

Kateli Fiolo

“Identificação dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae* pela técnica de PCR de amostras isoladas em pacientes colonizados e infectados da cidade de Campinas e região”

Campinas, 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

“Identificação dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae* pela técnica de PCR de amostras isoladas em pacientes colonizados e infectados na cidade de Campinas e região”

Kateli Fiolo

Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas – UNICAMP, para obtenção de título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente. Sob orientação do Prof. Dr. Carlos Emilio Levy

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F51i Fiolo, Katelí, 1975-
Identificação dos sorotipos de Streptococcus
agalactiae pela técnica de PCR de amostras isoladas em
pacientes colonizados e infectados na cidade de
Campinas e região. / Katelí Fiolo. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2011.

Orientador : Carlos Emilio Levy
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Infecção. 2. Meningite. 3. Sepsis. 4.
Mortalidade Perinatal. 5. Tipagem Molecular. I. Levy,
Carlos Emilio. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Identification of serotypes of Streptococcus agalactiae by PCR of samples isolated from colonized and infected patients in Campinas and region

Palavras-chave em inglês:

Infection

Meningitis

Sepsis

Perinatal Mortality

Molecular Typing

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente

Banca examinadora:

Carlos Emilio Levy [Orientador]

Elsa Masae Mamizuka

Tomomasa Yano

Data da defesa: 31-08-2011

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Aluna Katelí Fiolo

Orientador: Prof. Dr. Carlos Emilio Levy

Membros:

Professor Doutor Carlos Emilio Levy

Professora Doutora Elsa Masae Mamizuka

Professor Doutor Tomomaza Yano

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/08/2011

Dedicatória:

Dedico esse trabalho a toda equipe de biólogos do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, por terem me ensinado, quase tudo que eu sei, desse universo microscópico fascinante que é a bacteriologia, também á minha amada mãe Clarice, meu amado esposo Geniclaudio e aos meus amigos, tanto aos que eu fiz nesses anos de mestrado como aos de uma vida inteira que nunca me abandonaram, muito obrigada todos vocês, pelo incentivo e encorajamento. Parabéns por esse trabalho que pertence a todos nós!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos Emílio Levy, Diretor da Divisão de Patologia Clínica da Unicamp e meu orientador, pelos ensinamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho e para a minha formação profissional.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp: Angela Von, Shirley, Marizete, Ení, Sérgio, D. Flor, Márcia, Maria Rita, Francisco, Silvio, Paula, Denise, Odair, Eliane, Regina, D. Jandira, Dalva, Cidinha, Wagner, Edson, Luzia, Sr. Carlos e D. Guilhermina e a todos os alunos de estagio e aprimoramento que passaram pelo Laboratório de Microbiologia pelos ensinamentos, pela companhia, amizade e momentos maravilhosos que nunca vou esquecer.

Aos técnicos e biólogos dos laboratórios que prestam serviço aos hospitais de Campinas e região por colaborar, separando e guardando as cepas que foram utilizadas nesse trabalho.

À minha amiga Cibele Zanardi Esteves ex-aluna do curso de Farmácia da Unicamp, por me ajudar, aconselhar e incentivar sempre que eu precisava com muito carinho e atenção.

À Prof.^a Dr.^a Carmem Silvia Bertuzzo, professora do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, por ceder o espaço em seu laboratório e disponibilizar muitos materiais, que foram indispensáveis para a viabilização deste trabalho.

À Luciana Cardoso Bonadia, Maria Madalena Vasconcelos Rosa, Marilza de Lima Santos, colaboradoras do Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, como também aos alunos de pós-graduação da Genética Médica, pela amizade, orientação e ajuda durante os experimentos.

Ao FAEPEX (Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão) da Unicamp, pela concessão de parte do suporte financeiro para a realização deste trabalho.

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

Charles Chaplin

Sumário

Resumo	XVIII
Abstract	XXVII
Introdução	37
1. Importância clínica.....	37
2. Aspectos microbiológicos dos <i>Streptococcus</i>	38
3. Classificação sorológica dos Streptococcus beta-hemolíticos.....	39
4. Classificação sorológica dos <i>Streptococcus agalactiae</i>	40
5. Fatores de virulência e associação com sorotipos	40
6. Importância clínica dos sorotipos no mundo e no Brasil.....	43
7. Aspectos do diagnóstico laboratorial.....	44
8. A produção de vacina e a distribuição dos sorotipos.....	45
Objetivo.....	49
Material e Metodologia	53
1. Delineamento do estudo	53
2. População de estudo	53
3. Material de Estudo.....	54
4. Critérios de exclusão.....	54
5. Processamento do material de pacientes grávidas do CAISM/UNICAMP e de pacientes internados no Hospital de Clínicas UNICAMP.....	54
6. Processamento do material de outros laboratórios....	55
7. Semeadura, isolamento e identificação.....	55
7.1 Identificação pelo sistema automatizado Vitek®2 Compact (BioMeriëux).....	56
8. Extração de DNA.....	58
9. Quantificação e diluição de DNA:.....	58
10. PCR multiplex e Reação de PCR.....	59
11. Eletroforese.....	60
12. Análise estatística	61

Resultados.....	65
Discussão.....	75
Conclusões	81
Referências Bibliográficas.....	85
Apêndice	99
Artigo submetido á RBGO	99
Anexos.....	119
1. Certificado da qualificação	119
2. Parecer do comitê de ética em pesquisa - Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP... ..	120
3. Autorização para os Laboratórios de Campinas e região.....	122

Lista de Abreviaturas

EGB – Estreptococos do grupo B

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

CAISM – Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher

RN – Recém-nascido

LCR – Líquido cefalorraquidiano

PCR – Reação da polimerase em cadeia

CDC - Centers for Disease Control

C3 - Proteína da membrana plasmática celular, solúvel no sangue, que participa das defesas inatas e adquiridas do sistema imunológico.

C3b - Produto da clivagem da proteína da membrana plasmática celular C3 que atua no sistema complemento imunológico.

C5a - Produto da clivagem da proteína da membrana plasmática celular C5, que atua no sistema complemento imunológico.

C5a peptidase – Enzima que cliva o complemento C5a, ligando-se a fibronectina das células do epitélio alveolar.

CAMP - Christie, Atkins e Munch-Petersen

CM101 - Carboidrato tóxico secretado pelo *Streptococcus agalactiae*

IgG – imunoglobulina G, anticorpo

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₂O - Água

O₂ – Oxigênio

CHROMagar® - Meio de cultura seletivo para identificação de *Streptococcus agalactiae*

TE - Solução tamponante utilizada principalmente, na técnica de extração de DNA

pH - Potencial hidrogeniônico

µl - Microlitro

mg - Miligrama

mL - Mililitro

SDS - Sodium dodecyl sulfate

NaCl - Cloreto de Sódio

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio

rpm – Rotações por minuto

Água MilliQ® - Água purificada e deionizada

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNTPS - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

TAQ - Taq DNA polimerase enzima termoestavel

min - Minuto

seg – Segundo

TBE – Solução tamponante, utilizada principalmente, na técnica de eletroforese

Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Seqüência de primers utilizados nas reações de PCR.....Página 59
- Tabela 2** - Distribuição mensal de positividade das amostras de pacientes atendidas no CAISM UNICAMP no período de 2007 e 2008.....Página 65
- Tabela 3** - Distribuição das amostras clínicas obtidas durante o período de 2007 até 2010 no Hospital de Clinicas Unicamp.....Página 66
- Tabela 4** - Estimativa da incidência da doença de início precoce causada por EGB em RN por mil nascidos vivos no CAISM/UNICAMP, durante o período de 2007 a 2010.....Página 67
- Tabela 5** - Contribuição dos laboratórios de Campinas e Região durante o período de setembro de 2008 a setembro de 2009.....Página 68
- Tabela 6** - Distribuição de amostras dos laboratórios de Campinas e região por tipo de material durante o período de setembro de 2008 a setembro de 2009.....Página 68
- Tabela 7** - Distribuição dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae* obtidos por PCR amostras provenientes do Hospital de Clínicas UNICAMP e de laboratórios de Campinas e região no período de 2007 a 2010.....Página 69
- Tabela 8** - Sorotipos de *Streptococcus agalactiae* obtidos por PCR, isolados em hemocultura e de líquido na região Campinas no período 2007 a 2010.....Página 72
- Tabela 9** - Sorotipos por PCR de *Streptococcus agalactiae* isolados em RNs e mães no CAISM e no Hospital Estadual de Sumaré no período de 2007 a 2010.....Página 72

Lista de Figuras

- Figura 1** - Preparação do inóculo para identificação no sistema automatizado Vitek®2 (BioMeriéux).....Página 57
- Figura 2** - Selagem e incubação dos cartões de identificação do sistema automatizado Vitek®2 (BioMeriéux).....Página 57
- Figura 3** - Esquema das três reações de PCR.....Página 60
- Figura 4** - Primeira reação de PCR para definição de espécie *Streptococcus agalactiae* ou EGB.....Página 70
- Figura 5** - Segunda reação realizada, para diferentes amostras, desta vez empregando os nove pares de primers específicos para os principais sorotipos.....Página 70
- Figura 6** - Terceira reação de PCR específica para os sorotipos.....Página 71

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Diferença do número de amostras obtidas de gestantes do CAISM nos anos de 2007 e 2008 em relação á positividade para o mesmo período..... Página 66



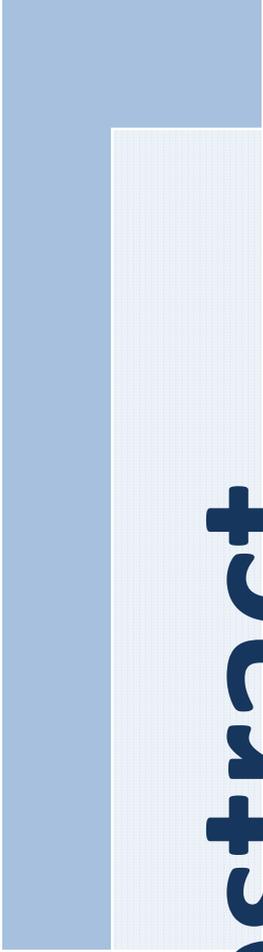
Resumo

XXVII

Resumo

Streptococcus agalactiae, conhecido como Estreptococo beta-hemolítico do grupo B (EGB), é classificado por diferenças capsulares que podem variar em dez sorotipos, alguns responsáveis por infecções materno-infantis sérias e debilitantes ou podendo ainda levar ao óbito. O EGB pode ocasionar também, infecções graves em adultos e idosos. OBJETIVO: Descrever e analisar o perfil epidemiológico dos sorotipos prevalentes de *Streptococcus agalactiae*, provenientes de infecção em recém-nascidos (RN), do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM /UNICAMP) e casos de infecção por EGB de diversos materiais do Hospital de Clínicas da Unicamp (HC UNICAMP) e de sete laboratórios que prestam serviços a outros hospitais maternidade na cidade de Campinas SP e região. MÉTODOS: Estudo transversal laboratorial realizado, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2010. As cepas de EGB foram triadas por provas laboratoriais manuais padronizadas, ou por automação microbiológica, Vitek®2 (BioMérieux). A seguir foram tipadas por PCR, utilizando sucessivamente primers específicos para espécie e para nove sorotipos de *Streptococcus agalactiae*. RESULTADOS: Durante os anos de 2007 e 2008 o programa de triagem materna do CAISM coletou 2.022 amostras de secreção retovaginal com média de 20,5% de positividade. Entre janeiro de 2007 a dezembro de 2010, foram selecionadas 120 amostras de EGB, isoladas de pacientes do HC UNICAMP, de diferentes materiais: urina (72,5%), sangue (hemocultura) (15,8%), secreção de feridas e abscessos (4,1%), líquido (2,5%), secreção ferida cirúrgica (1,6%), outras secreções (3,3%). Foram também selecionados, entre setembro de 2008 a setembro de 2009, 383 amostras de EGB isolados por laboratórios que prestam serviço a hospitais-maternidade de Campinas e região em: urina (54,3%), secreção retovaginal (37,8%), esperma (3,4%), sangue (2,3%), secreções gerais (1,8%) e líquido (0,2%). Foram avaliados, por análise molecular os sorotipos de 70 destas amostras, sendo 22 isoladas de sangue, 5 de líquido e 43 de outros materiais clínicos, escolhidos aleatoriamente, revelando a predominância do sorotipo tipo V (61,4%), seguido pelo tipo Ia (24,3%), tipo III (10,0%), tipo Ib (2,8%) e o tipo IV (1,4%). Dentre as amostras analisadas apenas seis eram provenientes de processos infecciosos em RNs do CAISM, sendo 1, 2,1 e 2 casos, respectivamente para cada ano, de 2007 até 2010, estimando-se para este período uma incidência média 0,55 casos de EGB por 1.000 nascidos vivos. Apenas mais um caso de RN foi isolado no Hospital Estadual de Sumaré no ano de 2009. Entre esses sete casos de RN, em dois foram encontradas amostras pareadas de mãe-filho. Nas amostras de RNs houve predominância do sorotipo V com 42,8%, seguido pelo tipo III e Ia com 28,5% cada um, nas amostras das duas mães foram encontrados os mesmos sorotipos de seus recém-nascidos. CONCLUSÕES: O número de amostras obtidas de recém nascidos foi abaixo do esperado, possivelmente em consequência da eficiência do programa de triagem e profilaxia materna do EGB, não podendo ser excluída a possibilidade de limitações dos recursos laboratoriais utilizados. Os sorotipos encontrados são os mais prevalentes na literatura mundial e associados à maior virulência. A técnica de PCR revelou ser muito útil para estudos epidemiológicos e de elevada especificidade.

Palavras-Chave: Infecção, meningite, sepse, mortalidade perinatal, tipagem molecular.



Abstract

XXXI

Abstract

Streptococcus agalactiae, also known as beta-hemolytic streptococcus group B (GBS), is classified by capsular differences that can vary in ten serotypes, some responsible for maternal and infant debilitating or serious infections and can even lead to death. The GBS can also cause, serious infections in adults and elderly. OBJECTIVE: To describe and analyze the epidemiology of prevalent serotypes of *Streptococcus agalactiae*, isolated from newborns (NB), from the Center for Integral Attention to Women's Health (CAISM / UNICAMP) and cases of GBS infection of various materials from Hospital de Clinicas, Unicamp (HC UNICAMP) and seven laboratories that provide services to other maternity hospitals in Campinas, São Paulo, Brazil and region. Methods. It was a cross-sectional laboratory study conducted in the period from January 2007 to December 2010. GBS strains were screened by standard manual microbiological laboratory tests, or by automation by Vitek ® 2 (bioMérieux). Following, they were typed by PCR, using specific primers for species and nine serotypes of *Streptococcus agalactiae*. RESULTS: During the years of 2007 and 2008 the CAISM maternal screening program collected 2,022 rectovaginal secretion samples with an average of 20.5% positivity. From January 2007 to December 2010, were selected a total of 120 GBS strains isolated at the HC UNICAMP as follows: urine (72.5%) blood (15.8%), secretion from wounds and abscesses (4.1%), cerebrospinal fluid (2.5%), wound secretion (1.6%) and other secretions (3.3%). From September 2008 to September 2009, were also selected 383 samples of GBS isolated by laboratories that provide service for maternity hospitals of Campinas region as follows: urine (54.3%), rectovaginal secretion (37.8%), sperm (3.4%), blood (2.3%), general secretions (1.8%) and cerebrospinal fluid (0.2%). Of these samples 70 strains were evaluated by molecular typing analysis, 22 isolated from blood, 5 from cerebrospinal fluid and 43 randomly selected isolates from other clinical materials, revealing the predominance of serotype V (61.4%), followed by serotype Ia (24.3%), serotype III (10.0%), serotype Ib (2.8%) and serotype IV(1.4%). Among the 70 samples, six were from newborns of CAISM with infectious processes, with 1, 2, 1 and 2 cases occurred respectively in each year from 2007 to 2010. For this period were estimated an average incidence of 0.55 cases of GBS for 1,000 born alive. Only one additional case of NB infection was isolated in the Hospital Estadual de Sumaré in 2009. Among these seven cases of NB infections, for only two were found paired EGB isolates from mother and newborn. In the NB samples was found predominantly the serotype V (42.8%), followed by type Ia and III with 28.5% for each, and in two samples of mothers were found the same serotype of their newborns. CONCLUSIONS: The number of samples of newborns was lower than expected, possibly due to the efficiency of the maternal GBS screening program and prophylaxis, but can not be excluded the limitations of laboratory resources used. The founded serotypes are the most prevalent in the literature and associated with increased virulence. The PCR technique has proved to be very useful for epidemiological studies and a have a high specificity.

Keywords: Infection, meningitis, sepsis, perinatal mortality, molecular typing.



Introdução

Introdução

1. Importância clínica

Streptococcus agalactiae ou *Streptococcus* do Grupo B (EGB) é uma bactéria cocóide, gram-positiva de potencial invasivo, especialmente no período perinatal, envolvendo recém-nascidos, mulheres grávidas ou no pós-parto e, mais recentemente, em pacientes idosos e em casos de infecção hospitalar (1,2). Em adultos pode causar desde quadros clínicos leves, como infecção vaginal e urinária, à infecções graves como celulite e fasciíte. Na gravidez, pode causar endometrite puerperal, amnionite, sendo de maior relevância os quadros de septicemia e meningites no neonato, além da ocorrência de partos prematuros ou nascimento de crianças a termo com baixo peso corporal (3-6).

Na década de 90, foi verificado um aumento na detecção de *Streptococcus agalactiae* como agente etiológico de infecções em mulheres não grávidas e homens com condições debilitantes, como portadores de câncer e diabetes mellitus ou acima dos 60 anos (6,7,8). O aumento das taxas de doenças por EGB em adultos não grávidos pode ser atribuído, em parte, ao crescimento da população de adultos com uma maior expectativa de vida em decorrência dos avanços da medicina (2).

Já a doença em recém-nascidos (RN) segue dois padrões, denominados de doença de início “precoce” e “tardio” (9,10). A doença precoce inicia-se durante os primeiros sete dias de vida; o microrganismo ascende ao útero, antes do parto, através de membranas fetais rompidas quando a criança deglute ou aspira líquido contendo a bactéria ou durante a passagem através do canal do parto colonizado pela bactéria (9,10). A infecção de início tardio é evidenciada de sete dias a três meses após o nascimento sendo a bacteremia associada com meningite uma apresentação clínica predominante (9,10).

Aproximadamente 25% dos casos de doença de início precoce, ocorrem em crianças prematuras (6,11-13). Geralmente, na doença tardia, a criança adquire o microrganismo no momento do parto ou no contato materno dos primeiros dias de vida, porém, na doença tardia, apenas em 50% dos casos as mães carregam o EGB do mesmo sorotipo que o presente no neonato. Há descrição de doença de início tardio em crianças cuja mãe teve o EGB isolado no leite materno, sugerindo ser também uma fonte de contaminação para a criança (14). A ocorrência de síndrome tardia de origem nosocomial também já foi descrita (11).

As formas clínicas em recém-nascidos abrangem a sepse, osteomielite, artrite séptica, pneumonia e meningite, podendo acarretar seqüelas neurológicas, visuais e auditivas graves em 15% a 30% dos nascidos acometidos, ou podendo levar ao óbito (10).

As gestantes são colonizadas pelo EGB na vagina ou no reto variando as casuísticas entre 10% a 30% (9,10). Na ausência de qualquer intervenção, estima-se que 1% a 2% dos recém nascidos de mães colonizadas desenvolve doença precoce por EGB (10). A letalidade da doença diminuiu 50% na década de 1970 para 4% a 6% nos últimos anos, principalmente devido aos protocolos de triagem, antibióticos profilaxia e avanços no cuidado neonatal (1,10)

Em 1996, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) publicou diretrizes para a prevenção de infecção estreptocócica do grupo B no período perinatal (15). As normas foram atualizadas e republicadas em 2002 pelo CDC padronizando a triagem de mulheres grávidas para detecção de colonização pelo EGB entre a 35^a e 37^a semanas de gestação, indicando profilaxia antibiótica, nas infectadas, durante o trabalho de parto (12). Os antibióticos utilizados na profilaxia são a penicilina ou ampicilina, em casos de alergia a estas drogas, eritromicina ou clindamicina (12).

O aparecimento, em diferentes países, de cepas de EGB resistentes (12), aumentou a busca por alternativas na prevenção (12,16). Assim, em junho de 2009, o CDC reavaliou as estratégias de prevenção com base em dados coletados após a emissão de Diretrizes de 2002, dando novas orientações, referentes ao uso racional dos antibióticos, triagem de urina e metodologias laboratoriais (10).

Na ausência do licenciamento de uma vacina, a triagem universal e a profilaxia antibiótica continuam a ser os pilares da prevenção da doença (10). As recomendações de prevenção ao EGB nos EUA resultaram em um declínio na incidência de casos da doença precoce em recém nascidos de 1,7 casos por mil nascidos vivos na década de 1990, para cerca de 0,34 casos por mil nascidos vivos em 2008 (10).

2. Aspectos microbiológicos dos *Streptococcus*

O *Streptococcus* é um gênero de bactérias gram-positivas, ou seja, se colorem de roxo quando submetidas á técnica de coloração de Gram, por terem uma camada peptidoglicano maior que a lipoprotéica em sua parede celular. Estão dispostas em forma de cocos que se dividem em apenas um plano, formando cadeias curtas ou longas (11 13,17).

Não produzem a enzima catalase, sendo, portanto, catalase negativos, uma distinção importante em relação aos *Staphylococcus* que são cocos agrupados onde a maioria é catalase positiva. Algumas espécies possuem cápsula na fase de crescimento logarítmico e estacionária. Entre os sistemas de nomenclatura desenvolvidos para os estreptococos, destacam-se aqueles baseados em suas características hemolíticas, que é a capacidade que algumas bactérias têm de romper as hemácias de vários mamíferos e de acordo com o tipo de lise celular, a mesma pode ser considerada, beta, alfa ou gama hemolítica. No caso das beta-hemolíticas ocorre uma lise total das hemácias, as alfa-hemolíticas produzem uma lise parcial e as gama-hemolíticas não produzem lise em hemácias (11,13,17).

Todos os estreptococos são aeróbios preferenciais e anaeróbios facultativos. São bactérias que produzem principalmente ácido láctico como produto final da fermentação (13,17).

Streptococcus agalactiae, também conhecido como Estreptococo beta-hemolítico do grupo B (EGB), é um microrganismo invariavelmente capsulado. Existem várias formas de identificação desta espécie, sendo a primeira triagem realizada através da inoculação da bactéria suspeita em agar sangue de carneiro (16). Muitas vezes a hemólise é discreta, detectada somente após a retirada da colônia do meio de cultura com sangue. As características microscópicas após a coloração de Gram, o teste da hidrólise do hipurato e o teste de CAMP são os testes que permitem identificar presuntivamente o *Streptococcus agalactiae* (17).

O *Streptococcus agalactiae* foi reconhecido inicialmente como uma bactéria comensal no ser humano e causador de mastite bovina no gado, contaminando o leite e seus derivados, sendo posteriormente relacionado à patologia humana (16).

3. Classificação sorológica dos Streptococcus beta-hemolíticos

A produção de hemólise não é suficiente para distinguir os estreptococos, sendo assim, Rebecca Lancefield em 1933 desenvolveu um método sorológico para a distinção dos estreptococos com beta-hemólise (7, 11, 18,19).

A classificação dos estreptococos nesses grupos sorológicos baseou-se nas características antigênicas de um polissacarídeo de composição variável chamado carboidrato C, localizado na parede celular e detectado por diferentes técnicas imunológicas. Tomando por base esse polissacarídeo, os estreptococos foram divididos em grupos sorológicos, designados por letras maiúsculas do alfabeto, denominados

grupos de Lancefield: A, B, C, E, F, G, H e K. Nos grupos D e N estes antígenos são ácidos teicóicos, localizando-se entre a parede e a membrana celular (7, 11, 18,19).

Esse método de identificação foi amplamente aceito e utilizado para a identificação dos estreptococos beta-hemolíticos. (11)

4. Classificação sorológica dos *Streptococcus agalactiae*

Somente no início da década de 30, após Rebecca Lancefield ter desenvolvido seu método de tipagem para os estreptococos hemolíticos, foi que, se diferenciaram estreptococos do grupo B do estreptococo do grupo A, que são importantes causadores de infecções em humanos. (11).

O EGB pode ser subclassificado em sorotipos de acordo com diferenças antigênicas de um polissacarídeo de composição variável, localizado na região externa da parede celular e diferente do carboidrato C de Lancefield (10 13,17).

Existem dez sorotipos capsulares distintos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII) (17), sendo o mais novo IX, descrito em 2007 por Slotvet, H e colaboradores (20).

A variabilidade sorotípica capsular está relacionada com a organização de quatro compostos fundamentais: Glucose, Galactose, N-Acetil-glucosamida e Ácido Neuro-Acetil-Neuramicina (Ácido Siálico) que formam a cápsula do microrganismo. Portanto diferentes combinações desses compostos levam aos diferentes tipos de cápsula encontrados em EGB. (21-23)

A conformação bioquímica de cápsula do EGB também está presente na superfície de membranas celulares de mamíferos, confundindo o sistema imunológico e proporcionando uma camuflagem extremamente eficiente, que age impedindo o reconhecimento e a fagocitose do EGB pelas células do hospedeiro. Cepas de EGB não capsuladas, raramente causam doenças em humanos e são facilmente removidas pelo sistema imunológico. (24).

Fatores microbiológicos e imunológicos, como o sorotipo de EGB, grandes inóculos bacterianos e baixos níveis de anticorpos contra os polissacarídeos capsulares da cepa colonizadora, são importantes fatores de risco e sempre devem ser levados em consideração nos casos de infecção. (25)

5. Fatores de virulência e associação com sorotipos

A variedade capsular tem relação com a virulência e identificar os sorotipos é fundamental para estudos clínicos e epidemiológicos. (10,17) A cápsula age, promovendo à aderência do microrganismo às superfícies epiteliais para posterior

invasão tecidual; porém seu papel mais importante como fator de virulência está na capacidade de seus polissacarídeos inibirem a fagocitose realizada pelos macrófagos e neutrófilos do hospedeiro (26).

O ácido siálico existente na conformação da cápsula bacteriana é um fator essencial para a patogenicidade, já que, age impedindo a deposição do componente C3b do sistema complemento e a fagocitose; amostras de EGB sorotipo III, cuja cápsula contém níveis elevados deste constituinte, são consideradas, mais virulentas (27).

O isolamento do sorotipo tipo III é relatado em algumas importantes casuísticas como responsável por 60% dos casos de sepse neonatal e de 80% dos casos de meningite infantil (28,30). Além da cápsula, o estreptococo do grupo B também produz outros potenciais determinantes de virulência (28-30). Como ocorre com o estreptococo do grupo A, o do grupo B também possui C5a peptidase, C5a é produto da clivagem do sistema complemento, produzido pelas células epiteliais, que age como um atrativo para células inflamatórias e está envolvido no processo de inflamação pulmonar. A enzima C5a peptidase produzida pelo EGB cliva o C5a interferindo com a quimiotaxia mediada pelos neutrófilos, essa peptidase também está relacionada com a persistência da colonização, quando se liga à fibronectina, servindo como uma invasina e adesina bacteriana impedindo a opsonização e a remoção do *Streptococcus agalactiae* do epitélio (24,31-34).

Outro fator de virulência muito importante é a beta-hemolisina/citolisina que atua principalmente em infecções pulmonares (tecidos alveolares e epiteliais) sugerindo ser responsável pela infecção pulmonar em neonatos (35-38).

A captação do EGB pelas células alveolares e endoteliais dos pulmões estimula a produção da beta-hemolisina que lisa diretamente à membrana celular, formando poros e permitindo a invasão bacteriana para corrente sanguínea, além de produzir apoptose e a destruição de linfócitos e macrófagos (39). A beta-hemolisina também estimula a produção de interleucina-8, uma potente citocina pró-inflamatória, aumentando a lesão pulmonar (24).

O fator CAMP também tem sido citado como um dos fatores de virulência da bactéria; ele é expresso na forma de uma proteína extracelular que forma poros e provoca lise nas membranas celulares do hospedeiro (40). O CAMP é mais conhecido pela sua utilidade na identificação laboratorial do EGB; na prova de CAMP, avalia-se a produção de um fator extracelular de hemólise, produzido por EGB, e que intensifica a hemólise de cepas de estafilococos produtores de beta-lisina em agar sangue de

carneiro, o termo CAMP refere-se às iniciais dos autores que primeiro o descreveram: Christie, Atkins e Munch-Petersen (13).

Existe também, a virulência extracelular da hialuronidato liase, enzima da família das hialuronidasas que degrada o ácido hialurônico da matriz extracelular auxiliando a disseminação da bactéria através dos tecidos do hospedeiro. O ácido hialurônico encontra-se em altas concentrações na placenta, nos tecidos fetais e fluídos amnióticos, sugerindo que essa enzima possa provocar a ruptura da bolsa e óbito fetal. A oligopeptidase uma enzima que é capaz de degradar pequenos peptídeos, inclusive fatores protéicos de defesa do hospedeiro e o carboidrato tóxico CM101, molécula de carboidrato, que se liga a proteínas da superfície celular de vasos sanguíneos dos pulmões de recém-nascidos, marcando-os para a destruição pelo sistema imunológico, são compostos secretados pelo EGB, e foram ambos detectados em líquido e urina de neonatos com sepse (26,41).

Um segundo substrato da hialuronidato liase é a condroitina sulfato, que está envolvida na modificação de estruturas e macromoléculas de transporte, facilitando, hipoteticamente, a penetração da bactéria em tecidos durante as infecções (26 41,42).

Observou-se também, a produção da enzima superóxido-dismutase e do pigmento carotenóide que auxiliam a bactéria na capacidade de sobreviver por longos períodos dentro dos lisossomos de macrófagos protegendo-a contra o estresse oxidativo e da inibição do sistema complemento, reduzindo ainda mais a capacidade de reconhecimento e ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, especialmente dos recém-nascidos prematuros (40).

A ativação de processos inflamatórios através de outras proteínas de superfície do EGB é responsável pela sepse e pela disfunção de múltiplos órgãos, mediados principalmente pelo fator de necrose tumoral alfa e pela interleucina-1, além de outras citocinas produzidas pelo hospedeiro. O processo inflamatório é mais intenso no cérebro e nas meninges, estimulado pelo endotélio da barreira hemato-encefálica (43).

Alguns sorotipos expressam antígenos protéicos de superfície, sendo mais conhecidos os antígenos c, R e X. Os antígenos protéicos, juntamente com os polissacarídeos capsulares tipo-específico, conferem imunidade protetora à bactéria (44).

O antígeno c é um complexo formado de duas subunidades uma alfa e outra beta. A bactéria pode apresentar apenas uma ou ambas as subunidades, e os sorotipos que mais produzem a proteína c são Ia, Ib e II (44). O alfa-antígeno, assim como a

cápsula, protege a bactéria contra a fagocitose, e ambos, alfa e beta antígeno, assim como os polissacarídeos capsulares, provocam a resposta imune (45). Amostras contendo o antígeno “c” São designadas como Ia/c, Ib/c, II/c, III/c (46).

O antígeno R é classificado em quatro tipos, de R1 a R4, de acordo com suas reações de imunoprecipitação em gel de agarose, sendo o R4 mais predominante em amostras de humanos e encontrados nos sorotipos II e III. As amostras que possuem a proteína c, não possuem a proteína R e vice-versa, produzem uma resposta imune que interfere na fagocitose (44,47).

O antígeno X tem sido pouco estudado no que se refere á composição antigênica entre amostras clínicas de EGB, sendo encontrado freqüentemente em cepas provenientes de animais, necessitando de pesquisas adicionais em *Streptococcus agalactiae* isolados de humanos (44 48,49). Anticorpos formados contra o antígeno X induzem á deposição do complemento C3 pela via clássica e são capazes de estimular a morte bacteriana por opsonização na ausência do C3 (50).

Outra proteína de superfície celular, antigenicamente distinta da proteína C (alfa e beta), tem sido encontrada na maioria das cepas do sorotipo III, embora seja incomum nos outros sorotipos, essa proteína é chamada Rib, estudos com essa proteína, sugerem que o nível de anticorpos para essa proteína pode afetar a susceptibilidade do neonato á doença por EGB (51).

É possível que a combinação das proteínas Rib e alfa possam ser usadas no desenvolvimento de uma vacina, já que a grande maioria das cepas virulentas de *Streptococcus agalactiae* expressa uma dessas duas proteínas, quando não ambas (51).

Dentre esses fatores de virulência, com o objetivo de identificar o microrganismo na rotina de um laboratório microbiológico, é possível testar o fator CAMP e a produção de hialuronidase através do teste de hidrólise do hipurato, todos os demais exigem testes específicos de biologia molecular ou imunológicos.

6. Importância clínica dos sorotipos no mundo e no Brasil

São escassos os dados de sorotipos pesquisados em populações. Assim, encontramos na Inglaterra e Noruega os sorotipos predominantes III (33,8%) e Ib (21,3%) (52) e na China os sorotipos II (33%), III (23%) e Ia (16%) (53). Já nos EUA em 2000, os dois sorotipos mais comuns foram o tipo III e V onde o tipo III causa mais de 50% das doenças infantis, o tipo V cerca de 40% das doenças de adultos não gestantes enquanto o tipo Ia é responsável por cerca de um terço da doença em qualquer grupo (46). Um estudo sueco de 2000 também encontrou o sorotipo III como o mais

frequente (32%), seguido do sorotipo V (22%) (54). Estes dados são concordantes com um estudo africano do mesmo ano (55). No Canadá, 81% das doenças neonatais precoces foram causadas pelo EGB dos sorotipos Ia, III e V (56). Na Argentina, o sorotipo III esteve presente em 47,6% (57). Na Austrália, em 912 isolados o sorotipo III foi prevalente seguido por Ia e V (58). Alguns relatos de 2010, um da Coreia e outro do Líbano encontraram o sorotipo V como o mais comum seguido pelo sorotipo Ia e na Malásia o sorotipo V seguido por VI e III (59-61).

Os dados sobre os sorotipos mais prevalentes no Brasil são escassos. No Rio de Janeiro em 1982, os sorotipos mais frequentes foram Ib e Ia (62). Em Florianópolis em 1986, os sorotipos mais frequentes foram II e o III (63). Um estudo em 2005 encontrou o sorotipo Ib predominante entre gestantes de Jundiaí, São Paulo, seguido pelos sorotipos II e Ia (64,65) e mais recentemente em 2010 um estudo de Curitiba no Paraná revelou o tipo Ia como o mais frequente, seguido por IV e III respectivamente (66). Esses sorotipos encontrados não são muito virulentos, exceto o sorotipo III, que é um dos mais encontrados nas infecções em neonatos, principalmente meningite e septicemia (17).

7. Aspectos do diagnóstico laboratorial

Cada etapa do processo laboratorial (coleta, isolamento e apropriada identificação do EGB) é crítico para o sucesso da caracterização deste agente, assim como a experiência do profissional que executa estas tarefas (10 13,16).

A utilização de meio de cultura seletivo, contendo agentes antimicrobianos que são capazes de inibir o crescimento de outros microorganismos comuns da microbiota, é importante para crescimento de *Streptococcus agalactiae*, com aumento da possibilidade de seu isolamento em aproximadamente 50%, reduzindo os casos de falso positivo e falso negativo. O meio de cultura seletivo mais empregado é o caldo de Todd Hewitt, contendo gentamicina e ácido nalidíxico ou colistina e ácido nalidíxico. Caldo seletivo contendo substratos cromogênicos que mudam de cor na presença do EGB beta-hemolítico vem sendo muito utilizado; entretanto para uma pequena quantidade, de cepas não hemolíticas, podem resultar em falsos negativos (10). A utilização de placas de agar sangue é útil para isolamento e a identificação presuntiva pode ser feita pelo teste de CAMP, teste de hidrólise do hipurato, identificação pela aglutinação com partículas de látex com antisoro para *Streptococcus* do Grupo B, ou mais recentemente com alguns meios cromogênicos em agar (67,68).

Além de técnicas convencionais de identificação para EGB, foram desenvolvidas sondas de DNA (10,69) e testes de amplificação de ácidos nucleicos, como reação em cadeia da polimerase (PCR) (70,71). Foi observado aumento da sensibilidade na identificação de EGB em amostras colhidas no intra-parto e amplificadas por PCR (94,0%) em relação a aquelas obtidas no pré-natal e cultivo enriquecido (54.3%) (10 70,72).

8. A produção de vacina e a distribuição dos sorotipos

É grande o interesse do desenvolvimento de uma vacina para a prevenção das infecções pelo EGB, reduzindo a colonização materna e prevenindo a transmissão neonatal. Ainda não existe vacina licenciada, mas os estudos em fase I e II têm revelado que, mães imunizadas, produzindo anticorpos IgG tipo específico, protegem seus RNs de doença invasiva (10 73,74). Para planejamento da composição antigênica dessa vacina, extensivos estudos epidemiológicos serão necessários para avaliar a distribuição dos sorotipos de EGB nas diferentes populações (10,17).

Antes da década de 90, os sorotipos IV, V e VIII eram pouco encontrados. A partir da década de 90, o sorotipo V tornou-se mais prevalente. Estudos internacionais demonstraram que os sorotipos: Ia, Ib, II, III e V são mais encontrados em amostras vaginais e em isolados clínicos. (75,76)

Dentre os dez sorotipos conhecidos, relata-se que o sorotipo III é o mais encontrado nas doenças do neonato principalmente meningite e septicemia e é o segundo mais detectado em amostra vaginal de gestantes assintomáticas; o sorotipo Ia é o mais isolado em amostra vaginal e o sorotipo V têm predominado em casos de infecção em adultos, excluindo-se as gestantes. (10).

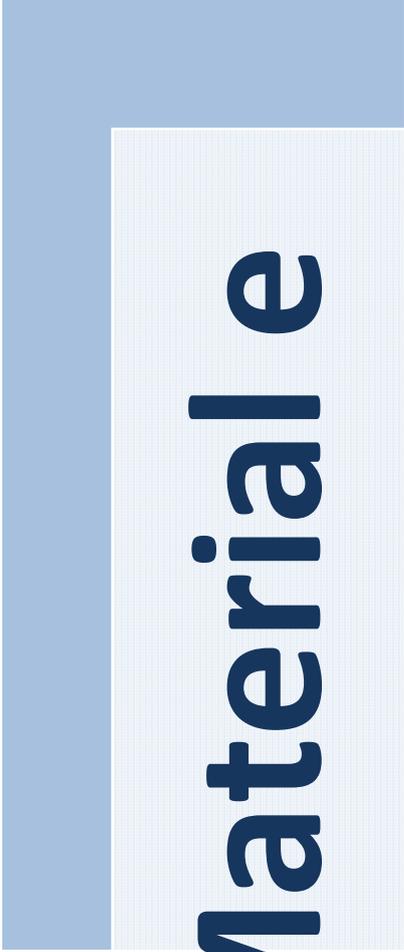
A determinação da prevalência dos sorotipos em nossa população poderá contribuir para direcionar o desenvolvimento de vacinas mais eficientes.



Objetivo

Objetivos

- Coletar amostras de *Streptococcus agalactiae* isolados em material clínico de recém-nascidos infectados, gestantes colonizadas e de pacientes infectados do CAISM, Hospital de Clínicas/Unicamp e de laboratórios que prestam serviço á hospitais-maternidades de Campinas e região;
- Conhecer a importância da infecção materno-infantil, colonização materna e infecção em pacientes adultos;
- Conhecer os sorotipos de *Streptococcus agalactiae* prevalentes nesta população para fins epidemiológicos;
- Padronizar a técnica de PCR para pesquisa de sorotipos de *Streptococcus agalactiae*.



Material e

Página 51

Metodologia

Material e Metodologia

1. Delineamento do estudo

Estudo laboratorial, transversal e descritivo que foi realizado na Divisão de Patologia Clínica / Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital de Clínicas, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP e Laboratório de Genética Humana da FCM UNICAMP.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Médica em pesquisa da Faculdade de Medicina da UNICAMP sob o parecer nº 640/2008, bem como o adendo de extensão de coleta de amostra de outros laboratórios que prestam serviço a hospitais-maternidade de Campinas e região.

2. População de estudo

Durante o período de 01/01/2007 – 31/12/2010, foram triadas para esse estudo cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas em amostras clínicas, de pacientes infectados e colonizados, atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP e do CAISM (Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher - Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti). No período de 01/09/2008 a 01/09/2009 processamos as cepas isoladas de pacientes colonizados e infectados por EGB dos seguintes Laboratórios e Hospitais da cidade de Campinas e região que prestam serviços á hospitais maternidade:

- Laboratório de Análises Clínicas JA Voza Ltda.
(Hospital Santa Casa de Campinas)
- Laboratório Análises Clínicas Bromatológicas Vital Brazil S/C Ltda.
(Hospital Maternidade de Campinas de 09/2008 a 12/2008)
- Stelini Medicina Laboratorial
(Hospital Maternidade de Campinas 01/2009 a 09/2009)
- Laboratório de Análises Clínicas Ramos de Souza S/C Ltda.
(Hospital Centro Médico de Campinas)
- Hospital e Maternidade Celso Pierro PUC-Campinas
- Hospital e Maternidade Madre Theodora
- Hospital Estadual de Sumaré

3. Material de Estudo

Foram analisadas cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de amostras clínicas retovaginais, urina, líquido cefalorraquidiano (LCR ou líquido), hemocultura e secreções de sítios anatômicos diversos, no período de 01/01/2007 a 31/12/2010 no Hospital de Clínicas de Unicamp e nos principais Laboratórios da cidade de Campinas e região que prestam serviço á hospitais maternidade.

4. Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo; as amostras clínicas não identificadas corretamente inviabilizando sua origem, amostras repetidas do mesmo paciente e cepas que não foram confirmadas como *Streptococcus agalactiae*.

5. Processamento do material de gestantes do CAISM/UNICAMP e de pacientes internados no Hospital de Clínicas UNICAMP

No ambulatório foi feita a coleta de swab retovaginal das gestantes entre 35 à 37 semanas, de acordo com o protocolo do CDC de 2002, para cultura de *S. agalactiae*. Esse material foi transportado dentro de um tubo com rosca contendo caldo Todd-Hewitt®, com Gentamicina e Ácido nalidíxico. No laboratório foi colocado na estufa à 35°C por 24 horas.

Para as pacientes com complicações do trabalho de parto, como parto prematuro, ou apresentavam febre, infecção urinária, abortos espontâneos ou qualquer outro quadro clínico, a equipe médica do CAISM solicitou a coleta de outras amostras como hemocultura, urina, swab de secreções, etc. Estes materiais foram encaminhados ao laboratório de Microbiologia do HC UNICAMP, assim como os materiais de pacientes internados no HC UNICAMP. Estes exames obedeciam à rotina padronizada do Laboratório de Microbiologia do HC UNICAMP e para as amostras bacterianas suspeitas de *S. agalactiae* em Agar sangue eram seguidas as etapas descritas abaixo para identificação.

6. Processamento do material de outros laboratórios

No início deste trabalho, orientamos os profissionais dos diferentes laboratórios que participaram do estudo, fornecendo um repique da cepa padrão de *S. agalactiae*. Nestes laboratórios diferentes amostras foram processadas: hemocultura, líquido (Líquido cefalorraquidiano), urocultura, secreções gerais ou swab retovaginal. Esse material foi semeado, nos próprios laboratórios, em meio de cultura agar sangue de carneiro e incubado á 35°C por 24 horas ou semeado diretamente em meio seletivo CHROMagar®, próprio para identificação de *Streptococcus agalactiae*. As colônias encaminhadas foram confirmadas posteriormente no Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP através dos testes: hemólise em Agar sangue, catalase, CAMP e teste de hidrólise do hipurato (13,17) e, quando confirmadas, estocadas a -80°C, em tubos, contendo caldo BHI com 15% de glicerol.

7. Semeadura, isolamento e identificação

Para as amostras enviadas em Todd Hewit, após 24 horas de estufa à 35°C o caldo estando límpido retornava a estufa sendo reavaliado no outro dia, repetindo-se o processo por até dois dias. Em caso de turbidez, era feito o estriamento para isolamento em placa de agar sangue de carneiro e incubado a 37°C com 5% de CO₂ permanecendo por mais 24 horas na estufa. A seguir era observado o crescimento bacteriano e selecionadas colônias isoladas com morfologia de *S. agalactiae* e beta hemólise.

Para estas amostras e aquelas amostras suspeitas isoladas em outros materiais clínicos, eram realizadas inicialmente as provas da Catalase e a coloração de Gram para confirmação. A identificação era, a seguir, feita através do teste CAMP, teste de hidrólise do hipurato (13, 17,77) ou em caso de resultados duvidosos pelo equipamento de automação Vitek®2 Compact (*bioMérieux Vitek Inc., St. Louis, MO*). As amostras confirmadas foram estocadas a -80°C, em tubos, contendo caldo BHI com 15% de glicerol. Todos os testes utilizados foram previamente testados com cepas padrão para controle positivo e negativo das reações. Também utilizamos como controle uma cepa padrão de *Streptococcus agalactiae* adquirida da coleção do I. A. Lutz.

7.1 Identificação pelo sistema automatizado Vitek®2 Compact (bioMérieux Vitek Inc., St. Louis, MO)

A identificação de microrganismos pelo sistema Vitek®2 (*BioMérieux*) foi efetuada com base nas características bioquímicas dos microrganismos, que permitem a diferenciação entre as espécies, previamente armazenadas no banco de dados do software do equipamento. Quando não é reconhecido um padrão único de identificação, o sistema fornece uma lista de possíveis microrganismos e sugestões quanto a testes suplementares necessários para completar a identificação. Quando foi conhecido um padrão único de identificação, o equipamento emite um laudo com os resultados dos testes realizados e o nome do microrganismo. (80)

Técnica

- Preparação dos inóculos:

Inicialmente foi transferido, assepticamente, 3,0 ml de solução salina estéril (NaCl – 0,45% a 0,50%, pH 4,5 a 7,0) para um tubo de ensaio de plástico (poliestireno), transparente. Com o auxílio de um swab estéril, foi transferido também cerca de 2 a 3 colônias bacterianas, com menos de 24 horas de crescimento, para o tubo que continha a solução salina preparada na etapa anterior, mediu-se então a densidade da suspensão bacteriana, até atingirmos 0,50 a 0,63 no padrão de McFarland. Em seguida, os tubos que continham as suspensões foram colocados em um suporte denominado de cassete (Figura 4). Em cada um dos tubos através de um condutor que ficava imerso na suspensão bacteriana foi realizado a transferência das suspensões para dentro dos cartões onde em seu interior existiam poços, que continham as provas bioquímicas para identificação dos microrganismos (Figura 1). Um pré-registro das informações referentes às amostras foi realizado em uma planilha de trabalho, que serviu como base para a inserção de dados no software do equipamento. (80)

Após a preparação do inoculo, o cassete contendo as amostras foi colocado na estação de enchimento do equipamento ou câmara de vácuo. Esta câmara retirou completamente o ar de dentro dos cartões, e a suspensão bacteriana fluiu para dentro dos mesmos, passando pelo interior dos canais e foi armazenada nos poços dos cartões que continham as provas bioquímicas (80).

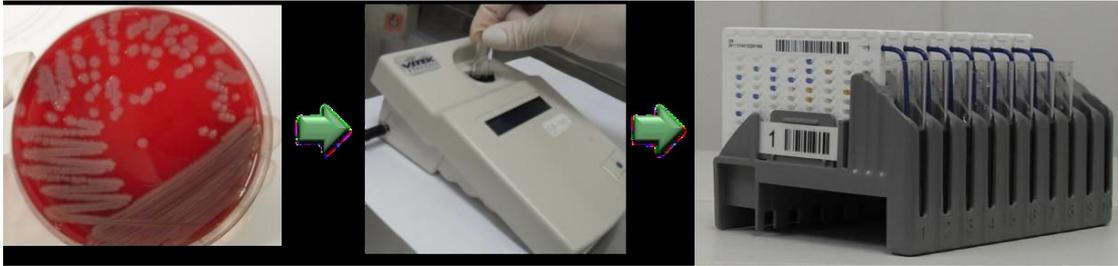


Figura 1: Preparação do inóculo para identificação no sistema automatizado Vitek®2 (BioMeriéux) (80).

Após a inoculação, o cassete contendo as amostras foi colocado na câmara de selagem dos cartões e na mesma câmara foi realizada a leitura ótica do código de barras de cada um dos cartões de identificação, cujas informações foram enviadas para o software do aparelho. Em seguida, o mecanismo de incubação do aparelho retirou cada cartão do cassete e o deslocou para um carrossel, onde os cartões ficam incubados por até 24 horas em temperatura controlada à 35°C (80) (Figura 2).



Figura 2 - Selagem e incubação dos cartões de identificação do sistema automatizado Vitek®2 (BioMeriéux) (80)

- Leitura e análise dos cartões

A cada 15 minutos, o leitor do equipamento retirou um cartão e devolveu à posição original. Durante este processo, um feixe luminoso passou pelos poços dos cartões, verificando a turbidez, e alterações de coloração que caracterizaram as reações bioquímicas positivas ou negativas, de acordo com as alterações dos indicadores de pH, essas informações foram registradas no sistema e após 24 horas, o equipamento emitiu um laudo para cada cartão, onde foram registrado os resultados das provas de identificação executadas, o nome do microrganismo identificado e o nível de qualidade da identificação. (80)

8. Extração de DNA

O protocolo de extração baseou-se no trabalho de Ausubel, et al 2003 (81) utilizando colônias crescidas diretamente no agar sangue, diluídas num tubo contendo 400 µl de solução TE pH 8,0 e 50 µl de lisozima 10 mg/ml e incubado por 3 horas á 65°C em banho maria.

Após o tempo de incubação foi adicionado 70 µl de SDS 10% e 5 µl de proteinase K 10mg/ml, foi feita agitação por vortex 10 segundos e incubado novamente a 65°C por 10 minutos em banho maria. Em seguida foram acrescentados 100 µl de NaCl 5M e 100 µl de CTAB/NaCl (pré aquecido a 65°C em banho maria), feita agitação por vortex 10 segundos e incubado á 65°C por mais 10 minutos em banho maria. Foram adicionados 750 µl de Clorofórmio/Álcool Isoamílico (24:1) à mistura, que foi novamente homogenizada por vortex, 10 segundos e centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm.

Em seguida o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o precipitado foi descartado. Ao sobrenadante foram acrescentados 600 µl de Isopropanol gelado, homogenizado manualmente e incubado a -20°C por 30 minutos Após o período de incubação foi centrifugado por 05 minutos a 12000 rpm, sendo em seguida descartado o sobrenadante. Ao precipitado de DNA foram adicionados 1000 µl de álcool 100%, incubados por 24 horas a -20°C.

No outro dia o material foi centrifugado por 05 minutos a 12000 RPM, descartando-se o sobrenadante e, ao precipitado, foram adicionados 1000 µl de álcool 70%. A seguir foi incubado por 1 hora a -20°C e, após, o DNA foi centrifugado por 05 minutos a 12000 rpm, descartando-se o sobrenadante. O DNA foi deixado na bancada para que o álcool 70% evaporasse por completo e então foram adicionados 100 µl de água Milliq® estéril e o material estocado -20°C (81).

9. Quantificação e diluição de DNA:

O DNA genômico foi quantificado por espectrofotometria, pelo NanoVue®, General Electric Company. Todas as amostras foram diluídas à 50ng, utilizando água Milliq® e as amostras estocadas à -20°C.

10. PCR multiplex e Reação de PCR

Foram designados um par de primers (iniciadores) para cada sorotipo de EGB (Ia, Ib, II-VIII) utilizando a sequência do Genbank para gene *cps* (gene da cápsula) e um par para confirmar o microrganismo como realmente sendo *Streptococcus agalactiae* (82,83) (Tabela 1).

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados nas reações de PCR

Primer	Sorotipo alvo	Tm (°C)†	GenBank	Sequência
CFBSb	<i>S.agalactiae</i>	59.53	X72754	326 ATGATGTATCTATCTGGAACCTAGTG 352
CFBAb	<i>S.agalactiae</i>	60.48	X72754	585 CGCAATGAAGTCTTAATTTTTC 563
IacpsHSb	Ia	58.42	AB028896	8176 ATACAGTTGTCGTAAAGAAGAAAAC 8200
IacpsHAb	Ia	58.46	AB028896	8536 TGTTTAGCTTTCCTACCAATATTAG 8512
IbcpsHSb	Ib	60.82	AB050723	2986TTTAGAAGTCCAGAATTCATAGAGTC3012
IbcpsHAb	Ib	64.91	AB050723	3265 CAAAGAAAGCCATTGCTCTCTG 3244
IicpsKSb	II	59.68	AY375362	7269 CTCCAGATGGTCTTTGTGAC 7288
IicpsKAb	II	58.08	AY375362	7700 AAAATTGGTATATTTCCTCTTGAC 7677
IIIcpsHSb	III	59.15	AF1 63833	7509 CCACATATGAGAATAAGACTTGC 7531
IIIcpsHAb	III	58.86	AF163833	7874 CCTAGTGATAGTACTTTGGTTCTG 7850
IvcpsHSb	IV	59.56	AF355776	7634 ATAGCCTTTTGACAGGTAGGTT 7655
IvcpsHAb	IV	58.67	AF355776	7958 TGTAATCATCTACACCCCC 7939
VcpsHSb	V	59.04	AF349539	7616 GATGTTCTTTAACAGGTAGATTACAC 7642
VcpsHAb	V	58.56	AF349539	7945 CTTTTTATAGGTTTCGATACCATC 7922
VicpsHSb	VI	58.83	AF337958	7648 TGTTTTTCTTACAAAGTGGAGTC 7670
VicpsHAb	VI	60.66	AF337958	7926 CCTGTTTTGTTGATAGCTTCTC 7904
VIIcpsMSb	VII	59.92	AY376403	5359 GTGCAATTAGAGGACAAAAATTA 5382
VIIcpsMAb	VII	58.56	AY376403	5651 CATCGAATCAGGAAAAATAGAT 5630
VIIIcpsJSb	VIII	59.56	AY375363	5687 ATCTCATGGCATGCTGG 5704
VIIIcpsJAb	VIII	60.23	AY375363	5998 CATTGAATAAACAATCTTATTGC 5975

Foram feitas três reações no termociclador, sendo a primeira apenas com os primers que definiam a espécie CFBSb e CFBAb. As amostras que amplificaram nessa etapa foram amplificadas com os outros nove pares de primers (IacpsHSb e IacpsHAb, IbcpsHSb e IbcpsHAb, IicpsKSb e IicpsKAb, IIIcpsHSb e IIIcpsHAb, IvcpsHSb e IvcpsHAb, VcpsHSb e VcpsHAb, VIcpsHSb e VIcpsHAb, VIIcpsMSb e VIIcpsMAb e VIIIcpsJSb e VIIIcpsJAb) misturados na quantidade de 0,25µl por amostra em um mix de Primers forward e Primers reverse. Por fim, realizou-se uma última reação para confirmar o sorotipo apenas com o par de primers que amplificou na reação anterior, descartando-se reações cruzadas (Figura3).

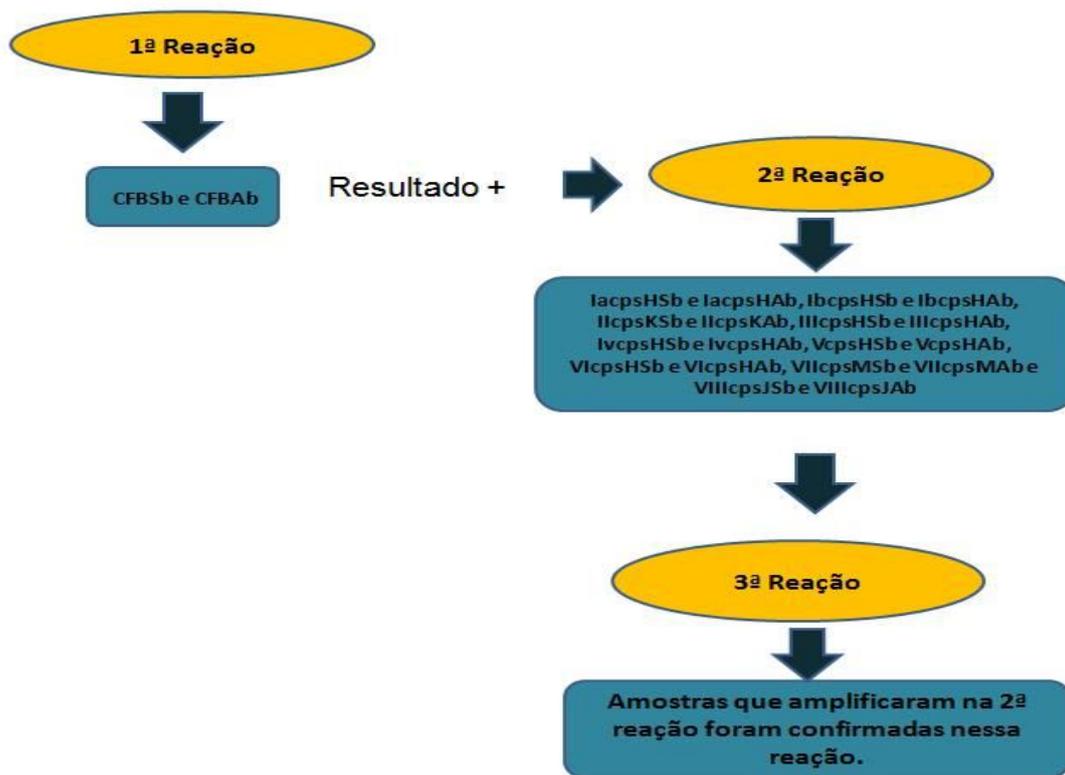


Figura 3 – Esquema das três reações de PCR realizadas

Nas reações utilizou-se: 3µl do DNA de interesse, 2,5µl de dNTPs, 2,5 µl de tampão Taq (Taq Buffer with KCl - Fermentas Life Science, USA), 2,5 µl tampão MgCl² (Fermentas Life Science, USA) 0,1 µl de *Taq* polimerase (Fermentas Life Science, USA), 0,25µl de primer forward e 0,25µl de primer reverse e completando com água MilliQ® ou deionizada até 25 µl.

O ciclo do termociclador foi programado em: 15 min. a 94°C, 60°C por 30 seg., 72°C por 1 min., 72°C por 10 min., e final de 22°C (82).

11. Eletroforese

Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (1,5g de agarose + 100 ml de TBE 1x). Foi utilizado 2,0 µl de marcador de peso molecular *100Kb e 50Kb* (Fermentas Life Science, USA). As imagens foram capturadas pelo analisador Amersham Biosciences/GE Healthcare Typhoon 9400®, e armazenados em pendrive e posteriormente, analisadas.

12. Análise estatística

Foram selecionadas para esse estudo, de forma aleatória, amostras provenientes de infecção e colonização coletados no Hospital das Clínicas UNICAMP e demais laboratórios que prestam serviços á hospitais da região citados anteriormente. Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e o programa utilizado para as análises estatísticas foi o PASW Statistics 18.0.



Resultados

Resultados

Foram processados no Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas da Unicamp 925 exames de secreção retovaginal no ano de 2007 e 1097 exames no ano de 2008, obtendo-se um total de 414 casos positivos de pacientes colonizadas por EGB, resultando numa positividade de 20,55% em relação ao total de 2.022 exames para este período. A análise estatística foi feita pelo Teste T para Amostras Pareadas com $P= 0,02$ para a homogeneidade das amostras positivas (Tabela 2 e Gráfico 1).

Tabela 2 – Distribuição mensal e percentual de positividade das amostras colhidas de secreção retovaginal de pacientes atendidas no CAISM/UNICAMP no período de 2007 e 2008

2007			2008		
Meses	Nº de amostras	% Positividade	Meses	Nº de amostras	% Positividade
Janeiro	78	21,80%	Janeiro	85	9,41%
Fevereiro	64	23,43%	Fevereiro	105	18,09%
Março	43	13,95%	Março	68	25,00%
Abril	76	9,21%	Abril	122	22,13%
Maiο	112	35,71%	Maiο	91	16,48%
Junho	76	18,42%	Junho	102	14,70%
Julho	86	13,95%	Julho	111	21,62%
Agosto	81	28,39%	Agosto	83	24,09%
Setembro	72	16,66%	Setembro	79	22,78%
Outubro	85	17,64%	Outubro	102	16,66%
Novembro	84	26,19%	Novembro	75	24,00%
Dezembro	68	23,52%	Dezembro	74	22,97%
Total /Ano	925	21,51%	Total /Ano	1097	19,59%

O número de amostras obtidas em 2007 é discretamente menor que a quantidade de amostras obtidas em 2008, em decorrência ao fato que, em 2007, a rotina de triagem das gestantes do CAISM estava sendo implementada e, portanto não estava totalmente estabelecida na rotina ambulatorial e laboratorial ocasionando a perda de alguns resultados (Gráfico 1).

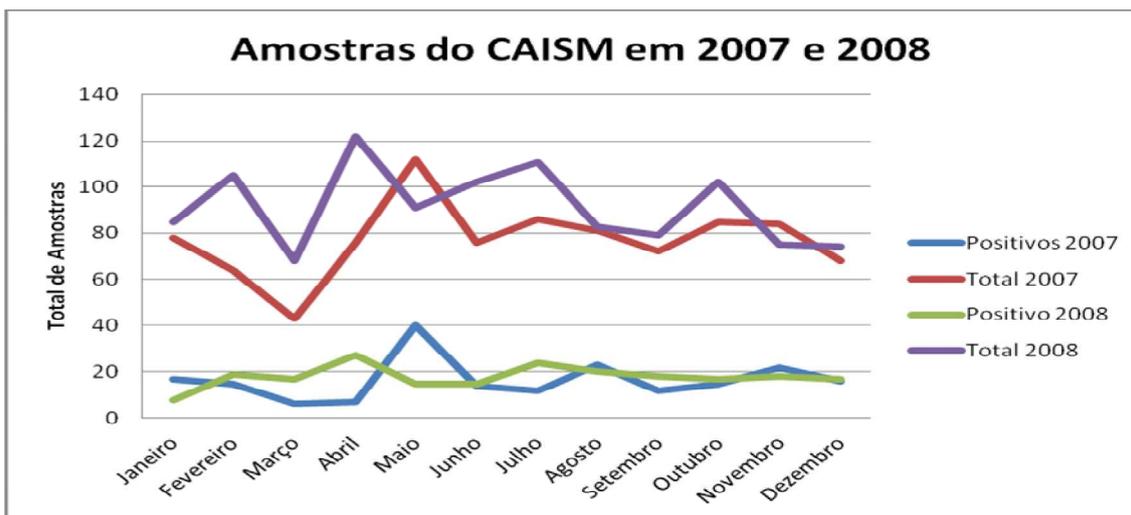


Gráfico 1 – Diferença do número de amostras obtidas de gestantes do CAISM nos anos de 2007 e 2008 em relação á positividade para o mesmo período.

Durante o período de 2007 a 2010 foram selecionadas 120 amostras de EGB isoladas de diversos materiais no Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Unicamp, sendo eles: oitenta e sete amostras de urina (72,50%), dezenove amostras de sangue (hemocultura) (15,83%), cinco amostras de secreção de feridas e abscessos (4,16%), três amostras de líquor (2,50%), duas amostras de secreção ferida cirúrgica (1,66%), uma amostra de secreção ocular (0,83%), uma amostra de secreção umbilical (0,83%), uma amostra de secreção orofaríngea (0,83%) e uma amostra de secreção uretral (0,83%) (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição das amostras clínicas obtidas durante o período de 2007 até 2010 no Hospital de Clinicas Unicamp com relação ao tipo de material, excluídos swabs retovaginais

Material	2007	2008	2009	2010	Total
Urina	72	15	-	-	87
Sangue	4	4	4	7	19
*LCR	1	-	1	1	3
Secreção de feridas e abscessos	2	2	-	1	5
Secreção ferida cirúrgica	1	1	-	-	2
Secreção Ocular (RN)	-	-	-	1	1
Secreção Uretral	1	-	-	-	1
Secreção Umbilical (Adulto)	1	-	-	-	1
Secreção Orofaríngea	1	-	-	-	1
Total Geral	83	22	5	10	120

* LCR=líquido cefalorraquidiano

Das dezenove amostras isoladas em hemoculturas, quinze eram provenientes de infecção de adultos do Hospital de Clínicas da UNICAMP e quatro de RNs do CAISM. Entre as três amostras de líquido analisadas, duas eram de adultos do Hospital de Clínicas da UNICAMP e uma de RN do CAISM (Tabela 2).

Neste período de 2007 a 2010 obtivemos, apenas seis amostras de *Streptococcus agalactiae*, de RNs do CAISM, tendo sido quatro isoladas de hemocultura, uma de líquido e uma de secreção ocular. Entre os seis recém-nascidos ocorreu apenas um óbito sendo em um caso de sepse neonatal. Foi calculada uma relação média para doença de início precoce por EGB em casos ocorridos no CAISM/UNICAMP, de 0,553 casos por 1000 nascidos vivos, considerando uma média de 2.713 partos/ano (Tabela 4).

Tabela 4 – Estimativa da incidência da doença de início precoce causada por EGB em RN por mil nascidos vivos no CAISM/UNICAMP, durante o período de 2007 a 2010.

Anos	Total de Partos	Número de casos	Incidência por mil nascidos vivos
2007	2.685	1	0,372
2008	2.687	2	0,744
2009	2.754	1	0,363
2010	2.724	2	0,734
Média →	2.713	1,5	0,553

Durante o período de setembro de 2008 à setembro de 2009, foram encaminhadas, dos sete laboratórios que prestavam serviços aos hospitais maternidades de Campinas e região, um total de 383 amostras de *Streptococcus agalactiae*. Um dos laboratórios envolvidos na pesquisa não forneceu nenhuma amostra de EGB e outro se destacou por apresentar uma quantidade de amostras muito maior que os demais (Tabela 5). Entre essas amostras obtivemos duzentas e oito de urina (54,30%), cento e quarenta e cinco de secreção retovaginal (37,85%), treze de esperma (3,39%), nove de sangue (2,34%), sete de secreções gerais (1,82%) e uma de líquido (0,26%) (Tabela 6). Encontramos apenas uma amostra de sangue de RN proveniente do Hospital Estadual de Sumaré, que foi o único dos laboratórios, fora da Unicamp a isolar amostra em RN, e neste caso também foi possível isolar uma amostra pareada da mãe . Nos laboratórios

envolvidos com hospitais-maternidades da cidade de Campinas e região não foi possível realizar o cálculo da estimativa de incidência da doença de início precoce causada por EGB em RNs, por mil nascidos vivos, porque consideramos a casuística subestimada por conta de não termos controle sobre casos não diagnosticados ou cepas não enviadas.

Tabela 5 – Contribuição dos laboratórios de Campinas e Região que forneceram amostras de *Streptococcus agalactiae* durante o período de setembro de 2008 a setembro de 2009.

Laboratórios/Hospitais	2008	2009	Total
Hospital Estadual de Sumaré	4	11	15
Laboratório Voza (Hospital Casa de Saúde de Campinas)	103	202	305
Vital Brasil (Maternidade de Campinas 09/2008 a 12/2008)	2	0	2
Stelini (Maternidade de Campinas 01/2009 a 09/2009)	0	24	24
Ramos de Souza (Hospital Centro Médico de Campinas)	8	2	10
Hospital Maternidade Celso Pierro (PUC-Campinas)	11	16	27
Hospital Maternidade Madre Teodora	0	0	0
Total Geral	128	255	383

Tabela 6 – Distribuição de 383 amostras de *Streptococcus agalactiae* dos laboratórios de Campinas e região por tipo de material durante o período de setembro de 2008 a setembro de 2009

Laboratórios	Urina	Retovaginal	Esperma	Sangue	Secreções em Geral	LCR*	Total de amostras
Hospital Estadual Sumaré	2	9	0	2	1	1	15
** Voza - SCS	180	103	13	3	6	0	305
*** Stelini - MC	10	10	0	4	0	0	24
+ Vital Brasil - MC	0	2	0	0	0	0	2
**Ramos de Souza - CMC	2	8	0	0	0	0	10
+++Celso Pierro – PUCC	14	13	0	0	0	0	27
Hospital Madre Teodora	0	0	0	0	0	0	0
Total Geral	208	145	13	9	7	1	383

* LCR=líquido cefalorraquidiano, **Laboratório Voza – SCS (Hospital Casa de Saúde de Campinas) *** Stelini Medicina Laboratorial - MC (Maternidade de Campinas), +Laboratório Vital Brasil -MC (Maternidade de Campinas), **Laboratório Ramos de Souza - CMC (Hospital Centro Médico de Campinas), +++Hospital e Maternidade Celso Pierro – PUCC (PUC Campinas).

Análise Molecular

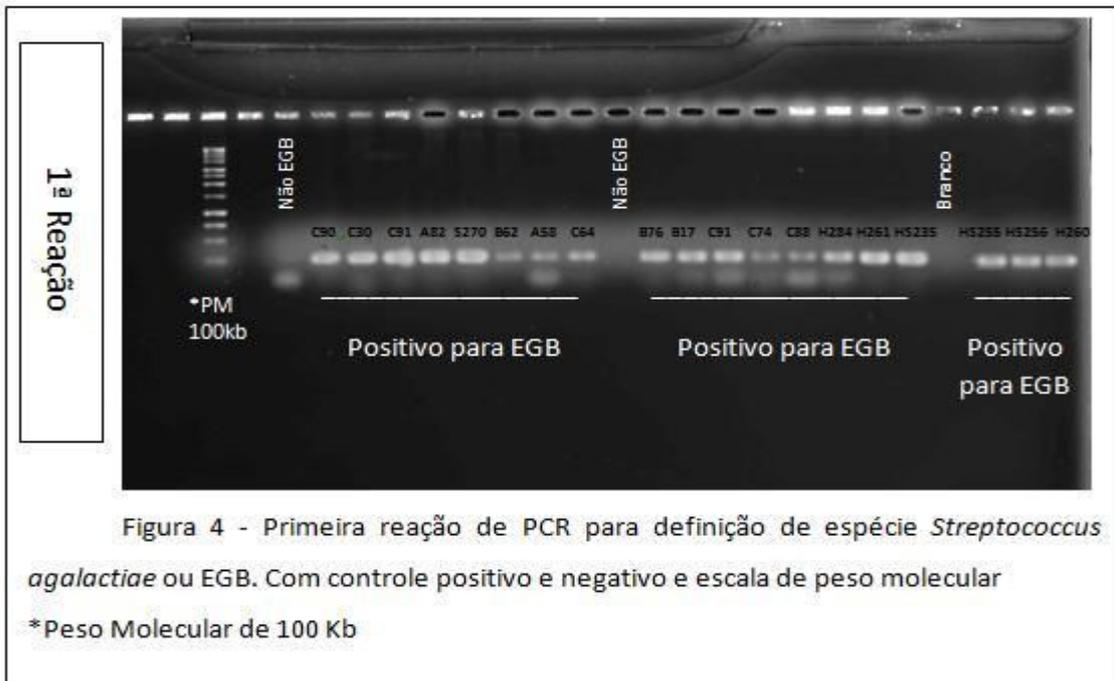
Do total de amostras estocadas para esse estudo, algumas foram perdidas ao serem reativadas, após o congelamento á -80°C e por esses motivos, não foram analisadas. Entre elas, seis amostras de hemocultura de pacientes adultos, sendo uma do Hospital de Clínicas da UNICAMP, outra do Laboratório Stelini, três do Laboratório Voza e outra do Hospital Estadual Sumaré. Entre as viáveis, foram analisadas setenta amostras de diversos sítios infecciosos, sendo vinte e duas de hemocultura, quatro de líquido e as demais escolhidas aleatoriamente, compreendendo os outros materiais (tabela 7). Nenhuma das cepas selecionadas e submetidas a análise molecular deixou de ser tipada.

Tabela 7 – Distribuição dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae* obtidos por PCR de 70 amostras provenientes do Hospital de Clínicas UNICAMP e de laboratórios de Campinas e região no período de 2007 a 2010.

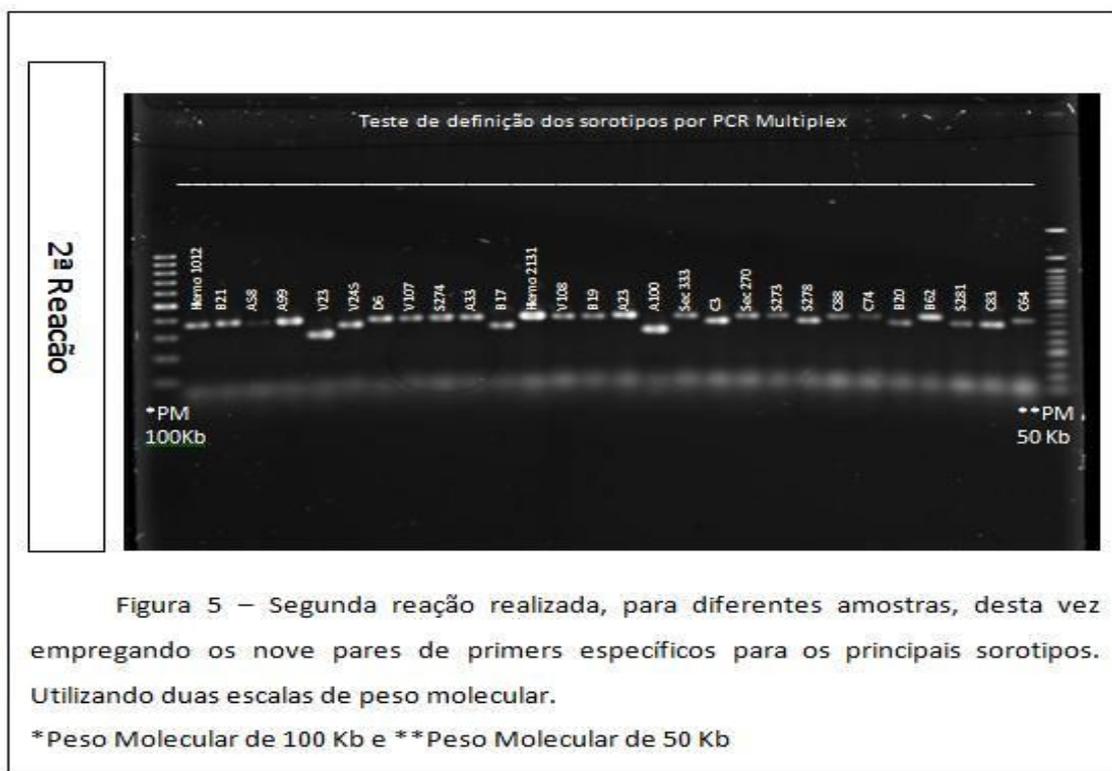
Material	Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Total
Esperma	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
Secreção umbilical	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Secreção orofaríngea	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Secreção ocular	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Urina	1	2	-	2	-	13	-	-	-	-	18
Secreção retovaginal	6	-	-	-	1	10	-	-	-	-	17
Secreção ferida cirúrgica	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	3
Sangue	5	-	-	4	-	13	-	-	-	-	22
LCR*	0	-	-	1	-	3	-	-	-	-	4
Total Geral	17	2	0	7	1	43	0	0	0	0	70

* LCR=líquido cefalorraquidiano

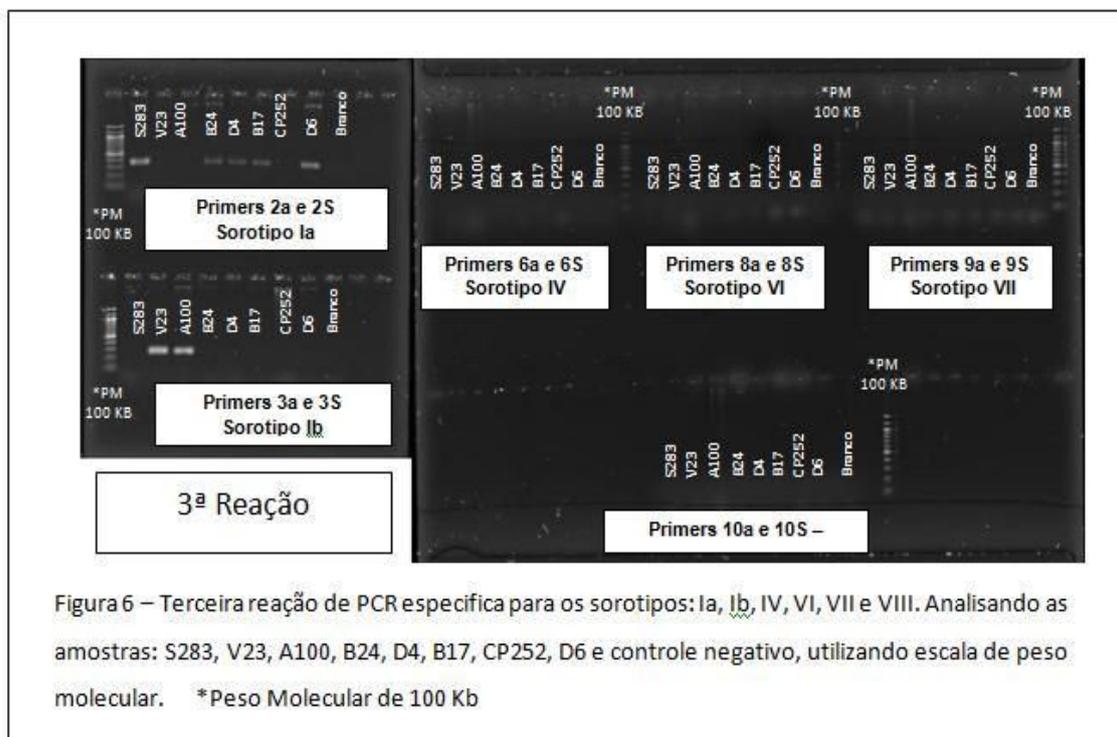
Foram feitas três reações de PCR para definir os sorotipos do *Streptococcus agalactiae*. Na primeira reação utilizou-se primers específicos para a espécie *Streptococcus agalactiae*. As amostras que não amplificaram nessa reação foram, reavaliadas por meio de provas manuais de identificação. As que obtiveram resultados positivos foram submetidas novamente pelos primers que definiam a espécie, já as amostras que continuavam com resultado negativo foram descartadas do estudo (Figura 4).



As amostras que amplificaram na primeira reação para espécie, foram submetidas á uma segunda reação de PCR, desta vez para identificar os sorotipos. Nessa segunda reação foram utilizados os nove pares de primers específicos para os sorotipos mais conhecidos de EGB (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII). Essa reação foi considerada pouco discriminatória, resultando apenas numa provável definição dos sorotipos (Figura 5).



A terceira e última reação de PCR foi realizada para evitar resultados imprecisos, devido à proximidade existente entre os fragmentos de DNA amplificados. Com a realização desta terceira reação foi possível confirmar o resultado obtido utilizando apenas o par de primers específico para o sorotipo mais provável, detectado pela altura da banda encontrada na reação anterior (Figura 6).



A análise molecular das amostras revelou que a maioria dos sorotipos encontrados eram do tipo V (61,42%), seguido pelo tipo Ia (24,28%), pelo tipo III (10,0%), tipo Ib (2,85%) e tipo IV (1,42%) e os demais tipos não foram encontrados (Tabela 6). Dentre as setenta amostras analisadas, vinte e duas amostras eram de cultura de sangue (hemocultura) e quatro de cultura de líquido, e nelas o sorotipo mais encontrado foi o tipo V com 57,69%, seguido pelo III com 23,07% e por Ia 19,23%. (Tabela 8). Não temos dados clínicos dos pacientes da Maternidade de Campinas, exceto que eram de parturientes.

Tabela 8 – Sorotipos de *Streptococcus agalactiae* obtidos por PCR, isolados em 22 amostras de hemocultura e 4 de líquido na região Campinas no período 2007 a 2010

Laboratórios*	Sangue	Sorotipo	LCR	Sorotipo
Hospital Sumaré	1	V	1	V
Maternidade de Campinas	3	1:Ia, 2:V	-	-
CAISM Unicamp	5	1:Ia, 2:III, 2:V	1	III
Hospital das Clínicas Unicamp	13	3:Ia, 2:III, 8:V	2	V
Total Geral	22	-	4	-

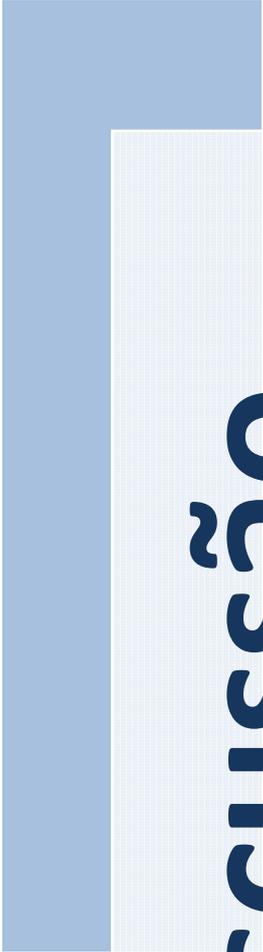
*Não constam outros hospitais por não terem isolado cepas em amostras de sangue e líquido.

Os seis RNs com processos infecciosos causados por *S. agalactiae*, vindos do CAISM, apresentaram em quatro deles, quadro de sepse neonatal precoce, um de meningite neonatal precoce e um de conjuntivite purulenta. Na amostra de RN vinda do Hospital Estadual de Sumaré foi diagnosticado quadro de sepse neonatal precoce. Os casos de amostras pareadas de mãe e RN revelaram o mesmo sorotipo na mãe e no recém-nascido, sendo uma amostra do CAISM e outra do Hospital Estadual de Sumaré (Tabela 9)

Tabela 9 – Sorotipos por PCR de *Streptococcus agalactiae* isolados em 6 RNs e 1 mãe no CAISM e 1 RN e sua mãe no Hospital Estadual de Sumaré, no período de 2007 a 2010

Código RN	Amostra	Sorotipo	Quadro clínico	Ano	Amostra Mãe	Sorotipo Mãe
58	liquor	III	Meningite	2007	Não	Não
91	Sangue	III	Sepse	2008	Sangue	III
64	Sangue	Ia	Sepse	2008	Não	Não
284*	Sangue	V	Sepse	2009	Não	Não
HS255**	Sangue	V	Sepse	2009	Vaginal	V
2130	Sangue	V	Sepse	2010	Não	Não
270	ocular	Ia	Conjuntivite	2010	Não	Não

*evoluiu para óbito, ** Amostra do Hospital Estadual de Sumaré



Discussão

Discussão

No período compreendido entre Janeiro de 2007 a dezembro de 2010, foram coletadas cepas de *S. agalactiae* isoladas de gestantes e recém-nascidos atendidos no CAISM/ UNICAMP e de outros pacientes adultos do Hospital de Clínicas da Unicamp em culturas de urina, sangue e secreções diversas. Durante este período foram observados muitos casos de colonização vaginal, significativo isolamento em urina, secreções e hemoculturas de adultos, mas apenas seis casos de infecção em recém nascidos, que era o nosso foco principal no início deste estudo. Com a intenção de enriquecer esta casuística, solicitamos, no período de um ano, entre setembro de 2008 à setembro de 2009, o envio de cepas bacterianas isoladas por laboratórios da cidade de Campinas e região que atendem hospitais maternidades, obtendo apenas uma amostra de RN do Hospital Estadual de Sumaré.

A triagem com exame retovaginal para pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, entre a 35^a e 37^a semana de gestação (10,12), conforme preconizado pelo CDC e também estabelecido no Projeto Diretrizes da AMB, sobre “Rotura Prematura das Membranas” de 2008 (84), seguido de tratamento profilático das gestantes colonizadas e aplicado no CAISM mostrou-se pertinente e efetiva. Essa conduta baseia-se na estimativa de risco ser vinte e cinco vezes maior para uma grávida colonizada por EGB ter um parto de RN com doença de início precoce, que de uma gestante com cultura negativa no pré-natal (10) . Na falta de qualquer intervenção, entre 1% a 2% dos RN nascidos de mães colonizadas desenvolvem infecções precoces por EGB (10,12,15,16). É fundamental destacar que a elevada letalidade da doença existente na década de 70 diminuiu de 50% (10) para 4% a 6% nos últimos anos, principalmente devido aos avanços no cuidado neonatal (1,85). A mortalidade é de 2% a 3% entre os recém-nascidos a termo, sendo maior entre os recém-nascidos prematuros com taxas de letalidade de cerca de 20%, já entre aqueles com gestação de ≤ 33 semanas a letalidade pode chegar a 30% (1,85). Em nossa pequena casuística a letalidade foi de 16,6% (1/6 casos).

Nos EUA, a incidência da infecção por EGB diminuiu cerca de 80% desde o início de 1990 até 2002, alcançando um patamar de aproximadamente 0,5 casos por mil nascidos vivos (10). Depois de 2002, a incidência caiu mais e nos últimos anos tem variado entre 0,3-0,4 casos por mil nascidos vivos. Este declínio adicional de 20% a 40% é coerente com o previsto para a estratégia de prevenção que incluiu a triagem

universal em 2002 (12). Entre nós, encontramos uma incidência semelhante de 0,553 casos por mil nascidos vivos no CAISM, para o período de estudo de 2007 a 2010, após o início do monitoramento vaginal/retal de gestantes. Segundo dados disponíveis do CAISM referente ao período anterior, (de 1996 a 2007), a incidência estimada era de 0,82 casos por mil nascidos vivos (86), confirmando a efetividade do programa de monitoramento e profilaxia.

Outro fato primordial é que, na maioria dos casos a transmissão ocorre da mãe para o bebê no útero, com ascensão na proximidade do parto ou durante o mesmo, com transmissão vertical (12). Em nosso estudo foram encontrados dois casos em que tanto mãe como RN estavam infectados por *Streptococcus agalactiae* do mesmo sorotipo, comprovando a ocorrência da transmissão vertical.

Estudos apontam também que, cesarianas realizadas antes do início do trabalho de parto em uma mulher com membranas amnióticas intactas não previne a transmissão de mãe para filho, porque EGB pode atravessar as membranas intactas (87,88). No entanto, quando uma cesariana é realizada nestas condições, o risco de desenvolver sintomas da infecção, entre recém-nascidos a termo, é extremamente baixa, e o risco de transmissão é provavelmente muito menor do que no cenário de parto vaginal, cesariana após ruptura de membranas ou início do trabalho de parto (10,89,90). Porém, em Campinas SP., as taxas de mortalidade perinatal são mais elevadas em RN de parto vaginal que em RN de parto cesáreo (91). Esse fato pode justificar a diminuição de casos de infecção de RN por *Streptococcus agalactiae* considerando o grande número de cesarianas em Campinas, que dos 14.952 partos de nascidos vivos no ano de 2010, 63,23% foram cesarianas e 37,70% de partos normais (92). Esses dados podem ajudar a justificar o baixo índice de infecção em RN por nós encontrados vindos de laboratórios que atendem as maternidades da região de Campinas.

Os recursos laboratoriais tradicionais utilizados para isolamento e identificação de EGB, associados ao reconhecimento da sua importância clínica, ao uso do caldo seletivo Todd-Hewitt®, com ou sem o uso de meios cromogênicos, como indicado pelo CDC 2010, permitiram um melhor conhecimento de sua epidemiologia e patogenia (10). Entretanto, deficiências no treinamento ou intimidade com o agente podem ainda restringir o sucesso da sua caracterização. Outros fatores que podem dificultar o seu isolamento são pacientes tratados previamente com antimicrobianos, a não coleta de material para diagnóstico ou a menor sensibilidade da hemocultura para casos com baixa bacteremia.

Estes fatores podem ter contribuído de forma significativa para que os casos de infecções por EGB em RN fossem subestimados. Por outro lado, um dos laboratórios demonstrou grande intimidade na identificação do EGB, revelado pela grande número de uroculturas positivas, com identificação confirmada por nós.

Novos recursos moleculares para detecção do *Streptococcus agalactiae* diretamente em amostras de sangue estão sendo utilizados, alguns automatizados, que além de mais sensíveis rápidos e padronizados, poderão ser úteis para fins clínicos e epidemiológicos (82,93).

Outra razão para o uso da triagem materna é o argumento de reduzir o uso de antibióticos desnecessários em mulheres não colonizadas, tendo em vista o aparecimento, em diferentes países, de cepas de EGB resistentes a drogas antimicrobianas usadas na profilaxia e no tratamento da infecção (86). Com a triagem apenas as mulheres colonizadas passaram a utilizar os antibióticos.

O *Streptococcus agalactiae* tem sido encontrado também em casos infecções e queimaduras (2,6). Ele também foi descrito em 5% a 23% dos casos de infecção urinária em não gestantes, sobretudo em pessoas idosas (2,6). No material selecionado no Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP destaca-se o significativo número de amostras isoladas em urina nos anos de 2007 e 2008, não se tendo registrado o número de amostras nos anos seguintes, pois o interesse estava voltado apenas para as amostras de materiais nobres (sangue e LCR). O mesmo comentário pode ser feito para as secreções, tanto de mucosas, como de feridas em geral, que no conjunto, representaram cerca de 10% de todo material selecionado. Este achado também foi verificado para um dos Laboratórios que colaboraram com a pesquisa, revelando significativo número de isolamentos em amostras de urina e proporcional número em amostras de secreções.

Raros são os casos descritos de meningite em adultos; existem casos descritos de endocardite em pacientes com problemas valvulares (2). Entre nossas amostras de LCR isoladas pelo Hospital de Clínicas da UNICAMP, uma amostra era de RN do CAISM e as outras duas de adultos. Recebemos também uma amostra de LCR de um paciente adulto do Hospital Estadual de Sumaré.

O EGB tem sido associado com infecções de cateteres e outros procedimentos invasivos, e nesses casos é comum a co-infecção com *Staphylococcus aureus* (6,7). Não procedemos a análise detalhada dos prontuários dos pacientes do HC UNICAMP para a detecção de algum caso de infecção hospitalar.

Das dezenove amostras isoladas em hemoculturas no Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, seis eram provenientes de RNs do CAISM, e as treze amostras restantes, eram de adultos. Entre as nove amostras isoladas pelos outros laboratórios, uma amostra era de RN e outra de adulto no Hospital de Sumaré. As quatro amostras do Laboratório Stelini eram de pacientes grávidas da Maternidade de Campinas, mas sem outras informações clínicas. Os três casos de hemoculturas provenientes do laboratório Voza todas eram de idosos entre 71 a 80 anos e não foram tipadas pois as amostras não puderam ser recuperadas, embora previamente confirmadas por testes fenotípicos. Estes achados destacam a importância do *Streptococcus agalactiae* como agente de bacteremia em adultos e idosos.

Quanto aos sorotipos encontrados em nosso estudo, devemos inicialmente considerar o baixo número de casos de infecção neonatal detectados. Entre os sete casos analisados, houve o predomínio do sorotipo V, seguido pelo Ia e III respectivamente, que condizem com os achados da década passada em outros países, como EUA, Suécia, Canadá e Austrália (46,54,56,58). A partir da década de 90, o sorotipo V, que era pouco relatado, ganhou mais importância, sendo citado em publicações recentes como o mais isolado em países como a Coreia, Líbano, Malásia (59-61). Os outros sorotipos encontrados são os mais encontrados em amostras retovaginais (10,16,46,52-57), e assim como em outras amostras clínicas em adultos, excluídas as gestantes (2). Os sorotipos III, Ia e V, também estão relacionados à maior virulência e, portanto, associados a maioria das infecções neonatais, maternas e em outras populações (1,2,9,10,17,46).

Na ausência de uma vacina, a triagem universal e a profilaxia antibiótica continuam a ser os pilares da prevenção da doença de Início Precoce (10). Existem poucos estudos no mundo e raros no Brasil sobre a distribuição dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae* na população, e investigar o padrão de sorotipos capsulares em diferentes regiões ou populações é necessário para avaliar a diversidade capsular possibilitando diferentes combinações de antígenos atingindo um número maior de pessoas em diferentes localizações geográficas (9), seria fundamental para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra o EGB e esta vacina permitiria diminuir as infecções materno-infantis e eventualmente para populações de risco, como já detectado na literatura mundial e pelo nosso significativo número de hemoculturas positivas encontradas.



Conclusões

Conclusões

1 - Durante o período 2007 a 2010 foram observados apenas seis casos de infecção em recém nascidos na população de pacientes atendidos no CAISM, cujo número de amostras obtidas foi abaixo do inicialmente esperado. As possíveis justificativas isoladas ou em conjunto para esse fato seriam:

A) A eficiência do programa de triagem materna, possibilitando alcançar níveis de mortalidade infantil comparável a de países desenvolvidos para doença de início precoce por *Streptococcus agalactiae*.

B) A falta de um recurso mais sensível para detecção de casos com baixa bacteremia.

C) Pacientes tratados com antimicrobianos, que dificultariam o isolamento do *Streptococcus agalactiae*.

2 - Durante o período de setembro de 2008 a setembro de 2009 foram obtidas 383 cepas de *S. agalactiae* dos laboratórios de Campinas e região que prestam serviços a hospitais e maternidades isoladas em diferentes materiais clínicos, mas apenas de um recém nascido, embora cerca de 10.000 partos sejam realizados por ano por estes hospitais. As possíveis explicações para esses resultados seriam:

A) Problemas com o treinamento do pessoal que trabalha em laboratórios, que teriam dificuldades na identificação de *Streptococcus agalactiae*,

B) A falta de material adequado para a coleta e transporte

C) Não solicitação de exame pelo médico

D) Uso prévio de antimicrobianos

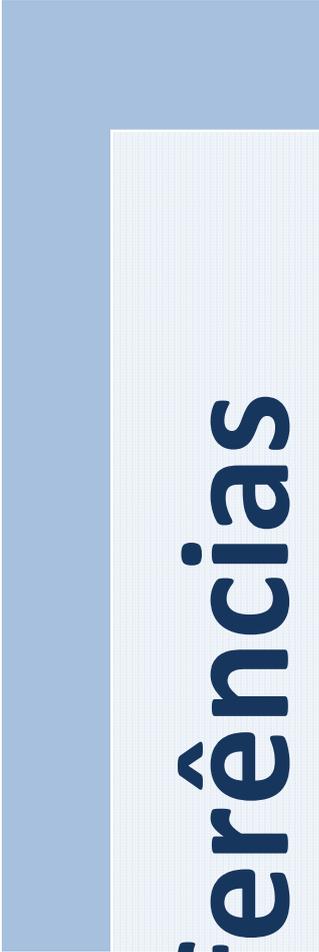
E) Alto índice de cesarianas que ocorreram no período do estudo em Campinas e região, muito maior que no CAISM.

3 - Foram obtidas cepas de *S. agalactiae* isoladas de pacientes adultos, excluídas as gestantes, tanto do Hospital de Clínicas da UNICAMP, como de hospitais de Campinas e Região em 15 amostras de sangue, três de líquido, 295 uroculturas e 175 de secreções diversas, revelando a importância do EGB em processos infecciosos locais e sistêmicos em pacientes adultos.

4 - Em nosso estudo a prevalência de tipos capsulares encontrados pela técnica de PCR é semelhante ao encontrado nos países industrializados onde sorotipo V é o mais

comum, seguido pelo Ia e III, tanto em recém-nascidos, como nas 61 amostras de adultos analisadas.

5 - A técnica de PCR revelou ser útil na caracterização dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae*, pois, todas as nossas amostras foram sorotipadas, mostrando ser uma técnica específica, barata e útil para estudos epidemiológicos. A complexidade desses testes ainda é muito alta para que os mesmos sejam implementados na rotina de um laboratório, devendo, no entanto, em breve ser superada com a introdução de novas técnicas automatizadas.



Referências

Página 83

Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1 - Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005. **JAMA** 2008; 299:2056–65.

2 - Farley MM, Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. **Clinical Infectious Diseases**, 2001; 33:556-61

3 – Philipson EH, Palermino DA, Robison A. Enhanced antenatal detection of Group B streptococcus colonization. **Obstet Gynecol**, 1995; (3);85: 437-439.

4 - Yancey MK., Duff P, Clark P, Kurtzer T, Frentzen BH, Kubillis P, Peripartum infection associated with vaginal Group B streptococcal colonization. **Obstet & Gynecol**, 1994; 84: 816-819.

5 – Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP, Eschenbach DA, Blackweider WC, Lou Y, Gibbs RS, Rettig PJ, Martinn DH, Edeiman R. Colonization with Group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. **Am J Obstet Gynecol**, 1996; 74:1354-1360.

6 - Schuchat A. Epidemiology of Group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigmas. **Clin Microbiol Rev**, 1998;11: 497-513.

7 - Farley MM, Harvey RC, Stull T. A population-based assessment of invasive disease due to Group B streptococcus in nonpregnant adults. **N Engl J Med**, 1993; 328:1807-1811.

8 - Raimer K., O'Sullivan MJ. Influence of diabetes on Group B streptococcus colonization in the pregnant patient. **The J Maternal Fetal Med**, 1995;6(2):120-123.

9 - Campbell JR, Hillier SL, Krohn MA, Ferrieri P, Zaleznik DF, Baker CJ. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. **Obstet Gynecol**, 2000; Oct 96(4);498–503.

10 – CDC Centers for Disease Control and prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: Revised Guidelines from CDC, **MMWR 2010**;59 (RR-10)

11 - Schuchat A, Hilger T, Zell E, Farley MM, Reingold A, Harrison L. Active bacterial core surveillance of emerging infections program network. **Emerg. Infect Dis.**, 2001;7(1):92-9.

12 - CDC Centers for Disease Control and prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: Revised Guidelines from CDC – Unites States, **MMWR 2002**:51 (RR-11)

13 - Ruoff KL, Whiley RA, Beighton D. *Streptococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA. & Tenover FC. (Eds). **Manual of Clinical Microbiology**. 8th ed. Washington: American Society for Microbiology, pp.405-421. 2003.

14 - Williams L, Wilkins INC. Breast Milk Transmission of Group B Streptococcal Infection. **The Ped Infect Dis J**, 2002;21(6): 567-568

15 - CDC Centers for Disease Control and prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective, **MMWR 1996**;45(RR-7).

16 - Borger LI, Oliveira CER, Castro DCA, Mondinho BSS. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação de susceptibilidade aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 2005;27:10

17 – Koneman W, Alen SD, Janda WM, Schrenkenberger PC, Winn Jr WC. The Gram-Positive Cocci: Part II, chapter 13, In: **Diagnostic Microbiology - Color atlas and textbook**. 6th ed. Lippincott, 2006.

18 - Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **J Exp Med**, 1933; 57: 571–95.

19 - Fry RM. Fatal infections by hemolytic streptococcus group B. **The Lancet**, 1938; i:199-201.

- 20 – Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotipe. **J Clin Microbiol.**, 2007; 45(9):29-36.
- 21 - Kogan G, Uhrín D, Brisson JR, Paoletti LC, Blodgett AE, Kasper DL, Jennings H J. Structural and immunochemical characterization of the type VIII Group B *streptococcus* capsular polysaccharide. **J. Biol. Chem**, 1996; 271: 8786-8790.
- 22 - Von Hunolstein C, D'ascenzi S, Wagner B, Jelinkova J, Alfarone G, Racchia S, Wagner M, Orefici G. Immunochemistry of capsular type polysaccharide and virulence properties of type VI *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococci) **Infection And Immunity**, 1993; 61:4,1272-1280.
- 23 - Von Hunolstein C, Parisi L, Tissi L, Recchia S, Alfarone G, Nicolini L, Volpe C, Wagner B, Motlova J, Orefici G. Virulence Properties of Type VII *Streptococcus Agalactiae* (Group B Streptococci) and immunochemical analysis of capsular type polysaccharide. **Journal of Medical Microbiology**, 1999; 48:11, 983-990.
- 24 - Doran KS, Nizet V. Molecular pathogenesis of neonatal Group B streptococcal infection: no longer in its Infancy. **Molecular Microbiology**, 2004; 54:23-31.
- 25 - Lin FY, Weisman LE, Azimi PH, Philips JB.3rd, Clark P, Regan J. Level of maternal IGG anti-group B streptococcus type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen, **J. Infect. Dis.** 2004; 190:928-34.
- 26 - Nizet V, Rubens C. Factores de Virulência de Streptococcus Grupo B com importancia en las infecciones neonatales. **Asociación Argentina de Microbiología**; Boletin n° 146. Enero. [internet] Argentina; 2001 [citado em 12 de janeiro de 2008]. Disponível em: <http://medicine.ucsd.edu/nizetlab/streptococcipage/spanish.html>
- 27 - Jarva H, Jokiranta TS, Würzner R, Meri S. Complement resistance of streptococci. **Mol Immunol**, 2003; 40:95-107.

- 28 - Dillon HC, Jr, Khare S, Gray BM. Group B streptococcal carriage and disease: a 6-year prospective study. **The Journal of Pediatrics**. 1987; 110: 1, 31-36.
- 29 - Jelinkova J, Motlova J. Worldwide distribution of two new serotypes of Group B streptococci: type IV and provisional type v. **J. Clin. Microbiol.**,1985; 21: 361-362.
- 30 – Lin FYC, Clemens JD, Azimi PH, Regan JA, Weisman LE, Philips JB, Rhoads GG, Clark P, Brenner R, Ferrieri P. Capsular polysaccharide types of Group B streptococcal isolates from neonates with early-onset systemic infection. **The Journal Of Infectious Diseases**, 1998; 177: 790-792.
- 31 - Beckman C, Waggoner JD, Harris T. Identification of novel adhesins from group b streptococci by use of phage display reveals the c5a peptidase mediates fibronectin binding. **Infect. Immun.**, 2002; 70:2869-2876.
- 32 - Bohnsack JF, Mollison KW, Buko AM, Ashworth JC, Hill HR. Group B streptococci inactivate complement component C5a by enzymic cleavage at the c-terminus. **Biochemical Journal**, 1991; 273:635-640.
- 33 - Cheng QI, Stafslie D, Purushothaman SS, Cleary P. The Group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasion. **Infect. Immun.** 2002;70: 2408-2413.
- 34 - Strunk RC, Eidlen DM., Mason RJ. Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. **J Clin Invest.**, 1988; 81(5): 1419–1426.
- 35 - Baker CJ, Kasper JL. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. **N Engl J Med.**,1976; 753-6.
- 36 - Wessels MR, Haft RF, Heggen LM, Rubens CE. Identification of a genetic locus essential for capsule sialylation in type III group B streptococcus. **Infect Immun**, 1992; 60:392-400.

- 37 - Gibson RL, Nizet V, Rubens CE. Group B streptococcal β -hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. **Pediatric research**, 1999; 45: 626-634.
- 38 - Nizet V, Gibson RL, Chi EY, Framson PE, Hulse M, Rubens CE. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. **Infect Immun**, 1996; 64(9): 3818–3826.
- 39 - Tyrrell GJ, Kennedy A, Shokoples SE, Sherburne RK. Binding end invasion of HeLa and MRC-5 cells by *Streptococcus agalactiae*. **Microbiology**, 2002;148:3921-31.
- 40 - Spellerberg B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. **Microbes Infect**. 2000; 2:1733-42.
- 41 - Liu GY-H, Nizet V. Extracellular virulence factors of Group B streptococci. **Frontiers of Bioscience** 2004; 9: 1794-1802.
- 42 - Pritchard DG, Lin BO, Willingham TR, Baker JR. Characterization of the group b streptococcal hyaluronate lyase **Archives of biochemistry and biophysics** 1994; 315:2, 431-437.
- 43 - Doran KS, Benoit VM, Gertz RE, Beall B, Nizet V. Late-onset group B streptococcal infection in identical twins: insight to disease pathogenesis. **J. Perinatal**, 2002; 22:236-30.
- 44 - Ferrieri P. Surface-localized protein antigens of group B Streptococci. **Rev Infect Dis**, 1988; 10(2): S363-S366.
- 45 - Hauge M, Jespersgaard C, Poulsen K, Kilian M. Population structure of *Streptococcus agalactiae* reveals an association between specific evolutionary lineages and putative virulence factors but not disease. **Infect and Immunity**, 1996;64(3): 919-925.
- 46 – Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JJ. editors. **Gram Positive Pathogens**.(Internet) Washington, DC; ASM Publications, 2000. (cited 29 de abril de 2011). Available from: <http://books.google.com.br/books>

47 - Flores A, Ferrieri P. Molecular species of R-protein antigens produced by clinical isolates of group B streptococci. **J Clin Microbiol**, 1989; 27(5):1050-1054.

48 – Wibawan IWT, Lämmler C. Isolation and characterizations of group B streptococcal type antigens x and r. **Zbl. Bakt.** 1991; v. 25, p. 327-334.

49 - Wibawan IWT, Lämmler C, Smola J. Properties and type antigen patterns of group B streptococcal isolates from pigs and nutrias. **J. Clin. Microbiol.**, 1993; v. 31, p. 762-764.

50 - Rainard P, Sarradin P, Poutrel B. Phenotypic variability of X-protein expression by mastitis causing *Streptococcus agalactiae* of serotype NT/X and opsonic activities of specific antibodies. **Microbial Pathogenesis**, 1994; 16(5): 359-372.

51 - Stalhammar-Carlemalm M, Stenberg L, Lindahl G. Protein Rib: A novel group B Streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. **J Exp Med**, 1993; 177: 1593 -1603.

52 – Kvam AL, Efstratiou A, Bevanger L, Cookson BD, Marticorena IF, George RC. Distribution of serovariants of group B Streptococci in isolates from England and Norway. **J Med Microbiol**, 1995; 42:246-50.

53 – Adong S, Yinzhi Z, Guirong Z, Yonghong Y, Zaifang J. Experimental study on distribution of serotypes and antimicrobial patterns of Group B streptococcus strains. **Chin Medical J**, 1998; 111:615-8.

54 – Berg S, Torllfors B, Lagergard T, Zackrisson G, Claesson BA. Serotypes and clinical manifestations of group B streptococcal infections in western Sweden. **Clin Microbiol Infect**, 2000; 6:9-13.

55 – Moyo SR, Mudzori J, Tswana AS, Maeland JA. Prevalence, capsular type distribution anthropometric and obstetric factors of group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*) colonization in pregnancy. **Cent Afr Med**, 2000; 46:115-20

- 56 – Davies HD, Raj S, Adair C, Robinson J, Mc Geer A. Population-based active surveillance for neonatal group B streptococcal infections in Alberta, Canada: implications for vaccine formulation. **Pediatr Infect Dis J**, 2001; 20:879-84.
- 57 – Toresani I, Limansky A, Bogado I, Guardati MC, Viale A, Sutich EG. Phenotypic and genotypic study of *streptococcus agalactiae* in vagina of pregnant women in Argentina. **Medicina**, 2001; 61:295-300.
- 58 - Lin F, Sintchenko V, Kong F, Gilbert GL, Coiera E. Commonly used molecular epidemiology markers of *Streptococcus agalactiae* do not appear to predict virulence. **Pathology**, 2009; 41 (6):576-81
- 59 – Lee BK., Song YR, Kim MY, Yang JH, Shin JH, Seo YS, Oh KY, Yooh HR, Pai SY, Foxman B, Ki M. Epidemiology of group Streptococcus in Korea pregnant women. **Epidemiol Infect.** 2010 Feb; 138 (2): 292-8.
- 60 - Seond M, Nassar AH, Zlloua P, Boghossian N, Ezeddine J, Fakhoury H, Abboud J, Meiki I, Araj G, Bacouzi G, Sanyoura M, Yunis K. Prenatal and neonatal group B Streptococcus screening and serotyping in Lebanon: incidence and implications. **Acta Obstet Gynecol Scand.** 2010 Marc;89(3):399-403.
- 61 - Dhanoa A, Karunakaran R, Puthuchearry SD. Serotype distribution and antibiotic susceptibility of group B streptococcal in pregnant women. **Epidemiol Infect.** 2010 Jul; 138 (7):979-81.Epub 2009 Nov 5.
- 62 – Smânia Jr A, Benchetrit LC, Smânia EFA, Fracalanza SEL. Isolamento de estreptococos do grupo B, de gestantes e neonatos, em Florianópolis, Santa Catarina. **Rev Bras Anal Clin**, 1986; 18:103-8.
- 63 – Benchetrit LC, Fracalanza SEL, Peregrino H, Camelo AA, Sanches LALR. Carriage of streptococcus agalactiae in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil. **J Clin Microbiol** 1982; 15:787-90.

64 – Amaral EM. Estreptococo do grupo B: rastrear ou não rastrear no Brasil? Eis a questão; **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. 2005; v. 27, n. 4, P.165-167.

65 – Simões JA, Alves VMN, Fracalanza SEL, Camargo RPS, Mathias L, Milanez HMBP, Brolazo EM. Phenotypical characteristics of Group B Streptococcus in parturients. **The Brazilian Journal of Diseases**, 2007; 11(2):261-266

66 – Palmeiro JK, Dalla-Costa LM, Fracalanza SE, Botelho AC, da Silva NK, Scheffer MC, de Almeida TRS, de Carvalho NS, Cogo LL, Madeira HM. Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in southern Brazil. **J Clin Microbiol**, 2010 Dec; 48(12):4397-403.

67 - Tazi A, Reglier-Poupet H, Dauteza F, Raymond J, Poyart C. Comparative evaluation of Strepto B ID chromogenic medium and Granada media for the detection of group B *Streptococcus* from vaginal samples of pregnant women. **J Microbiol Methods**, 2008;73:263–5.

68 – Votava M, Tejkalov M, Drbkov M, Unzeitig V, Braveny I. Use of GBS media for rapid detection of group B streptococci in vaginal and rectal swabs from women in labor. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 2001;20:120–2.

.

69 - Peltroche-Llacsahuanga H, Fiandaca M, Von Oy S, Ltticken R, Haase G. Rapid detection of *Streptococcus agalactiae* from swabs by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization. **J Med Microbiol**, 2010; 59:179–84.

70 – Goodrich JS, Miller MB. Comparison of culture and 2 real-time polymerase chain reaction assays to detect group B *Streptococcus* during antepartum screening. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 2007;59:17–22.

71 - Block T, Munson E, Culver A, Vaughan K, Hryciuk JE. Comparison of carrot broth- and selective Todd-Hewitt broth-enhanced PCR protocols for real-time detection of *Streptococcus agalactiae* in prenatal vaginal/anorectal specimens. **J Clin Microbiol**, 2008;46:3615–20.

- 72 – Scicchitano L, Bourbeau P. Comparative evaluation of the Accuprobe group B *Streptococcus* culture test, the BD Geneohm Strep B assay, and culture for detection of group B streptococci in pregnant women. **J Clin Microbiol** 2009;47:3021–3.
- 73 – Heath PT, Feldman RG. Vaccination against group B *Streptococcus*. **Expert Review of Vaccines**, 2005;4:207–18.
- 74 – Baker CJ, Paoletti LC, Rench MA. Use of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine for type II group B *Streptococcus* in healthy women. **J Infect Dis**, 2000;182:1129–38.
- 75 - Elliott JA, Farmer KD, Facklam RR. Sudden increase in isolation of group b streptococci, serotype v, is not due to emergence of a new Pulsed-Field Gel Electrophoresis Type **J. Clin. Microbiol.** , 1998 36: 2115-2116.
- 76 - Greenberg DN, Ascher DP, Yoder BA, Heiman HS, Keith JF. Group B streptococcus serotype V. **J Pediatr**, 1993. 122:638-40.
- 77 - Mc Fadin JF, **Biochemical Tests of Identification of Medical Bacteria**. 3rd ed. Philadelphia, PA: Ed. Lippincott Williams and Willkin, 2000.
- 78 - Andrews K.R. University Berrien Springs, MI, **ASM Microbelibrary**, (Internet) Publications, 11 november 2010. (cited 03 de julho de 2011). Available from: <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3241-catalase-test>
- 79 - Hanson A, Pietraszewski M, University of Maine, Orono, ME, **ASM Microbelibrary**, (Internet) Publications, 21 september 2010. (cited 03 de julho de 2011). Available from: <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3038-camp-test-for-the-identification-ofb-hemolytic-streptococcus-agalactiae-group-b>
- 80 - Dentini P. **Complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística em um Centro de Referência no Brasil: Identificação, prevalência e importância clínica**; Campinas,SP: 2010. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

81 – Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J. 2003.

82 – Kong F, Ma L, Gilbert GL. Simultaneous detection and serotype identification of *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and line blot hybridization. **J of Med. Microbiol.**, 2005; 54:1133-1138.

83 – Kong F, Gowan S, Martin D, James G, Gilbert GL. Serotype identification of group B Streptococci by PCR and sequencing. **J. Clin Microbiol.** , 2002; 40:216-226.

84 - Associação Médica Brasileira. Projeto diretrizes. “Rotura Prematura das Membranas” **Autoria: Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** [internet]. São Paulo; 2008 [citado em 02 de fevereiro de 2008]. Disponível em: <http://www.amb.org.br>

85 – Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. **N Engl J Med**, 2000;342:15–20.

86 – Aoki NR, Dellatorre GAJ, Barros AA, Calil R, Silva NTM, Fatores de risco para sepsis em recém-nascidos em um serviço universitário de neonatologia, **IV Congresso Internacional de Neonatologia**, 28 a 30 maio de 2009, Curitiba – PR – Brasil.

87 – Schrag SJ, Zell ER, Lynfield R, Roome A, Arnold KE, Craig AS. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. **N. Engl. J. Med**, 2002; 347 (4):233-9.

88 – Desa DJ, Trevenen CL. Intrauterine infections with group B beta-haemolytic streptococci. **Br J Obstet Gynaecol**, 1984;91:237–9.

89 – Katz V, Bowes WA, Perinatal group B streptococcal infections across intact amniotic membranes. **J Reprod Med**, 1988;33:445–9.

90 – Ramus R, Mc Intire D, Wendell GJ. Antibiotic chemoprophylaxis for group B strep is not necessary with elective cesarean section at term. **Am J Obstet Gynecol**, 1999;180 (Suppl):85.

91 - Secretaria Municipal de Saúde - Prefeitura Municipal de Campinas, Centro Colaborador em Análise de Situação de Saúde / DMPS / FCM / UNICAMP **Boletim de Mortalidade nº 35**, Mortalidade perinatal Informe do Projeto de Monitorização dos Óbitos no Município de Campinas [home Page na internet]. Campinas; 2005 [citado em abril/2005]. Disponível em: <http://2009.campinas.sp.gov.br/saude>

92 - Secretaria Municipal de Saúde - Prefeitura Municipal de Campinas, Saúde em Números: **Nascidos Vivos por ano e tipo de parto Mães residentes em Campinas - 2000 a 2010** [home Page na internet]
Disponível em: <http://2009.campinas.sp.gov.br/saude>

93 – Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M. The era molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis, **Clin. Microbiology Reviews**, 2010; .23:01, 235-251.

Apêndice

Artigo submetido À Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia

“Identificação de sorotipos de *Streptococcus agalactiae* pela técnica de PCR de amostras isoladas de recém nascidos infectados do CAISM/UNICAMP”

“*Streptococcus agalactiae* serotypes identification by PCR of samples isolated from infected neonates of CAISM /UNICAMP”

Kateli Fiolo¹, Carlos Emilio Levy², Cibele Zanardi Esteves³, Carmem Silvia Bertuzzo⁴, Marizete Salvadego⁵, Eni Dagnoni⁵, Eliana Amaral⁶.

1 - Mestranda do Programa de Saúde da Criança e do Adolescente da UNICAMP

2 – Professor Assistente, Depto. de Patologia Clínica, FCM/ UNICAMP

3 – Aluna de Iniciação Científica, Curso de Farmácia/UNICAMP

4 – Professora Associada, Departamento de Genética Médica FCM/UNICAMP

5 – Biologistas, Laboratório de Microbiologia, Hospital de Clínicas/UNICAMP

6 – Professora Associada, Departamento de Tocoginecologia, FCM/UNICAMP

Local da pesquisa: Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas e Laboratório de Genética humana e molecular - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas

Correspondência: Carlos Emilio Levy

Divisão de Patologia Clínica- Hospital das Clínicas UNICAMP

Av. Vital Brasil 251, 2º Andar, Cidade Universitária ”Zeferino Vaz” – Barão Geraldo
Campinas - São Paulo

E-mail: celevy@fcm.unicamp.br

Não há restrição sobre informações pessoais para fins de publicação.

Nota: padrão para publicação na RBGO

RESUMO

OBJETIVO: Analisar os sorotipos de estreptococo beta-hemolítico do grupo B (EGB) isolados de recém-nascidos (RN) com infecção precoce, internados no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas (CAISM /UNICAMP) **MÉTODOS:** Estudo transversal realizado de janeiro de 2007 a dezembro de 2010. As cepas foram obtidas de amostras de sangue, liquor e secreção ocular e foram submetidas a provas laboratoriais manuais após constatação de hemólise em Agar sangue, com coloração de Gram, provas de catalase, teste de CAMP, hidrólise do hipurato ou por automação microbiológica Vitek®2 Compact BioMerieux. Na sequência, foram sorotipadas por PCR, utilizando sucessivamente primers específicos para espécie e para nove sorotipos de *S. agalactiae*. **RESULTADOS:** Foram isoladas seis amostras positivas, com 1, 2, 1 e 2 casos, respectivamente, para os anos de 2007 a 2010. Obteve-se uma incidência média 0,553 casos de EGB por 1.000 nascidos vivos em uma média de 2.713 partos nos quatro anos de estudo. Encontraram-se duas amostras de cada um dos sorotipos Ia, III e V nas quatro amostras de sangue, uma de liquor e uma de secreção ocular dos recém-nascidos com quadro clínico de infecção. Na única amostra de sangue materna pareada encontrou o mesmo sorotipo III que se isolou no recém-nascido. **CONCLUSÕES:** O reduzido número de amostras de recém nascidos infectados possivelmente decorre da eficiência do programa de profilaxia do EGB em gestantes. Os sorotipos encontrados, associados à maior virulência, coincidem com aqueles descritos na literatura mundial. A técnica de PCR revelou ser muito útil e de elevada especificidade.

Palavras-Chave: *Streptococcus agalactiae*, infecção neonatal, sepse neonatal, meningite neonatal, tipagem capsular, PCR.

ABSTRACT

PURPOSE: Analyze the serotypes of beta-hemolytic streptococcus group B (GBS) isolated from newborn (NB) with early infection admitted to the Center of Integral Attention to Women's Health at the University of Campinas (CAISM/ UNICAMP). **METHODS:** A transversal laboratory survey conducted from January 2007 to December 2010. The newborns strains were isolated from blood, cerebrospinal fluid and and secretion ocular samples. The strains were screened by the hemolysis on blood agar plates, Gram stain and catalase test, followed by standard methods: CAMP test, hippurate hydrolysis or by microbiological automation: Vitek®2 Compact BioMerieux. They were serotyped by PCR using specific primers successively for species and nine serotypes of *S. agalactiae*. **RESULTS:** There were only six samples isolated from infectious processes caused by GBS in newborns of CAISM, with 1,2,1 and 2 cases respectively for each year from 2007 through 2010, with only one case with mother-child paired samples. Considering that the CAISM performed on average 2,713 deliveries/year for the study period, we estimate an average incidence of GBS 0.553 cases per 1,000 live births. The serotypes found in four samples of blood, one cerebrospinal fluid and one ocular secretion, were two samples of each of following serotypes: Ia, III and V. In the sample of the mother's blood was found the same serotype III than in the newborn. **CONCLUSIONS:** The number of samples from newborns was lower than expected, possibly due to the efficiency of the screening program and maternal GBS prophylaxis. The serotypes that we found in our infected newborns are the most prevalent in the literature and associated with increased virulence. The PCR technique has proved to be very useful and with high specificity.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, neonatal infection, perinatal sepsis, perinatal meningitis, capsular typing, PCR.

“Identificação de sorotipos de *Streptococcus agalactiae* pela técnica de PCR de amostras isoladas de recém nascidos infectados do CAISM/UNICAMP”

"*Streptococcus agalactiae* serotypes identification by PCR of samples isolated from infected neonates of CAISM /UNICAMP"

INTRODUÇÃO

O *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus* do Grupo B (EGB) é uma bactéria gram-positiva de potencial invasivo, especialmente no período perinatal, acometendo recém-nascidos, gestantes ou puérperas e, mais recentemente, pacientes idosos e outros casos de infecção hospitalar (1,2). A doença em recém-nascidos (RN) em geral ocorre na primeira semana de vida e é denominada sepse neonatal de início precoce (3,4). As formas clínicas em recém-nascidos abrangem a sepse, osteomielite, artrite séptica, pneumonia e meningite, podendo acarretar seqüelas neurológicas, visuais e auditivas graves em 15% a 30% dos acometidos, ou podendo levar ao óbito (4).

Aproximadamente 10% a 30% das gestantes são colonizadas pelo EGB na vagina ou no reto (3,4). Na ausência de qualquer intervenção, estima-se que 1% a 2% dos recém nascidos de mães colonizadas desenvolva doença precoce por EGB (4). No entanto, a letalidade da infecção diminuiu de 50% na década de 1970, para 4% a 6% nos últimos anos, principalmente devido aos protocolos de triagem e antibióticoprofilaxia e avanços no cuidado neonatal (1). As recomendações de prevenção ao EGB nos EUA resultaram em um declínio na incidência de casos da doença precoce em recém nascidos de 1,7 casos por mil nascidos vivos na década de 1990, para cerca de, 0,34 casos por mil nascidos vivos em 2008 (4).

Em 1996, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) publicou diretrizes para a prevenção de infecção estreptocócica do grupo B no período perinatal (5). As normas foram atualizadas e republicadas em 2002 pelo CDC padronizando a triagem de mulheres grávidas para detecção de colonização pelo EGB entre a 35^a e 37^a semanas de gestação, indicando profilaxia antibiótica nas infectadas, durante o trabalho de parto (6). Os antibióticos utilizados na profilaxia são penicilina e ampicilina, em casos de alergia a estas drogas, eritromicina ou clindamicina.

O aparecimento, em diferentes países, de cepas de EGB resistentes aumentou a busca por alternativas na prevenção (6,7). Assim, em junho de 2009, o CDC reavaliou as estratégias de prevenção com base em dados coletados após a emissão de Diretrizes de 2002, dando novas orientações, referente ao uso racional dos antibióticos, triagem de

urina e metodologias laboratoriais (4). Na ausência do licenciamento de uma vacina, a triagem universal e a profilaxia antibiótica continuam a ser os pilares da prevenção da doença (4). Do ponto de vista microbiológico, cada etapa do processo laboratorial (coleta, isolamento e apropriada identificação do EGB) é crítico para o sucesso da caracterização deste agente, assim como a experiência do profissional que executa estas tarefas (4,7-10). A utilização de meio de cultura seletivo, contendo agentes antimicrobianos que são capazes de inibir o crescimento de outros microorganismos comuns da microbiota, é importante para crescimento de *Streptococcus agalactiae*, com aumento da possibilidade de seu isolamento em aproximadamente 50%, reduzindo os casos de falso positivo e falso negativo. O meio de cultura seletivo mais empregado é o caldo de Todd Hewitt, contendo gentamicina e ácido nalidíxico ou colistina e ácido nalidíxico. Caldo seletivo contendo substratos cromogênicos que mudam de cor na presença do EGB beta-hemolítico vem sendo muito utilizado; entretanto uma pequena quantidade de cepas não hemolíticas pode resultar em falsos negativos (4). A utilização de placas de Agar sangue é útil para isolamento e para a identificação presuntiva que pode ser feita pelo teste de CAMP, ou identificação pela aglutinação com partículas de látex, com antisoro para *Streptococcus* do Grupo B, ou mais recentemente com alguns meios cromogênicos em agar, que sofrem alteração de cor na presença de colônias beta-hemolíticas (11,12).

Além de técnicas convencionais de identificação para EGB, foram desenvolvidas sondas de DNA (4,13) e testes de amplificação de ácido nucléico, como reação em cadeia da polimerase (PCR) (14,15). Foi observado aumento da sensibilidade na identificação de EGB em amostras colhidas no pré-natal e cultivo enriquecido, de 54,3% para 94,0% em relação àquelas obtidas no intra-parto e amplificadas por PCR (4 14,16).

O *Streptococcus agalactiae* é classificado em sorotipos de acordo com diferenças antigênicas capsulares (4 9,10). A variedade capsular tem relação com a virulência e identificar os sorotipos é fundamental para estudos clínicos e epidemiológicos. (4, 9). Existem nove sorotipos capsulares distintos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII) (10), além do novo IX, descrito em 2007 por Slotvet, H e colaboradores (17). Dentre os dez sorotipos conhecidos, relata-se que o sorotipo III é o mais encontrado nas doenças do neonato principalmente meningite e septicemia e é o segundo mais detectado em amostra vaginal de gestantes assintomáticas; o sorotipo Ia é

o mais isolado em amostra vaginal e o sorotipo V têm predominado em casos de infecção em adultos, excluindo-se as gestantes. (4).

É grande o interesse do desenvolvimento de uma vacina para a prevenção das infecções pelo EGB, reduzindo a colonização materna e prevenindo a transmissão neonatal. Ainda não existe vacina licenciada, mas os estudos em fase I e II têm revelado que, mães imunizadas, produzindo anticorpos IgG tipo específico, protegem seus RNs de doença invasiva (4,18-20). Para planejamento da composição antigênica dessa vacina, extensivos estudos epidemiológicos serão necessários para avaliar a distribuição dos sorotipos de EGB nas diferentes populações (4,9).

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo laboratorial, transversal e descritivo foi realizado na Divisão de Patologia Clínica / Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital de Clínicas, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP e Laboratório de Genética Humana da FCM UNICAMP.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Médica em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP sob o parecer nº 640/2008.

Foram triadas durante o período de 01/01/2007 a 31/12/2010, cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de recém-nascidos infectados atendidos no CAISM (Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher - Hospital da Mulher Prof Dr José Aristodemo Pinotti).

Processamento do material do CAISM/UNICAMP

Amostras de hemocultura e líquido cefalorraquidiano (LCR) de recém nascidos foram colhidas em suspeita de quadro infeccioso e foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia do HC da UNICAMP para processamento. Amostras de sangue foram processadas no equipamento de automação BacT/ALERT® BioMerieux. Amostras de LCR eram semeadas diretamente em placas de Agar chocolate e Agar MacConkey e em tubo contendo caldo BHI e incubado a 37°C com 5% de CO₂ permanecendo por 24 às 72h horas na estufa, sendo observado diariamente para detectar a presença de crescimento bacteriano.

Semeadura, isolamento e identificação

Amostras de hemocultura positivas no BacT/ALERT® eram semeadas para isolamento de colônias por estriamento em placa de Agar sangue de carneiro e incubado a 37°C com 5% de CO₂ permanecendo por 24 horas na estufa.

O crescimento bacteriano era observado e as colônias selecionadas com morfologia e beta hemólise de *S. agalactiae*. Eram realizadas a prova da Catalase e a coloração de Gram. A identificação era feita através do teste de CAMP, teste de hidrólise do hipurato (9,10) ou em caso de resultados duvidosos pelo equipamento de automação Vitek®2 Compact (*BioMérieux Vitek Inc., St. Louis, MO*). As amostras confirmadas foram estocadas a -80°C, em tubos, contendo caldo BHI com 15% de glicerol.

Extração de DNA

O protocolo de extração baseou-se no trabalho de Ausubel, et al 2003 (21) utilizando colônias crescidas diretamente no agar sangue, que foram diluídas em 400 µl de solução TE pH 8,0 e 50 µl de lisozima 10 mg/ml incubadas por 3 horas á 65°C. Foi adicionado 70 µl de SDS 10% e 5 µl de proteinase K 10mg/ml, incubado 65°C por 10 min., em seguida, acrescentou-se 100 µl de NaCl 5M e 100 µl de CTAB/NaCl (pré aquecido a 65°C), e foi incubado á 65°C por mais 10 min.. Foi adicionado 750 µl de Clorofórmio/Álcool Isoamílico (24:1) e centrifugado por 10 min. a 12000 RPM. Ao sobrenadante foram acrescentados 600 µl de Isopropanol e incubado a -20°C por 30 min. e centrifugado por 05 min. a 12000 RPM. Ao precipitado foram adicionados 1000 µl de álcool 100%, e foi incubado por 24 horas a -20°C. Após o período de incubação o DNA foi centrifugado por 05 min. a 12000 RPM, descartando-se o sobrenadante e, ao precipitado, foram adicionados 1000 µl de álcool 70%. e foi incubado por 1 hora a -20°C e, após foi descartado o sobrenadante e adicionado 100 µl de água Milliq® estéril e foi estocado -20°C. (21)

Quantificação e diluição de DNA:

O DNA genômico foi quantificado por espectrofotometria, pelo NanoVue®, General Electric Company. Todas as amostras foram diluídas à 50ng, utilizando água Milliq® e as amostras estocadas à -20°C.

Reação de PCR multiplex

Foi designado um par de primers para cada sorotipo de EGB (Ia, Ib, II-VIII) e um par para confirmar o microrganismo como realmente sendo *Streptococcus agalactiae*. (22,23). Foram feitas três reações no termociclador, sendo a primeira apenas com os primers que definiam a espécie. As amostras que amplificaram nessa etapa foram amplificadas com os outros nove pares de primers misturados na quantidade de 0,25µl por amostra em um mix de Primers forward e Primers reverse. Por fim, realizou-se uma última reação para confirmar o sorotipo apenas com o par de primers que amplificou na reação anterior, descartando-se reações cruzadas. Na reação utilizou-se: 3µl do DNA de interesse, 2,5µl de dNTPs, 2,5 µl de tampão Taq (Taq Buffer with KCl - Fermentas Life Science, USA), 2,5 µl tampão MgCl² (Fermentas Life Science, USA) 0,1 µl de *Taq* polimerase (Fermentas Life Science, USA), 0,25µl de primer forward e 0,25µl de primer reverse e completando com água MilliQ® ou deionizada até 25 µl. O ciclo do termociclador foi de 15 min. a 94°C, 60°C por 30 seg., 72°C por 1 min., 72°C por 10 min., e final de 22°C. (23).

Eletroforese

Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Foi utilizado 2,0 µl de marcador de peso molecular *100Kb e 50Kb* (Fermentas Life Science, USA). As imagens foram capturadas pelo analisador Amersham Biosciences/GE Healthcare Typhoon 9400®, e armazenados em pendrive e posteriormente, analisadas.

RESULTADOS

No período de 2007 a 2010 obtivemos, apenas 6 amostras positivas para *S. agalactiae*, de RNs do CAISM, tendo sido quatro isoladas de hemocultura, uma de liquor e uma de secreção ocular. Em apenas um dos casos foi possível obter amostras positivas pareadas da mãe e do RN, totalizando sete amostras analisadas. (Tabela 1). Entre os seis RNs com processos infecciosos causados por *S. agalactiae*, em quatro foi diagnosticado quadro de sepse neonatal precoce, um de meningite neonatal precoce e um de conjuntivite purulenta. (Tabela 1).

A triagem inicial por PCR de espécie *S. agalactiae* confirmou as sete amostras selecionadas. O PCR dos sorotipos das seis amostras de RNs provenientes de diferentes sítios infecciosos revelou a participação dos tipos Ia, III e V, com dois casos cada um

(Tabela 2); os demais tipos não foram encontrados. Na única amostra pareada mãe - RN o subtipo III foi encontrado em ambos. Foi possível fazer a tipagem de todas as amostras com os primers disponíveis (Tabela 2).

Durante o período de estudo de 2007 a 2010 foi calculada uma relação média para doença de início precoce por EGB de 0, 553 casos por 1000 nascidos vivos, no CAISM/UNICAMP, variando entre 0, 363 e 0, 734 casos por 1000 nascidos vivos. (Tabela 3)

DISCUSSÃO

A triagem de *S. agalactiae* com amostra reto-vaginal entre a 35^a e 37^a semana de gestação (4,6), seguida de tratamento profilático das gestantes colonizadas, utilizada rotineiramente no CAISM, mostrou-se pertinente e efetiva. Esta rotina coincide com aquela preconizada pelo CDC e estabelecida no Projeto Diretrizes da AMB para “Rotura Prematura das Membranas” (24). Essa conduta baseia-se na estimativa de risco vinte e cinco vezes maior para uma grávida colonizada por EGB ter um parto de RN com doença de início precoce, comparada a uma gestante com cultura negativa no pré-natal (4).

Na falta de qualquer intervenção, entre 1% a 2% dos RN nascidos de mães colonizadas desenvolvem infecções precoces por EGB (4-7). É fundamental destacar que a elevada letalidade da doença diminuiu de 50% na década de 70 (4) para 4% a 6% nos últimos anos, principalmente devido aos avanços no cuidado neonatal (1,25). A mortalidade é de 2% a 3% entre os recém-nascidos a termo, sendo maior entre os recém-nascidos prematuros com taxas de letalidade de cerca de 20%, já entre aqueles com gestação de ≤ 33 semanas a letalidade pode chegar á de 30% (1,25). Nos EUA, a incidência da infecção por EGB diminuiu cerca de 80% desde o início de 1990 até 2002, alcançando um patamar de aproximadamente 0,5 casos por mil nascidos vivos (4). Depois de 2002, a incidência caiu mais e nos últimos anos tem variado de 0,3-0,4 casos por mil nascidos vivos. Este declínio adicional de 20% a 40% é coerente com o previsto para a estratégia de prevenção que incluiu a triagem universal em 2002 (6). Entre nós, encontramos uma incidência semelhante, de 0, 553 casos por mil nascidos vivos após o início da triagem pré-natal com amostra vaginal/retal de gestantes. Segundo dados do CAISM referente ao período anterior, (de 1996 a 2007), sem triagem e apenas profilaxia por fatores de risco, a incidência estimada era de 0,82 casos por mil nascidos vivos (26).

Outra razão para o uso da triagem materna incluiu o argumento de reduzir o uso de antibióticos desnecessários em mulheres não colonizadas, tendo em vista o aparecimento, em diferentes países, de cepas de EGB resistentes a drogas antimicrobianas, usadas na profilaxia e no tratamento da infecção (26). Com a triagem apenas as mulheres colonizadas passaram a utilizar os antibióticos.

Os recursos laboratoriais tradicionais utilizados para isolamento e identificação de EGB, associados ao reconhecimento da sua importância clínica, ao uso do caldo seletivo Todd-Hewitt®, com ou sem o uso de meios cromogênicos, como indicado pelo CDC2010, permitiram um melhor conhecimento de sua epidemiologia e patogenia (4). Entretanto, deficiências no treinamento ou intimidade com o agente podem ainda restringir o sucesso da sua caracterização. Outros fatores que podem dificultar o seu isolamento são pacientes tratados previamente com antimicrobianos, a não coleta de material para diagnóstico ou pela menor sensibilidade da hemocultura para casos com baixa bacteremia. Novos recursos moleculares para detecção do *S. agalactiae* diretamente em amostras de sangue estão sendo utilizados, alguns automatizados, que além de mais sensíveis rápidos e padronizados, poderão ser úteis para fins clínicos e epidemiológicos (22,27).

Quanto aos sorotipos encontrados em nosso estudo, a prevalência do sorotipo Ia, III e V condiz com os achados em outros países onde diversos estudos, demonstraram que os sorotipos: Ia, III e V são mais encontrados em amostras reto-vaginais (4,7,28-34), e assim como em outras amostras clínicas em adultos gestantes ou não (2). Estes sorotipos também estão relacionados a maior virulência e, portanto, associados a maioria das infecções neonatais, maternas e em outras populações (1-4,9,30). Na Inglaterra e Noruega, os sorotipos predominantes são III (33,8%) e Ib (21,3%) (28) e na China, os sorotipos II (33%), III (23%) e Ia (16%) (29). Já nos EUA em 2000, os dois sorotipos mais comuns foram o tipo III e V; o tipo III causa mais de 50% das doenças infantis, o tipo V cerca de 40% das doenças de adultos não gestantes enquanto o tipo Ia é responsável por cerca de um terço da doença em qualquer grupo (30). Da mesma maneira, um estudo sueco de 2000 encontrou o sorotipo III como o mais frequente (32%), seguido do sorotipo V (22%) (31). Estes dados são concordantes com um estudo africano do mesmo ano (32). No Canadá, 81% das doenças neonatais precoces foram causadas pelo EGB dos sorotipos Ia, III e V (33). Na Argentina, o sorotipo III esteve presente em 47,6% dos RN (34).

Os dados sobre os sorotipos mais prevalentes no Brasil são poucos. Em Florianópolis, os sorotipos mais frequentes foram II e o III (35) e no Rio de Janeiro em 1982, os sorotipos Ib e Ia (36). Um estudo em 2005 encontrou o sorotipo Ib predominante entre gestantes de Jundiaí, São Paulo, seguido pelos sorotipos II e Ia (37,38). Esses sorotipos não são muito virulentos, diferente do sorotipo III, que é um dos mais encontrados nas infecções em neonatos, principalmente meningite e septicemia (9).

Na ausência de uma vacina, a triagem universal e a profilaxia antibiótica continuam a ser os pilares da prevenção da doença de Início Precoce (4). Existem poucos estudos no mundo e raros no Brasil sobre a distribuição dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae* na população, fundamental para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra o EGB. Investigar o padrão de sorotipos capsulares em diferentes regiões ou populações é necessário para avaliar a diversidade capsular possibilitando diferentes combinações de antígenos atingindo um número maior de pessoas em diferentes localizações geográficas (22).

CONCLUSÃO

Durante o período do estudo foram observados raros casos de infecção em recém nascidos na população de pacientes atendidos no CAISM, possivelmente devido à eficiência do programa de triagem. Em nosso estudo a prevalência de sorotipos encontrados pela técnica de PCR é semelhante ao encontrado nos países industrializados onde os sorotipos mais comuns são Ia, III e V. A técnica de PCR revelou ser útil na caracterização dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae* e os testes por PCR têm demonstrado alta sensibilidade e especificidade. Porém, a complexidade desses testes ainda é muito alta para que os mesmos sejam implementados na rotina de um laboratório, devendo, no entanto, em breve ser superada com a introdução de novas técnicas automatizadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço á colaboração de todos os funcionários do Laboratório de Microbiologia - Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas e também do Laboratório de Genética Humana e Molecular - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Phares;C.,R., Lynfield;R., Farley; M.,M., Mohle-Boetani;J., Harrison;L.,H., Petit; S. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005. JAMA 2008;299:2056–65
- 2 - Farley; M.,M. Group B Streptococcal Disease in Non pregnant Adults. Clinical Infectious Diseases, 2001; 33:556-61
- 3 - Campbell;J.,R., Hillier;S.,L., Krohn;M.,A., Ferrieri; P., Zaleznik; D.,F., Baker; C.,J. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. Obstet Gynecol 2000 Oct;96(4):498–503.
- 4 – CDC Centers for Disease Control and prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: Revised Guidelines from CDC, MMWR 2010;59 (RR-10)
- 5 - CDC Centers for Disease Control and prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. MMWR 1996;45(RR-7).
- 6 - CDC Centers for Disease Control and prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: Revised Guidelines from CDC – Unites States, MMWR 2002;51 (RR-11)
- 7 - Borger;L.,I., Oliveira;C.,E.,R., Castro;D.,C.,A., Mondinho;B.,S.,S. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação de susceptibilidade aos antimicrobianos; Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia 2005.27:10
- 8 – Nomura;L., M., Junior;P.,R., Oliveira;M.,U. Selective versus non-selective culture medium for group B streptococcus detection in pregnancies complicated by perterm-prematures rupture of membranes; The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2006:10(4):246-249

9 – Koneman;W., Alen;S.,D., Janda;W.,M., Schrenkenberger;P.,C.,Winn; Jr.,W.,C. The Gram-Positive Cocci: Part II, chapter 13.In: Diagnostic Microbiology - Color atlas and textbook. 6th ed. Lippincott, 2006.

10 – Murray; P., M., Baron;E., J., Jorgensen;J., H., Landry; M., L., Pfaller; M., A. Manual of Clinical Microbiology, 9th Ed ASM Press Washington DC 2007

11 - Tazi ;A., Reglier-Poupet; H., Dauteza; F., Raymond ;J., Poyart; C. Comparative evaluation of Strepto B ID chromogenic medium and Granada media for the detection of group B *Streptococcus* from vaginal samples of pregnant women. J Microbiol Methods 2008;73:263–5.

12 – Votava; M., Tejkalov; M., Drbkov; M., Unzeitig;V., Braveny;I. Use of GBS media for rapid detection of group B streptococci in vaginal and rectal swabs from women in labor. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001;20:120–2.

13 - Peltroche-Llacsahuanga;H., Fiandaca;M., Von Oy;S., Ltticken;R., Haase;G. Rapid detection of *Streptococcus agalactiae* from swabs by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization. J Med Microbiol 2010; 59:179–84.

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

15 - Block ;T., Munson; E., Culver; A., Vaughan; K., Hryciuk; J.,E. Comparison of carrot broth- and selective Todd-Hewitt broth-enhanced PCR protocols for real-time detection of *Streptococcus agalactiae* in prenatal vaginal/anorectal specimens. J Clin Microbiol 2008;46:3615–20.

16 – Scicchitano; L., Bourbeau; P. Comparative evaluation of the Accuprobe group B *Streptococcus* culture test, the BD Geneohm Strep B assay, and culture for detection of group B streptococci in pregnant women. J Clin Microbiol 2009;47:3021–3.

17 – Slotved;H.,C., Kong; F., Lambertsen; L., Sauer; S., Gilbert; G.,L. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. J Clin Microbiol. 2007; 45(9):29-36.

18 - Heath; P.,T., Feldman; R.,G. Vaccination against group B *Streptococcus*. Expert Review of Vaccines 2005;4:207–18.

19 - Edwards; M.,S. Group B streptococcal conjugate vaccine: a timely concept for which the time has come. Human Vaccines 2008;4:444–8.

20 - Baker; C.,J., Paoletti;L.,C., Rench; M.,A. Use of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine for type II group B *Streptococcus* in healthy women. J Infect Dis 2000;182:1129–38.

21 - Ausubel; F.,M., Brent;, R., Kingston; R.,E., Moore; D.,D., Seidman; J.,G., Smith; J.,A., Struhl; K.. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J. 2003.

22 - Kong; F., Ma; L., Gilbert; G.,L. Simultaneous detection and serotype identification of *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and line blot hybridization. J of Med. Microbiol., 2005; 54:1133-1138,

23 - Kong; F., Gowan; S., Martin; D., James; G., Gilbert; G., L. Serotype identification of group B Streptococci by PCR and sequencing. J. Clin Microbiol., 2002; 40:216-226

24 - Associação Médica Brasileira. Projeto diretrizes. “Rotura Prematura das Membranas” *Autoria*: Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia [internet]. São Paulo; 2008 [citado em 02 de fevereiro de 2008]. Disponível em: <http://www.amb.org.br>

25 - Schrag, S.,J., Zywicki; S., Farley; M.,M., Reingold; A.,L., Harrison;L.,H., Lefkowitz; L.,B. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. N Engl J Med 2000;342:15–20.

26 - Aoki, N.,R.;Dellatorre; G.,A.,J.,Barros; A.,A.,Calil; R.,Silva; N.,T.,M., Fatores de risco para sepse em recém-nascidos em um serviço universitário de neonatologia, IV Congresso Internacional de Neonatologia, 28 a 30 maio de 2009, Curitiba – PR – Brasil.

- 27 - Mancini; N., Carletti; S., Ghidoli; N., Cichero; P., Burioni; R., Clementi; M. The era molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis, Clin. Microbiology Reviews, 2010;23:01, 235-251.
- 28 - Kvam;A.,L., Efstratiou;A., Bevanger;L., Cookson; B.,D, Marticorena; I.,F, George; R.,C. Distribution of serovariants of group B Streptococci in isolates from England and Norway. J Med Microbiol 1995; 42:246-50.
- 29 - Adong; S., Yinzi; Z., Guirong; Z., Yonghong; Y., Zaifang; J. Experimental study on distribution of serotypes and antimicrobial patterns of Group B streptococcus strains. Chin Medical J 1998; 111:615-8.
- 30 - Fischetti; V.,A., Novick; R.,P., Ferretti; J.,J., Portnoy; D.,A., Rood; J.,I. editors. Gram Positive Pathogens.(Internet) Washington, DC; ASM Publications, 2000. (cited 29 de abril de 2011). Available from: <http://books.google.com.br/books>
- 31 - Berg; S., Torllfors; B., Lagergard; T., Zackrisson; G., Claesson; B.,A. Serotypes and clinical manifestations of group B streptococcal infections in western Sweden.Clin Microbiol Infect 2000; 6:9-13.
- 32 - Moyo; S.,R., Mudzori; J., Tswana; A.,S., Maeland; J.,A. Prevalence, capsular type distribution, anthropometric and obstetric factors of group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*) colonization in pregnancy. Cent Afr Med 2000; 46:115-20
- 33 - Davies; H.,D., Raj; S., Adair; C., Robinson; J., McGeer; A. Population-based active surveillance for neonatal group B streptococcal infections in Alberta, Canada: implications for vaccine formulation. Pediatr Infect Dis J 2001; 20:879-84.
- 34 - Toresani; I., Limansky; A., Bogado; I., Guardati; M., C., Viale; A., Sutich; E.,G. Phenotypic and genotypic study of *streptococcus agalactiae* in vagina of pregnant women in Argentina. Medicina 2001; 61:295-300.
- 35 - Smânia; Jr., A., Benchetrit; L.,C., Smânia; E.,F.,A., Fracalanza; S.,E.,L. Isolamento de estreptococos do grupo B, de gestantes e neonatos, em Florianópolis, Santa Catarina. Rev Bras Anal Clin 1986; 18:103-8.

36 - Benchetrit; L.,C., Fracalanza; S.,E.,L., Peregrino; H., Camelo; A.,A., Sanches; L.,A.,L.,R. Carriage of streptococcus agalactiae in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil. J Clin Microbiol 1982; 15:787-90.

37 - Amaral; E.,M. Estreptococo do grupo B: rastrear ou não rastrear no Brasil? Eis a questão; Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. 2005; v. 27, n. 4, P.165-167.

38 - Simões; J.,A., Alves; V.,M.,N.,Fracalanza S.,E.,L., Camargo; R.,P.,S., Mathias; L., Milanez; H.,M.,B.,P., Brolazo; E.,M. Phenotypical characteristics of Group B Streptococcus in parturients. The Brazilian Journal of Diseases, 2007; 11(2):261-266

Tabela 1 – Amostras de *Streptococcus agalactiae* em amostras de RN isolados no CAISM e um caso de mãe - RN pareados, no período de 2007 e 2010

Código RN	Amostra	Quadro clínico	Ano	Amostra Mãe
58	liquor	meningite	2007	Não
64	Sangue	sepse	2008	Não
91	Sangue	sepse	2008	Sangue
284*	Sangue	sepse	2009	Não
2130	Sangue	sepse	2010	Não
270	ocular	conjuntivite	2010	Não

*evoluiu para óbito (tabela 1)

Tabela 2 – Distribuição dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae* obtidos por PCR de amostras provenientes de recém-nascidos do CAISM/UNICAMP e um caso de mãe - RN pareados no período de 2007 a 2010.

Material	Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	T. Amostras
Secreção Ocular	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Sangue RNs	1	-	-	1*	-	2	-	-	-	-	4
Sangue da mãe	-	-	-	1*	-	-	-	-	-	-	1
Liquor	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Total Geral	2	0	0	3	0	2	0	0	0	0	7

*amostras pareadas mãe e RN com o mesmo sorotipo (tabela 2)

Tabela 3 – Estimativa da incidência da doença de início precoce causada por EGB em RN por mil nascidos vivos no CAISM/UNICAMP, durante o período de 2007 a 2010.

Anos	Total de Partos	Número de casos	Incidência por mil nascidos vivos
2007	2.685	1	0,372
2008	2.687	2	0,744
2009	2.754	1	0,363
2010	2.724	2	0,734
Média →	2.713	1,5	0,553

*amostras pareadas mãe e RN com o mesmo sorotipo

AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Ao Conselho Editorial da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria

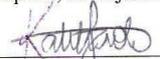
Estamos encaminhando para submissão o Artigo: "Identificação de sorotipos de *Streptococcus agalactiae* pela técnica de PCR de amostras isoladas de recém nascidos infectados do CAISM/UNICAMP" dos Autores: Kateli Fiolo, Carlos Emilio Levy, Cibele Esteves Zanardi, Carmem Silvia Bertuzzo, Marizete Salvadego, Eni Dagnoni, Eliana Martorano Amaral.

Ressaltamos a relevância do presente estudo tanto pela importância do tema na prática clínica, como pelos resultados encontrados como pela escassez de estudos brasileiros semelhantes e colocamo-nos disposição para esclarecimentos, comentários e sugestões que se fizerem necessários.

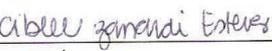
O(s) autor(es) do presente trabalho assumem que:

1. Os procedimentos éticos referentes a um trabalho científico foram atendidos;
2. Não existe Conflito de interesses em relação ao material apresentado.
3. Participaram do trabalho e responsabilizam-se publicamente por ele.
4. Revisaram a forma final do trabalho e o aprovam para publicação na Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria.
5. Este trabalho, ou outro substancialmente semelhante em conteúdo, não foi publicado, nem está sendo submetido a outro periódico ou foi publicado como parte de livro.
6. Concordam em ceder os direitos autorais do material publicado para a Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria e da Febrasgo, só podendo ser reproduzido, total ou parcialmente, com a anuência dessas entidades.

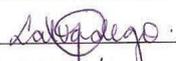
Campinas, 20 de junho de 2011



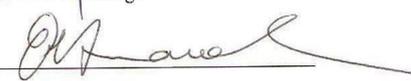
M^a Kateli Fiolo



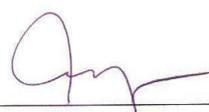
Cibele Esteves Zanardi



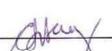
Marizete Salvadego



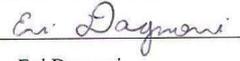
Prof.^a Dr.^a Eliana Amaral



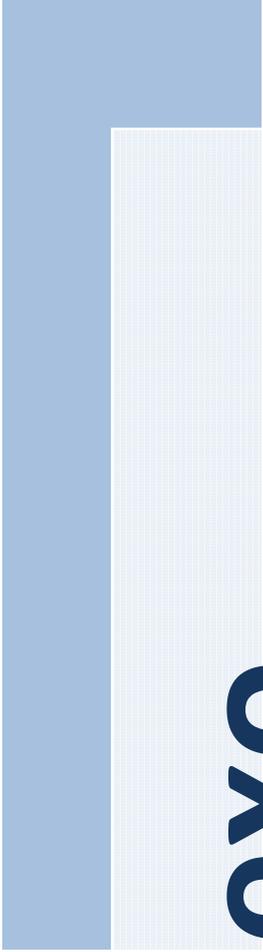
Prof. Dr. Carlos Emilio Levy



Prof.^a Dr.^a Carmem Silvia Bertuzzo



Eni Dagnoni



Anexo

1. Certificado da qualificação



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA
CRIANÇA E DO ADOLESCENTE



CERTIFICADO

Certificamos que a aluna, **Kateli Fiolo**, RA: 068152, regularmente matriculada no Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente submeteu-se ao Exame de Qualificação para o **Mestrado** com trabalho intitulado "**Quali Estudo da Variabilidade Capsular pelo PCR de Linhagens de Streptococcus Agalactiae Isoladas no Período Peri-Natal de Pacientes Colonizados e Infectados na Cidade de Campinas e Região**", tendo sido aprovada. A Banca Examinadora foi composta pelos professores doutores: Prof. Dr. Carlos Emilio Levy, presidente e orientador, Profa. Dra. Eliana Martorano Amaral e Profa. Dra. Antonia Teresinha Tresoldi.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
30 de maio de 2011



PROFA. DRA. LILIA FREIRE RODRIGUES DE SOUZA LI
COORDENADORA DA COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE
FCM/UNICAMP

2. Parecer do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 18/09/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 640/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0515.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DA VARIABILIDADE CAPSULAR PELO PCR DE LINHAGENS DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* ISOLADAS NO PERÍODO PERI-NATAL DE PACIENTES COLONIZADOS E INFECTADOS NA CIDADE DE CAMPINAS E REGIÃO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carlos Emílio Levy

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/08/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 18/09/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Descrever e analisar o perfil epidemiológico de linhagens de *Streptococcus agalactiae* prevalente na região de Campinas, isolados a partir de amostras de pacientes colonizados ou infectados.

III - SUMÁRIO

Trata-se de estudo laboratorial, transversal e descritivo. Será realizado com cepas bacterianas de *S. agalactiae* originadas de pacientes infectados ou colonizados e isoladas em exames de rotina solicitados por iniciativa de médicos que assistem a esses pacientes e encaminhados ao laboratório de microbiologia da divisão de patologia clínica do HC/Unicamp ou do CAISM, além da rotina laboratorial de outros serviços de campinas como Lab. de análises clínicas JÁ Voza Ltda, Lab. de análises clínicas bromatológicas Vita Brazil S/C Ltda, Lab. de análises clínicas Ramos de Souza S/C Ltda., Hospital e Maternidade Celso Pierro, Hospital e Maternidade Madre Theodora e Hospital Estadual de Sumaré. Das cepas isoladas em processos infecciosos e de amostras representativas de portadoras maternas deverá ser efetuada tipagem molecular da cápsula, usando primers específicos para cada subtipo. Serão incluídos no estudo cepas de *S. agalactiae* isoladas durante o período de 01/01/2006 a 01/01/2008 de pacientes colonizados ou infectados de qualquer idade, independente de gênero ou raça, atendidos no HC e CAISM, bem como nos serviços privados descritos acima no período de 01/09/2008 a 01/09/2009. Serão excluídas as amostras não identificadas corretamente e as repetidas do mesmo paciente e material de coleta, além daquelas que não forem confirmadas como *S. agalactiae*.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES .

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologação VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de agosto de 2008.

Prof. Dra. Carmem Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

4. Autorização para os Laboratórios de Campinas e região

Ao Laboratório _____

Prezado (a) Senhor (a) Responsável

Venho por meio desta, solicitar a colaboração e autorização para o fornecimento de cepas bacterianas de *Streptococcus agalactiae* que venham a ser isoladas neste laboratório provenientes de exames feitos a partir de qualquer material biológico de pacientes infectados ou colonizados, para meu projeto de mestrado, que visa traçar o perfil microbiológico e epidemiológico desta bactéria na região de Campinas. A colaboração deste Laboratório é de vital importância para o sucesso de nossa proposta. O projeto irá definir a variabilidade capsular do *S. agalactiae* encontrado em nossa comunidade, dados que poderão reorientar medidas de profilaxia disponíveis na atualidade.

Titulo do projeto: **“Estudo da variabilidade capsular pelo PCR de linhagens de *Streptococcus agalactiae* isoladas no período peri-natal de pacientes colonizados e infectados na cidade de Campinas e região”**

Responsáveis pelo projeto: **Kateli Fiolo** (kateli@fcm.unicamp.br)

Mestranda do Programa de Pós Graduação da Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp. Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas UNICAMP

Prof. Dr. Carlos Emilio Levy (celevy@fcm.unicamp.br)

Departamento de Patologia Clínica da Unicamp

Responsável pela Divisão de Patologia Clínica do HC da Unicamp

Professor Orientador pelo Departamento de Pediatria

Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente

Campinas ____ de _____ de 20__

Assinatura um dos responsáveis pelo Projeto

Assinatura Responsável pelo Laboratório