem animal. O controle da origem e/ou do estado sanitário dos animais não pode garantir de maneira absoluta que estes produtos não contenham nenhum agente patogênico transmissível, é recomendado manipulá-los com as precauções de utilização relativas aos produtos potencialmente infecciosos (não ingerir; não inalar).
- As amostras, culturas bacterianas e produtos inoculados devem ser considerados potencialmente infecciosos e manipulados de maneira apropriada. As técnicas assépticas e as precauções habituais de manipulação para o grupo bacteriano estudado devem ser respeitadas durante toda a manipulação; consultar o "CLSI® M29-A, *Protection of Laboratory Workers from occupationally Adquired Infections; Approved Guideline* – Revisão em vigor". Para informações complementares sobre as precauções de manipulação, consultar o "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH – Última edição", ou a regulamentação em vigor no país de utilização.
- Não utilizar os reagentes após a data de validade.
- Não utilizar os reagentes se a embalagem estiver danificada.
- Não utilizar placas contaminadas ou desidratadas.
- A interpretação dos resultados do teste deve ser efetuada considerando o contexto clínico, a origem da amostra, os aspectos macro e microscópicos, e eventualmente, os resultados de outros testes.
- A utilização do meio pode ser delicada para as pessoas com dificuldades na apreciação de cores.
- Não utilizar placas que apresentem uma coloração rosa.
- O comportamento funcional apresentado foi obtido com o procedimento indicado neste folheto informativo. Qualquer desvio de procedimento pode alterar os resultados.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- **As placas conservam-se entre 2°C e 8°C dentro da sua embalagem até a data de validade.**
- O prazo de conservação das placas fora da embalagem, em sachet de celofane, é de 2 semanas a 2° - 8° C **ao abrigo da luz.**

AMOSTRAS

As amostras provêm de coletas de origem ano-vaginal e urinário na mulher grávida ou líquidos gástricos ingeridos pelo recém-nascido. Estes são inoculados diretamente na gelose ou após enriquecimento em caldo Todd Hewitt + antibióticos.
É conveniente respeitar as boas práticas de coleta e de transporte, adaptadas a cada tipo de coleta.

PROCEDIMENTO

A gelose chromID™ Strepto B pode ser utilizada segundo dois protocolos:

- Com enriquecimento da amostra em caldo seletivo: Todd Hewitt + antibióticos (1).
- Sementeira direta da amostra (5).

Este meio não deve ser exposto à luz, com exceção das etapas de inoculação e de leitura.

1. Deixar as placas atingir a temperatura ambiente, **ao abrigo da luz.**
2. Inocular a amostra.
3. A incubação deve ser efetuada em aerobiose a 37°C durante 18 a 24H, **ao abrigo da luz**. Na ausência de colônias características após 24H, a incubação deve ser prolongada até 48H.
   O enriquecimento aumenta significativamente a sensibilidade do teste, tanto após uma incubação de 18 a 24 H como após uma incubação de 48H (6).
   A escolha da temperatura de incubação é da responsabilidade do usuario em função da aplicação e das normas em vigor.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO

- Após incubação, observar o crescimento bacteriano e o aspecto das colônias: as colônias características de *Streptococcus agalactiae* são rosa pálido a vermelhas, redondas e em forma de pérola. Devem ser confirmadas com um teste bioquímico ou imunológico, por exemplo, o reagente Slidex® STREPTO B.
- As colônias de microrganismos pertencentes a outras espécies são inibidas ou desenvolvem-se dando uma outra cor (por exemplo : violeta, azul, incolor, etc).

CONTROLE DE QUALIDADE

Protocolo:

A fertilidade do meio pode ser testada em relação à cepa seguinte:

- *Streptococcus agalactiae* ATCC® 12386.

Resultados esperados:

Cepa	Resultados a 33° - 37° C
Streptococcus agalactiae ATCC® 12386	Crescimento após 24 horas Colônias rosa pálido a vermelhas

Nota:

É da responsabilidade do usuário considerar a natureza da aplicação e a legislação local em vigor para a execução do controle de qualidade (frequência, número de cepas, temperatura de incubação, etc).

LIMITES DO TESTE

- O desenvolvimento depende das exigências específicas de cada microrganismo. É, portanto, possível que algumas cepas de *S. agalactiae* com exigências específicas (substrato, temperatura, atmosfera de incubação, etc) não se desenvolvam. Dependendo das amostras analisadas, é possível associar uma gelose de sangue não seletiva.
- Algumas espécies resistentes aos antibióticos podem desenvolver-se e formar colônias de cor característica (por exemplo, *S. pyogenes*) .
- As colônias provenientes da gelose chromID™ Strepto B não devem ser utilizadas para os testes de identificação rapid® D 32 STREP e VITEK® 2 GP, e para os testes de antibiograma VITEK® 2 AST-P532 e VITEK® GPS 514.
- Algumas cepas de *S. porcinus* podem apresentar uma coloração característica de *S. agalactiae*.

COMPORTAMENTO FUNCIONAL

O comportamento funcional foi avaliado em 2 locais na França e na Bélgica, com amostras clínicas de origem humana no âmbito do rastreio dos estreptococos do grupo B ou *S. agalactiae*. As geloses foram inoculadas diretamente e após enriquecimento da amostra durante 24 horas, a 37° C, em caldo Todd Hewitt + antibióticos. As leituras foram efetuadas após 18-24 h e 48 h de incubação a 37° C, com uma atmosfera adaptada a cada meio.

A primeira avaliação (França) foi efetuada com 737 amostras (vaginais e urinárias da mulher grávida e líquido gástrico do recém nascido). A gelose chromID™ Strepto B foi comparada com um meio de referência e uma gelose Columbia de sangue + ANC (CNA).
No total, foram detectadas 255 amostras que contêm *S. agalactiae* em, pelo menos, um dos 3 meios, com todos os métodos.

	Porcentagem de recuperação das *S. agalactiae* Sem enriquecimento		
	chromID™ Strepto B	Meio de referência	CNA
18 – 24 h	116/255 (S = 45,5% [39,4-51.7]) (VPP = 99,1%)	98/255 (S = 38.4% [32.6-44.7]) (VPP = 100%)	109/240* (S = 45,4% [39,1-51,9])
48 h	143/255 (S = 56,1% [49,8-62,1]) (VPP = 92,3%)	133/255 (S = 52.2% [45.9-58.3]) (VPP = 100%)	127/240* (S = 52,9% [46,5-59,3])

	Porcentagem de recuperação do *S. agalactiae* Após enriquecimento		
	chromID™ Strepto B	Meio de referência	CNA
18 – 24 h	238/255 (S = 93,3% [89,4-95,8]) (VPP = 97.5%)	207/255 (S = 81,2% [75,8-85,6]) (VPP = 100%)	222/240* (S = 92,5% [88,4-95,3])
48 h	252/255 (S = 98,8% [96,5-99,6]) (VPP = 95,1%)	235/255 (S = 92,2% [88,1-94,9]) (VPP = 99,6%)	232/240* (S = 96,7% [93,5-98,3])

S : Sensibilidade de detecção e índice de confiança de 95%
VPP : Valor Preditivo Positivo
* : 15 amostras foram excluídas porque a identificação não foi efectuada

A segunda avaliação (Bélgica) foi efetuada com 175 amostras vaginais e vaginais-retais. A gelose Strepto B ID foi comparada com um meio de referência e uma gelose Columbia de sangue + ANC (CNA) em amostras inoculadas quer diretamente, quer após enriquecimento de 24 h, a 37°C, em caldo Todd Hewitt + antibióticos. As leituras foram efetuadas após 18-24 h e 48 h de incubação a 37°C, com uma atmosfera adaptada a cada meio.

No total, foram detectadas 38 amostras de *S. agalactiae* por, pelo menos, um dos 3 meios, com todos os métodos.

	Porcentagem de recuperação do *S. agalactiae* Sem enriquecimento		
	Strepto B ID	Meio de referência	CNA
18 – 24 h	26/38 (S = 68,4% [52,2 - 81,1]) (VPP = 83,9%)	30/38 (S = 79,0% [63,3 - 89,1]) (VPP = 100%)	31/38
48 h	32/38 (S = 84,2% [69,2 - 92,7]) (VPP = 74,4%)	33/38 (S = 86,8% [72,3 - 94,3]) (VPP = 100%)	31/38

	Porcentagem de recuperação do *S. agalactiae* Após enriquecimento		
	chromID™ Strepto B	Meio de referência	CNA
18 – 24 h	34/38 S = 89,5% [75,5 - 95,9]) (VPP = 91,9%)	35/38 (S = 92,1% [78,9 - 97,3]) (VPP = 100%)	36/38
48 h	34/38 (S = 89,5% [75,5 - 95,9]) (VPP = 81%)	36/38 (S = 94,7% [82,4 - 98,6]) (VPP = 100%)	37/38

ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS

Elimine todos os reagentes, assim como os materiais de utilização única, contaminados seguindo os procedimentos relativos aos produtos infectantes.
Os reagentes não utilizados podem ser eliminados como resíduos não perigosos.
Restos de amostras, reagentes e controles, considerados como resíduos do Grupo A1 devem ser coletados em um recipiente para este propósito e colocados em autoclave por 1 hora a 121ºC (soluções que contenham lixívia não podem ser colocadas na autoclave).
As embalagens secundárias não contaminadas pelo produto devem ser fisicamente descaracterizadas e acondicionadas como Resíduo do Grupo D, podendo ser encaminhadas para processo de reciclagem. As embalagens e materiais contaminados devem ser tratados da mesma forma que a substância que as contaminou.
É da responsabilidade de cada laboratório gerir os resíduos e os efluentes que este produz consoante a sua natureza e o seu perigo, e assegurar (ou fazer assegurar) o tratamento e a eliminação em conformidade com as regulamentações aplicáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centers for Disease Control and prevention – Morbidity and mortality weekly report. Prevention of perinatal group B Streptococcal Disease. – August 16, 2002, Vol. 51, n° RR-11.
2. COURTIOL S., CASETTA A., BOUSSOUGANT Y. - Infections à streptocoques du groupe B (SGB) - Feuillets de Biologie, 1998, vol. 34, n° 225,pages 15-21.
3. TRANCHAND S. – Les infections à *Streptococcus agalactiae*. – La lettre de l'infectiologue, 1992, vol. 7, n° 7,pages 246-249.
4. PERRY J.D., OLIVER M., GOULD F , NICHOLSON A , WRIGHT J.& GOULD F.K ..Evaluation of a new chromogenic agar medium for isolation and identification of Group B Streptococci.Microbiology Department, Freeman hospital,Newcastle upon tyne,United Kingdom.Letters in applied Microbiology ISSN 02666-8254.
5. Prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatale précoce. ANAES septembre 2001. Recommandation pour la pratique clinique. Service recommandations et références professionnelles.
6. ECCMID 06 - Poster 798 : « Prevention of perinatal Group B streptococcal infections : Evaluation of a new chromogenic medium Strepto B ID". C. Roure Hôpital de la Croix-Rousse-Lyon, France.

GARANTIA LIMITADA

A bioMérieux garante o desempenho do produto para o uso ao qual se destina desde que todos os procedimentos de uso, armazenamento e manuseio, a validade (quando aplicável) e as precauções sejam cumpridos estritamente conforme detalhado nas instruções de uso (IDU).
Exceto conforme expressamente previsto acima, a bioMérieux isenta-se de quaisquer garantias, incluindo qualquer garantia implícita quanto ao caráter comercial e à adequação a um propósito ou uso específico, e isenta-se de qualquer responsabilidade, direta, indireta ou consequente, por qualquer uso do reagente, software, instrumento e descartáveis (o "Sistema") que não o estabelecido nas instruções de uso.

QUADRO DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
	Referência do catálogo
	Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*
	Fabricante
	Limites de temperatura
	Prazo de validade
	Código do lote
	Consultar as intruções de utilização
	Conteúdo suficiente para "n" testes
	Conservar ao abrigo da luz
	Data de Fabricação

HISTÓRICO DAS REVISÕES

Categorias do tipo de modificação:

N/A	Não aplicável (primeira publicação)
Correção	Correção de irregularidade na documentação
Alteração técnica	Adição, revisão e/ou remoção de informações relativas ao produto
Administrativas	Implementação de alterações não técnicas perceptíveis para o usuário
Nota :	*As modificações menores de tipografia, gramática e configuração de página não aparecem no histórico de revisões.*

Data da versão	Referência do documento	Tipo de modificação	Resumo da modificação
2011/01	13327**G**	Administrativa	2016/05 : Criação da bula **13327G** para integrar os textos de acordo com a RDC 36/2015 – ANVISA Brasil.

Distribuído por bioMérieux Brasil Indústria e Comércio de Produtos Laboratoriais Ltda. -
Est. Mapuá 491- Lote 1 – Taquara- Jacarepaguá – Rio de Janeiro - RJ. CEP.: 22.713-320
CNPJ: 33.040.635/0001-71
Atendimento ao consumidor: 0800-264848
Prazo de Validade, N° de Lote, N° de Registro no Ministério da Saúde e Responsável Técnico:
VIDE EMBALAGEM

A BIOMÉRIEUX, o logótipo azul, VITEK, Slidex e chromID são marcas utilizadas, depositadas e/ou registadas, propriedade exclusiva da bioMérieux SA ou de uma das suas filiais.
ATCC é uma marca comercial da propriedade da American Type Culture Collection.
CLSI é uma marca comercial da propriedade da Clinical and Laboratory Standards Institute Inc.
As outras marcas e nomes de produtos mencionados neste documento são marcas comerciais dos respectivos proprietários.

BIOMÉRIEUX
bioMérieux SA
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tel. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomerieux.com

ANEXO 2

PREFEITURA MUNICIPAL DE VITÓRIA DA CONQUISTA

Secretaria de Saúde
www.pmvc.ba.gov.br

16 de Maio de 2016

CI nº 062/2016

Para: Unidades Básicas de Saúde da Família
Att. Gerentes e Enfermeiros das UBS

Informamos que a Comissão Municipal de Ensino e Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde analisou e emitiu parecer referente ao projeto de pesquisa: "Streptococcus agalactiae: prevalência, perfil de sensibilidade, e comparação de métodos para identificação, em cepas isoladas de gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde de vitória da Conquista - Ba" do pesquisador Márcio Vasconcelos Oliveira.

A pesquisa foi deferida e a coleta de dados deverá ser efetuada após a aprovação do referido projeto pelo CEP/UFBA.

Atenciosamente,

Michela Macedo Lima Costa

Assessoria de Planejamento e Educação Permanente

Coordenação do Pólo de Educação Permanente em Saúde

Rua Olivia Flores, 3000, Bairro Universidade (Estrada para UESB)
Fone: (77) 3429-3473
CEP 45031-000 - Vitória da Conquista - Bahia
Escola de Formação em Saúde da Família
apsaude.pmvc@hotmail.com

PREFEITURA MUNICIPAL DE VITÓRIA DA CONQUISTA

Secretaria de Saúde
www.pmvc.ba.gov.br

AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL PARA A COLETA DE DADOS E DECLARAÇÃO DE INFRAESTRUTURA

Eu, Michela Macedo Lima Costa, ocupante do cargo de Assessoria de Planejamento e Educação Permanente da Secretaria Municipal de Saúde do Município de Vitória da Conquista, autorizo a coleta de dados do projeto de pesquisa intitulado "Streptococcus agalactiae: prevalência, perfil de sensibilidade, e comparação de métodos para identificação, em cepas isoladas de gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde de vitória da Conquista - Ba" do pesquisador Márcio Vasconcelos Oliveira após aprovação do referido projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Bahia (CEP/UFBA) e declaro que esta instituição apresenta a infraestrutura necessária para a realização da referida pesquisa.

Vitória da Conquista, 16 de Maio de 2016.

Michela Macedo Lima Costa

Assessoria de Planejamento e Educação Permanente

Coordenação do Pólo de Educação Permanente em Saúde

Rua Olivia Flores, 3000, Bairro Universidade (Estrada para UESB)
Fone: (77) 3429-3473
CEP 45031-000 - Vitória da Conquista - Bahia
Escola de Formação em Saúde da Família
apsaude.pmvc@hotmail.com

ANEXO 3

INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE-UFBA-CAMPUS ANÍSIO TEIXEIRA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Streptococcus agalactiae: prevalência, perfil de sensibilidade, e comparação de métodos para identificação, em cepas isoladas de gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde de Vitória da Conquista ¿ BA.

Pesquisador: Márcio Vasconcelos Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 58104116.8.0000.5556

Instituição Proponente: Instituto Multidisciplinar em Saúde-Campus Anísio Teixeira

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.736.058

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa "Streptococcus agalactiae: prevalência, perfil de sensibilidade, e comparação de métodos para identificação, em cepas isoladas de gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde de Vitória da Conquista – BA", foi proposto pelo Prof. da UFBA Márcio Vasconcelos Oliveira, também fazendo parte da equipe: Claudio Lima Souza, Fabrícia Almeida Fernandes Santana, Isabela Roseno Guimarães, Tais Andrade Vian e Thamilles de Sousa Silveira Dias. O objetivo geral do estudo consiste em "Estimar a prevalência de colonização e avaliar o perfil de sensibilidade de Streptococcus agalactiae em gestantes atendidas no pré-natal de unidades básicas de saúde de Vitória da Conquista, utilizando um estudo comparativo de metodologias para, isolamento e identificação do EGB". Trata-se de um estudo transversal quantitativo, a ser realizado em unidades básicas de saúde do município de Vitória da Conquista. A população a ser estudada será de (209) gestantes de 32 a 40 semanas em acompanhamento pré-natal, provenientes de 06 Unidades (urbanas) de saúde do município. A intervenção junto as pacientes consistirá (i) da leitura do TCLE (pelo médico ou enfermeira da unidade responsável pelo programa pré-natal), (ii) coleta da assinatura (do mesmo), (iii) aplicação de um questionário, e (iv) coleta da amostra biológica (único swab vaginal/retal; a ser realizada pelos profissionais responsáveis pelo atendimento no pré-natal durante as consultas). Estas

Endereço: RIO DE CONTAS, 58 Qd. 17, Lote 58
Bairro: CANDEIAS **CEP:** 45.029-094
UF: BA **Município:** VITORIA DA CONQUISTA
Telefone: (77)3429-2720 **E-mail:** cepims@ufba.br

amostras serão encaminhadas para processamento no Laboratório de Análises Clínicas da UFBA (IMS/CAT). Como metodologia de processamento das amostras o estudo coloca que inicialmente os matérias de swab serão colocados para crescer; se houver crescimento, serão testados para identificação na amostra os estreptococos do grupo B (EGB), (teste CAMP, sorotipagem, caldo Granada e ágar cromogênico); e havendo identificação destes, serão realizados testes de sensibilidade a vários antibióticos (ampicilina, cefalotina, clindamicina, eritromicina, nitrofurantoína, penicilina). Será determinada o perfil genético de sensibilidade antimicrobiana a eritromicita através de PCR, seguida de eletroforese. Para o presente estudo, o banco de dados será construído em planilhas do pacote Microsoft
Office Excel e as análises estatísticas: descritiva, univariada e multivariada serão realizadas com o auxílio do pacote estatístico EPI-INFO. O orçamento do projeto é de R$ 62.163,39. Segundo cronograma de execução do projeto "preenchido na plataforma', a etapa de coleta e processamento das amostras serão iniciadas em 15/08/16; o que declaradamente está condicionado a aprovação pelo CEP.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo o autor, o objetivo geral (primário) do projeto consiste em "Estimar a prevalência de colonização e avaliar o perfil de sensibilidade de Streptococcus agalactiae em gestantes atendidas no pré-natal de unidades básicas de saúde de Vitória da Conquista, utilizando um estudo comparativo de metodologias para, isolamento e identificação do EGB". Os objetivos específicos (ou secundários) do estudo, segundo o pesquisador são "1. Avaliar a ocorrência de colonização por S. agalactiae em gestantes com 32 a 40 semanas de gestação atendidas nas unidades básicas de saúde. 2. Avaliar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos das cepas isoladas em amostras coletadas das participantes do estudo. 3. Determinar os seus fenótipos de resistência dos S. agalacitiae isolados no estudo. 4. Comparar as diferentes metodologias microbiológicas para identificação do S. agalactiae: crescimento em ágar cromógeno, teste de CAMP, caldo Granada e sorogrupagem, para os microrganismos isolados".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como riscos, o projeto cita "O único risco que poderia existir seria a contaminação do trato genito-urinário das gestantes. Entretanto, para evitar que isso aconteça, primeiro será coletada a amostra vaginal e posteriormente retal".

Como benefícios, foi citado "O estudo realizará o diagnóstico de colonização, além do perfil de sensibilidade para o EGB nas gestantes, possibilitando o tratamento para aquelas que

apresentarem positividade e diminuindo os riscos de infecções nos neonatos. Os resultados serão importantes para a realização de um protocolo geral de atendimento das gestantes durante o pré-natal nas unidades básicas de saúde. Com o estudo, será escolhida a melhor forma de identificação do EGB levando em consideração de custo, benefício e qualidade diagnóstica, possibilitando o tratamento das gestantes baseado na antibioticoterapia utilizando o perfil de sensibilidade microbiana encontrada em cepas de EGB isoladas da população estudada. Dessa forma este estudo é uma estratégia de intervenção para a melhoria das condições de saúde neonatal no município de Vitória da Conquista e região, visto a grande demanda de gestantes atendidas. A quimioprofilaxia da gestante colonizada diminui o risco de contaminação do recém-nascido e, portanto, a morbimortalidade infantil."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os estreptococos do grupo B (EGB), ou Streptococcus agalactiae, são cocos Gram positivos que se caracterizam por ser a espécie que apresenta o antígeno do grupo B de Rebeca Lancefield. Possui grande relevância médica em relação à infecção de neonatos ocasionando quadros de septicemia, pneumonia e meningite. Segundo os autores, os dados a serem obtidos através do presente projeto possibilitarão o embasamento para definição de protocolo terapêutico para gestantes e, além disso, poderá apontar o método diagnóstico para identificação do EGB dentro das possibilidades ofertadas pelo sistema de saúde do município.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Quanto aos termos de consideração obrigatória, além de preencher o formulário online foram submetidos os seguintes arquivos: (i) Folha de controle interno (local) do CEP; (ii) Folha de rosto (impressa da própria Plataforma Brasil); (iii) Curriculum Lattes dos participantes da pesquisa; (iv) Declaração de participação no projeto dos participantes da pesquisa; (v) Autorização para Coleta de Dados; e (vi) O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Também foi anexado (a Plataforma Brasil) o Projeto (em separado). Neste, estava incluído questionário a ser aplicado.

Recomendações:

Todas as recomendações feitas em parecer anterior foram devidamente esclarecidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não havendo pendências a serem sanadas indico a aprovação deste protocolo de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

O coordenador do CEP IMS/CAT avaliou e aprovou ad referendum este protocolo de pesquisa no

dia 20 de setembro de 2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_729964.pdf	19/09/2016 19:36:06		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Atualizado.docx	19/09/2016 19:35:24	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Thamilles.pdf	25/07/2016 22:59:49	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Tais.pdf	25/07/2016 22:59:17	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Marcio.pdf	25/07/2016 22:58:50	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Isabela.pdf	25/07/2016 22:55:07	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Fabricia.pdf	25/07/2016 22:54:34	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Claudio.pdf	25/07/2016 22:54:02	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Folha_Local.pdf	04/07/2016 20:59:05	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_pdf.pdf	04/07/2016 20:58:00	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	07/06/2016 17:34:18	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Parecer.pdf	01/06/2016 23:54:07	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	01/06/2016 23:51:06	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

VITORIA DA CONQUISTA, 20 de Setembro de 2016

Assinado por:
Luciano Pereira Rosa
(Coordenador)

Endereço: RIO DE CONTAS, 58 Qd. 17, Lote 58
Bairro: CANDEIAS **CEP:** 45.029-094
UF: BA **Município:** VITORIA DA CONQUISTA
Telefone: (77)3429-2720 **E-mail:** cepims@ufba.br