Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2010

Maria José de Oliveira Araújo

Perfil de susceptibilidade do *Streptococcus agalactiae* a antimicrobianos

Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2010

Maria José de Oliveira Araújo

Perfil de susceptibilidade do *Streptococcus agalactiae* a antimicrobianos

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Doutora Ana Cristina Rodrigues Silva, médica especialista em Patologia Clínica e Directora do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, EPE.

Dedico este trabalho ao Tomás e ao Nuno pelo incondicional apoio.

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Anabela Oliveira Pereira
Investigador em Pós-Doutoramento do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar

Doutora Ana Cristina Rodrigues Silva
Médico especialista em Patologia Clínica e Assistente Hospitalar Graduado com funções de Director de Serviço no Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, EPE

Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Professor Doutor António Correia, pela disponibilidade demonstrada no esclarecimento de algumas questões ocorridas ao longo deste mestrado.

À Professora Doutora Sónia Mendo, minha orientadora na Universidade, pelo excelente acompanhamento, disponibilidade, incentivo e optimismo demonstrados durante a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Directora de Serviço e amiga Dra. Ana Cristina Silva, que me possibilitou a realização deste estudo contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal e por todo o apoio, disponibilidade, carinho, incentivo e alegria que me deu durante esta fase da minha vida.

Ao Tomás, ao Nuno e aos meus pais que sempre me apoiaram, acreditaram e me ajudaram a concretizar este sonho.

À Maria João pela amizade, disponibilidade e apoio que me deu.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, em especial aos que comigo trabalharam na Microbiologia.

A todos aqueles que de alguma forma tenham contribuído para que este projecto se tornasse realidade.

palavras-chave

Streptococcus agalactiae, grávida, recém-nascido, eritromicina, clindamicina, penicilina.

resumo

O *Streptococcus agalactiae* ou do grupo B (SGB) reconhecido durante décadas como o agente etiológico da mastite bovina é, hoje em dia, um patogénio associado a várias patologias humanas. É frequentemente associado a patologias da grávida e do recém-nascido, mas a Organização Mundial de Saúde (OMS) alerta para o risco elevado de morte por doença invasiva causada por este agente em indivíduos com mais de 65 anos.

Embora a infecção por SGB tenda a ocorrer mais comummente em adultos do que em recém-nascidos, a taxa de mortalidade é mais elevada nestes últimos (Joachim et al 2009).

Os estudos de prevalência mostram taxas de colonização variáveis de acordo com a população estudada, a sua localização geográfica, a região onde é feita a pesquisa (vaginal e/ou rectal) e com as características do meio de cultura utilizado (Diaz e Nieves 2008). No presente estudo obteve-se uma prevalência de 19,7% (105 amostras positivas nas 533 estudadas).

Os antibióticos estudados, penicilina, eritromicina e clindamicina foram escolhidos com base nos critérios da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). As 105 amostras positivas estudadas foram todas sensíveis à penicilina e obteve-se uma taxa de resistência de 22,9% tanto para a eritromicina como para a clindamicina.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a população estudada apresenta uma taxa elevada de resistência aos antibióticos de segunda linha. Estes dados podem dever-se ao facto de não se conhecer o estado real de alergia à penicilina e ao uso imediato da clindamicina como alternativa. No Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, E.P.E. (CHEDV), a eritromicina está em desuso por ter menor capacidade de atravessar a barreira placentária e atingir as concentrações desejadas para prevenção de infecção no recém-nascido.

Espera-se que num futuro próximo se desenvolva a tão desejada vacina capaz de prevenir a infecção por SGB, bem como o desenvolvimento de técnicas de pesquisa e rastreio deste agente que possam ser realizadas no momento do parto de forma a minimizar as situações em que o rastreio realizado entre as 35 e as 37 semanas de gestação não detecta a colonização pela bactéria.

keywords

Streptococcus agalactiae, pregnant, newborn, erythromycin, clindamycin, penicillin.

abstract

Streptococcus agalactiae or Streptococcus group B (GBS) was recognized for decades as the causative agent of bovine mastitis but today is a pathogen associated with several human diseases. It is often associated with pregnant and newborn diseases but World Health Organization (WHO) warns to the high risk of death in individuals over 65.

Although GBS infection tends to occur more in adults than in newborns, the mortality rate is higher in the youngest group (Joachim et al 2009).

Prevalence studies show that colonization rates can vary according to the characteristics of the population, geographic location, product tested (vaginal and/or rectal) and the characteristics of the culture medium used (Diaz and Nieves 2008). In this study we obtained a prevalence rate of 19,7% (105 positive samples in 533 studied).

Penicillin, erythromycin and clindamycin were selected based on the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria. The 105 positive samples were all susceptible to penicillin and a resistance rate of 22,9% was obtained for both erythromycin and clindamycin.

According to the results, we concluded that the population we studied has a high resistance rate of the second choice antibiotics. These facts may be due to the use of clindamycin as alternative even when the real allergy state from the patient to penicillin is unknown. In Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, E.P.E. (CHEDV), the use of erythromycin is decreasing due to lower ability to cross the placental barrier and reach the desired concentrations of the chemical in order to prevent an infection in newborn.

It is desirable that, in a near future, scientists not only can develop a vaccine to prevent GBS infection but also can develop new research methods to test the presence of this agent at the moment of delivery in order to minimize the situations where the screening performed between 35 and 37 weeks of pregnancy failed to detect bacterial colonization.

“Para sabermos bem as coisas é preciso sabermos os pormenores, e como estes são quase infinitos, os nossos conhecimentos são sempre superficiais e imperfeitos”.

François La Rochefoucauld

Índice

Lista de Abreviaturas
Lista de Figuras
Lista de Tabelas
Lista de Gráficos

1 – Introdução 1
1.1 - Breve enquadramento histórico 1
1.2 - Características dos SGB 2
1.3 - Epidemiologia da infecção por SGB 6
2 - Susceptibilidade aos antimicrobianos 8
2.1 - Mecanismos de resistência a antimicrobianos 11
2.1.1 - Mecanismos de resistência 13
2.2 - Penicilina G 14
2.3 - Clindamicina 16
2.4 - Eritromicina 17
2.5 - Fenótipo de resistência aos macrólidos 18
3 - Síndromes clínicas 20
3.1 - Rastreio materno 22
3.2 – Quimioprofilaxia 22
4 - Justificação do Estudo 25
5 - Objectivos 27
6 - Material e métodos 28
6.1 - Amostra populacional 28
6.2 - Amostra laboratorial 29
6.3 - Processamento das Amostras 29
6.4 - Testes realizados 30
6.5 - Meios de Cultura 35
7 - Resultados e Discussão 38
8 - Conclusão 49
9 - Futuro? 51
10 - Bibliografia 53
Anexos 59

Lista de Abreviaturas

ANC - Columbia agar com colistina e ácido nalidíxico

CDCP – Centres for Disease Control and Prevention

CHEDV – Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, E.P.E.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI – Concentração Mínima Inibitória

erm – erythromycin ribosome methilation

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GS – Gelose de sangue ou Columbia agar (gelose com 5% de sangue de carneiro)

LCR – Líquido cefalo-raquidiano

OMS – Organização Mundial de Saúde

p – nível de significância (*p* value)

PCR – Polimerase Chain Reaction

PNCI – Programa Nacional de Controlo de Infecção

RN – Recém-nascido

rRNA – Ácido Ribonuclueico (RNA) ribossómico

SGB – *Streptococcus agalactiae* ou do Grupo B

X^2 – Qui-quadrado

Lista de Figuras

Figura 1 – Colónias de *S. agalactiae* em Gelose de Sangue 3
Figura 2 - Bomba de efluxo 13
Figura 3 – Penetração dos β-lactâmicos na parede celular de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo (adaptado de Sousa 2006) 14
Figura 4 – Estrutura química da Penicilina G (adaptado de Sousa 2006) 15
Figura 5 - Estrutura química da Clindamicina (adaptado de Sousa 2006) 16
Figura 6 - Estrutura química de Eritromicina A (adaptado de Sousa 2006) 17
Figura 7 - D-teste positivo 19
Figura 8 – Fluxograma de processamento das amostras 30
Figura 9 – Teste de aglutinação para estreptococos (resultado positivo para SGB) 32
Figura 10 - Caldo de Todd-Hewitt utilizado 35
Figura 11 - Aspecto de Estreptococos do Grupo B em BD Group B Streptococcus Differential Agar (Meio de Granada). 36
Figura 12 - Antibiograma de Estreptococos do Grupo B em meio de Muller Hinton com Sangue 37

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Indicações para profilaxia antibiótica intra-parto (adaptado de Ayres de Campos, Montenegro e Rodrigues 2008) 23
Tabela 2 – Interpretação do antibiograma..... 34
Tabela 3 – Frequência de amostras..... 38
Tabela 4 - Média de Idade da amostra de acordo com resultado..... 42

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Proveniência das amostras 39
Gráfico 2 – Distribuição dos rastreios positivos e negativos 40
Gráfico 3 - Sensibilidade Vs Resistência da Eritromicina 44
Gráfico 4 - Sensibilidade Vs Resistência da Clindamicina 46
Gráfico 5 - Fenótipos de resistência 47

1 – Introdução

1.1 - Breve enquadramento histórico

Embora *o Streptococcus agalactiae* ou do grupo B (SGB) após o seu isolamento tenha sido reconhecido durante décadas como o agente etiológico da mastite bovina, é hoje em dia, um patogénio associado a várias patologias humanas.

A sua associação à patologia humana deve-se a Fry que, em 1938 relacionou este agente com três casos fatais de sépsis puerperal (Edwards e Baker 2005). Fry, Lancefield e Hare identificaram este agente em exsudados vaginais de mulheres em período pós-parto sem quaisquer sintomas de doença.

No entanto, até ao início dos anos 60 foram poucos os casos descritos de infecções provocadas por este microrganismo. Nos anos 70, o SGB tornou-se o principal agente de septicémia e meningite em recém-nascidos e em crianças com menos de 3 meses de vida e para além de ser uma preocupação para os pediatras passou a ser relacionada com casos de morbilidade verificados em algumas grávidas (Edwards e Baker 2005).

Esta situação acabou por conduzir à implementação, em meados dos anos 90, de recomendações ao nível da quimioprofilaxia materna intra-parto que conduziram a um decréscimo acentuado não só da incidência de doença de início precoce nos recém-nascidos (que de acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS - baixou 80%), mas também dos casos de doença invasiva durante a gravidez (Edwards e Baker 2005).

Ainda que frequentemente se associe este microrganismo a patologias da grávida e do recém-nascido, a OMS alerta para o risco elevado de morte por doença invasiva causada por este agente em indivíduos com mais de 65 anos.

1.2 - Características dos SGB

O *Manual of Sistematic Bacteriology de Bergey* descreve os estreptococos como bactérias de Gram positivo, catalase negativas, anaeróbias facultativas, esféricas ou ovóides com menos de 2 µm de diâmetro (Ferreira 2000) que formam cadeias curtas em amostras clínicas e cadeias mais longas em cultura (Murray et al 2000). Esta estirpe ainda que cresça na presença de oxigénio não é capaz de realizar o metabolismo respiratório.

A classificação dos estreptococos em espécies sempre foi difícil quer se recorresse a métodos bioquímicos quer serológicos. As reacções hemolíticas e a classificação serológica de Lancefield são ainda largamente usadas, apesar das suas limitações (Ferreira 2000).

Na parede celular dos estreptococos destacam-se proteínas (M, T e R) e alguns hidratos de carbono específicos – carbo-hidrato C (com capacidade antigénica que permitem a classificação serológica de Lancefield) e peptidoglicanos (Ferreira 2000).

Embora as exigências nutritivas variem com as espécies, o crescimento é escasso em meios líquidos ou sólidos não enriquecidos com sangue ou líquidos tecidulares (Ferreira 2000).

Caso as colónias utilizadas no processo de coloração de Gram sejam velhas ou se o doente estiver já medicado com antibióticos, a coloração poderá traduzir cocos de Gram negativo. Trata-se de uma estirpe exigente do ponto de vista nutritivo crescendo melhor em meios complexos com sangue ou soro (Ferreira 2000)). Crescem em meios como a gelose com 5% de sangue de carneiro (GS) ou como a gelose de chocolate (Forbes et al 1998) e em meios selectivos para bactérias de Gram positivo como o Columbia Agar com colistina e ácido nalidíxico (ANC), por exemplo.

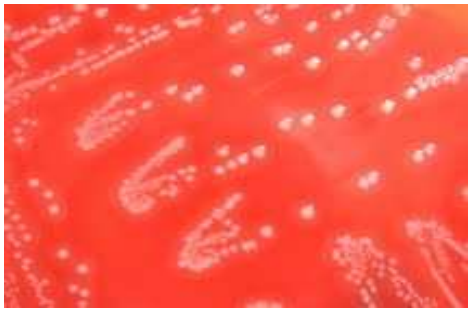

Figura 1 – Colónias de *S. agalactiae* em Gelose de Sangue

Durante a gravidez, a detecção de portadoras de SGB pode ser feita com recurso a meios como Todd-Hewitt com antibióticos (gentamicina e ácido nalidíxico ou colistina e ácido nalidíxico): os antibióticos são usados para inibir o crescimento da flora normal da vagina e para facilitar a cultura de SGB numa subcultura de gelose de sangue. O meio de Lim é um meio formulado para este efeito (Forbes et al 1998).

Em GS as colónias apresentam-se maiores que as de estreptococos do Grupo A (*S. pyogenes*) com aspecto variável entre o translúcido e o opaco, achatadas, brilhantes e com zona de β-hemólise (ainda que algumas estirpes possam não ser hemolíticas) (Forbes et al 1998, Murray et al 2000).

Estes estreptococos possuem um antigénio polissacarídico da parede celular específico do grupo (composto por ramnose, N-acetilglicosamina e galactose), polissacarídeos específicos do tipo (Ia, Ib e II a VI) e a proteína de superfície (antigénio c) (Murray et al 2000). Assim, com base nesta composição, estão descritos nove serotipos imunologicamente distintos: Ia, Ia/c, Ib/c, II, IIc, III, IV, V e VI que constituem importantes marcadores epidemiológicos (Murray et al 2000).

A classificação das espécies faz-se apreciando características diversas, morfológicas, tipo de colónias, a actividade bioquímica, actividade hemolítica em meios com sangue, produção de enzimas e toxinas, posse de determinadas substâncias proteicas ou hidratos de carbono específicas, que podem ser detectadas por métodos serológicos (Ferreira 2000).

Na identificação desta estirpe são de considerar à partida os arranjos celulares visíveis através da coloração de Gram e o tipo de hemólise, sendo, no entanto, a grupagem serológica dos hidratos de carbono da parede celular usada classicamente para a

identificação de estirpes de estreptococos β-hemolíticos. O teste de Lancefield foi progressivamente substituído nos laboratórios clínicos por testes de aglutinação em látex disponíveis comercialmente e estes testes serológicos, ainda que mais caros que os testes bioquímicos, têm vantagens por serem rápidos, confirmatórios e facilmente realizáveis com um número reduzido de colónias.

Os SGB produzem uma proteína termoestável e difusível, denominada factor de CAMP (Christie, Atkins, Munch-Peterson) que aumenta a β-hemólise dos *Staphylococcus aureus*, que tem a capacidade de produzir esfingomielinase C, que, por sua vez, tem a propriedade de se ligar às membranas dos eritrócitos e ao serem expostas ao factor de CAMP provocam a hemólise celular. Considera-se um teste positivo quando aparece uma zona de hemólise em forma de seta na junção das estrias de *S.agalactiae* com o *S.aureus*. Ocasionalmente, as estirpes não hemolíticas de *S.agalactiae* podem ser encontradas recorrendo a este teste, podendo seguidamente ser confirmada a sua identificação. Laboratorialmente, esta reacção é conhecida como Teste de CAMP em homenagem aos cientistas que primeiro descreveram o factor de CAMP.

Bioquimicamente, o *S.agalactiae* hidroliza o hipurato e é positivo no teste de CAMP (Forbes et al 1998, Ferreira 2000), devendo a identificação definitiva ser feita com base na demonstração do hidrato de carbono específico do grupo.

O SGB encontra-se na flora normal do tracto genital feminino e no tracto gastrointestinal baixo (Forbes et al 1998, Murray et al 2000), podendo ocasionalmente colonizar o tracto respiratório superior (Forbes et al 1998).

Normalmente associam-se as infecções por SGB a recém-nascidos que são colonizados antes (no útero materno) ou durante o parto (na passagem pelo canal de parto), podendo, no entanto, ocorrer também transmissão nosocomial deste microrganismo através de mãos mal lavadas, quer da mãe quer dos profissionais de saúde, aquando da prestação de cuidados ao bebé. Nos adultos, a transmissão deste microrganismo ainda não está totalmente esclarecida (Forbes et al 1998) envolvendo provavelmente o acesso do microrganismo desde locais contaminados até locais estéreis.

As infecções que envolvem crianças e recém-nascidos são com frequência precedidas da ruptura prematura de membranas materna e aparecem como problemas multissistémicos

que incluem sépsis, febre, meningite, desconforto respiratório, letargia e hipotensão (Forbes et al 1998) e são classificadas como sendo de início precoce (se ocorrem nos primeiros 6 dias de vida) ou de início tardio (ocorrem entre 7 dias e 3 meses após o nascimento) (Forbes et al 1998).

Nos adultos envolvem infecções pós-parto como a endometrite, por exemplo, que podem evoluir para abcessos pélvicos ou para choque séptico (Forbes et al 1998), bacteriémia, pneumonia, endocardite, artrite, osteomielite e infecções dos tecidos moles, e normalmente reflectem o estado imunocomprometido do doente.

Os factores de virulência ainda não estão bem definidos mas sabe-se que o material capsular interfere com a actividade fagocítica e com a activação do complemento. Muitos dos estreptococos que possuem hidrato de carbono A, B e C de Lancefield produzem cápsulas de ácido hialurónico mais desenvolvidas nas culturas jovens (Ferreira 2000). A cápsula resiste à fagocitose pelos polimorfonucleares e, portanto, funciona como factor de virulência (Ferreira 2000).

Para causarem doença, os SGB devem colonizar as mucosas e depois penetrar nestas superfícies de modo a entrarem normalmente em locais estéreis como a corrente sanguínea, por exemplo. Para conseguirem causar lesão nos tecidos, as estirpes induzem a libertação de substâncias causadoras de inflamação ou produzem substâncias capazes de provocar danos directamente na célula. A aderência de SGB às células epiteliais é integral em diversas etapas da patogénese da doença incluindo a colonização do recto e do tracto genital de mulheres grávidas e de outros adultos e é uma condição necessária à invasão das células do epitélio respiratório de recém-nascidos (Edwards e Baker 2005).

Actualmente estão disponíveis vários kits de detecção antigénica para o diagnóstico de sépsis neonatal e meningite causadas pelo SGB, que permitem o estudo de vários produtos biológicos (urina, soro e líquido cefalo-raquidiano – LCR -). Os testes de aglutinação em látex parecem ser suficientemente sensíveis e específicos (Forbes et al 1998). Salienta-se o facto de poder ser importante detectar o antigénio do SGB em zaragatoas vaginais, uma vez que os recém-nascidos podem adquirir o microrganismo durante a passagem pelo canal de parto colonizado.

1.3 - Epidemiologia da infecção por SGB

Segundo a classificação de Lancefield, o SGB é o líder de infecções maternas e neonatais e é um patogénio oportunista para os adultos (Pinheiro et al 2009, Maniatis et al 1996) e a incidência da doença é variável dependendo do país (Joachim et al 2009).

Embora a infecção por SGB tenda a ocorrer mais comummente em adultos do que em recém-nascidos, a taxa de mortalidade é mais elevada nestes últimos (Joachim et al 2009).

O risco de doença é mais elevado nas mulheres grávidas do que nas não grávidas (Joachim et al 2009) ainda que a taxa de colonização seja semelhante para ambos os grupos (Lo 2009, Motlová et al 2004).

As crianças nascidas de mulheres colonizadas tendem, durante o parto, a ser colonizadas nas superfícies mucosas (Joachim et al 2009). Cerca de 60% de crianças nascidas de mães colonizadas apresentam colonização pelos organismos existentes na mãe, sendo a colonização à nascença tanto maior quanto mais pesada a colonização materna (Joachim et al 2009).

De acordo com dados da OMS, considera-se que a taxa de colonização vaginal possa variar entre os 12% e os 27% a nível mundial, ainda que se verifiquem variações a estes dados em estudos publicados.

Na maioria das populações estudadas, entre 10 e 30% das grávidas apresentava colonização nas regiões vaginal e/ou rectal (Lo 2009). Na Europa, um estudo realizado entre 1996 e 2006 refere taxas de colonização vaginal variáveis entre 6,5% e 36% (Lo 2009).

Há estudos que referem variações nas taxas de colonização (quer maternas, quer neonatais) de acordo com o grupo étnico a que pertence a população do estudo (Tsui et al 2009, Motlová et al 2004), a idade (Motlová et al 2004, Simões et al 2007), factores imunológicos, a área geográfica, o local de colheita da amostra e o meio de cultura utilizado (Simões et al 2007).

A taxa de colonização do tracto genital de mulheres grávidas tem variado ao longo dos tempos: em 1996 variava entre os 5% e os 30% (Hordnes et al 1996), em 2004 variava entre os 10% e os 30% (Motlová et al 2004) e em 2009, a taxa variava entre os 3,2% e os 36% (El Aila et al 2009).

Sabe-se que entre 15% e 35% das grávidas são portadoras assintomáticas da bactéria (Azavedo et al 2001) e que entre 40 e 70% dos recém-nascidos de mulheres colonizadas são colonizados durante o parto (Stan et al 2001), prevendo-se que destes, 1-2% possam desenvolver infecções graves (Stan et al 2001, Motlová et al 2004).

Os SGB podem estar associados com bacteriúrias assintomáticas durante a gravidez sendo a bacteriúria um marcador de inóculo genital (Edwards e Baker 2005).

2 - Susceptibilidade aos antimicrobianos

Ao longo dos tempos, ao associar-se determinada doença a um agente infeccioso, a comunidade científica (ao constatar que tal associação poderia conduzir a epidemias que por sua vez poderiam originar elevadas taxas de mortalidade) considerou imprescindível mobilizar cientistas para que, através de pesquisas, pudessem encontrar compostos naturais e/ou produtos químicos com propriedades antimicrobianas.

Desde Aureolus Paracelsus que, no século XVI, utilizou compostos de antimónio no tratamento de infecções e especificamente mercúrio para o tratamento de sífilis (Sousa 2006) até à descoberta acidental da penicilina, em 1928 por Alexander Fleming, que vários foram os estudos e descobertas ao nível de substâncias e da sua actividade em determinadas situações clínicas. O uso de um antibiótico por Fleming alterou o decurso da terapêutica antimicrobiana: estava-se perante uma molécula dotada de poucos efeitos deletérios sobre as células do Homem (Sousa 2006).

A descoberta dos antibióticos e a sua utilização no tratamento de doenças infecciosas constitui um dos maiores avanços da Medicina no século XX (Sousa 2006). No entanto, a comunidade científica deparou-se com um novo problema após a utilização em larga escala dos antibióticos: o aumento da incidência de estirpes resistentes que hoje em dia atinge valores preocupantes ao nível hospitalar onde aparecem estirpes multirresistentes que dificultam, podendo mesmo limitar, as opções terapêuticas.

Os antibióticos dirigidos contra as bactérias devem ter um tropismo para a célula bacteriana sem que tenham qualquer efeito deletério sobre o Homem e sobre os outros microrganismos, explorando as diferenças entre procariotas e eucariotas.

Na terapêutica de doenças bacterianas devem ser utilizadas moléculas que aliam à sua actividade antibacteriana uma baixa toxicidade, ou seja, substâncias com um bom índice terapêutico (Sousa 2006).

Os antibacterianos têm um tropismo para a célula procariota, interactuando com os respectivos alvos e exercendo a sua actividade bacteriostática (inibindo o crescimento bacteriano, sendo a morte celular provocada pelo sistema imune do hospedeiro) ou bactericida (matando a célula bacteriana podendo ocorrer bacteriólise). (Sousa 2006).

O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) considera e refere que os estreptococos que sejam susceptíveis à penicilina possam ser considerados também susceptíveis à ampicilina, amoxacilina, amoxacilina-ácido clavulânico, ampicilina-sulbactam, cefazolina, cefepime, cefradine, cefalotina, cefotaxime, ceftriaxone, ceftizoxime, ceftizoxime, ertapenem, imipenem e meropenem, o que torna desnecessário testar as estirpes contra todos os antimicrobianos anteriormente enumerados (CLSI 2010).

A susceptibilidade à penicilina não tem sofrido mudanças significativas desde há duas décadas havendo casos descritos de susceptibilidade intermédia mas não de resistência de algumas estirpes (Simões et al 2007). O mesmo não se pode assumir relativamente aos antibióticos de segunda linha, como a eritromicina e a clindamicina, por exemplo, para os quais em alguns países já se encontram descritos aumentos da resistência a estes antibióticos (Azavedo et al 2001, Florindo et al 2009, Borger et al 2005)

A penicilina é o antimicrobiano de escolha para a profilaxia e tratamento de infecções causadas por SGB (Azavedo et al 2001, Florindo et al 2009, Aracil et al 2002, Marimón et al 2005) uma vez que esta estirpe é, salvo raras excepções, uniformemente susceptível à penicilina (Motlová et al 2004, Simões et al 2007), mas a sua resistência à eritromicina e à clindamicina diferem no mundo verificando-se uma taxa mais elevada em Taiwan, que, segundo alguns autores, se pode dever a certos serotipos (Motlová et al 2004).

Motlová e colaboradores, num estudo de 2004, não conseguiram confirmar resistências à penicilina mas concluíram que a proporção de isolados resistentes à eritromicina e à clindamicina haviam aumentado desde 1996.

Outros autores sublinham que as resistências aos agentes antimicrobianos aumentam ao longo do tempo, diferem entre serotipos e variam de acordo com a localização geográfica, o que orienta para que a escolha do agente antimicrobiano deva ser feita pelo padrão de resistência observado em cada região geográfica (Simões et al 2007).

De acordo com as orientações do CLSI a profilaxia intra-parto para o SGB deverá ser feita recorrendo à penicilina ou à ampicilina, embora a cefazolina seja aconselhada nos casos de mulheres alérgicas à penicilina que apresentem um baixo risco de anafilaxia.

No caso em que as mulheres apresentem elevado risco de desenvolver reacção alérgica deverá optar-se por recorrer à eritromicina ou à clindamicina. É de salientar o facto de os SGB serem susceptíveis à ampicilina, à penicilina e à cefazolina mas poderem ser resistentes à clindamicina e/ou eritromicina (CLSI 2010).

Quando os SGB forem isolados de mulheres com alergia severa à penicilina (com elevado risco de anafilaxia), a clindamicina e a eritromicina deverão ser testadas e os resultados reportados ao clínico (CLSI 2010) para que haja adequação da terapêutica a instituir na paciente.

Já em 2002, num estudo de Aracil e colaboradores, havia referência ao facto de tradicionalmente, os macrólidos (mais especificamente a eritromicina) serem considerados os mais adequados no tratamento e profilaxia de infecções por SGB nas pacientes alérgicas à penicilina.

No entanto, o aumento da resistência levou alguns autores a procurarem alternativas e a recomendarem a utilização de clindamicina em vez da eritromicina, por este fármaco ter capacidade de atravessar a barreira placentária e de ser excretado no leite materno podendo atingir concentrações mais elevadas no feto (Aracil et al 2002).

A escolha dos antibióticos, que eventualmente serão de recurso aos clínicos, deverá ser feita de acordo com disponibilidade dos mesmos nas unidades clínicas em que serão utilizados: cada hospital deverá ter definido o protocolo para a profilaxia intra-parto.

2.1 - Mecanismos de resistência a antimicrobianos

Quando se considera o problema do aumento das resistências bacterianas a antimicrobianos num ambiente em que são utilizados agentes potentes, convém lembrar que a resistência não é uma situação nova.
Às vezes, a resistência é reconhecida ainda quando o antibiótico está a ser desenvolvido e se sabe que este não possui um espectro de actividade capaz de actuar sobre a bactéria em causa. Quando se fala de resistência deve-se reconhecer que a maioria dos problemas resulta da expressão de resistência pela bactéria que seria intrinsecamente susceptível ao antibiótico em causa, a denominada resistência adquirida.

O aparecimento de fenótipos de resistência está inevitavelmente ligado ao uso clínico do agente antimicrobiano, o que leva a direccionar os estudos de resistências para os antibióticos de uso clínico e não outros. Por outro lado, ao serem eliminados microrganismos susceptíveis existentes na flora normal, permite-se o desenvolvimento de estirpes resistentes.

Ao aparecer um fenótipo de resistência em estirpes previamente susceptíveis, a rapidez e eficiência com que esse fenótipo se dissemina depende do grau de resistência expresso, da capacidade do microrganismo tolerar os mecanismos de resistência, da capacidade de aquisição de outros genes e do local da infecção primária (Rice et al 2003).

A dispersão da resistência torna-se frequentemente imprevisível, sendo a falha de recurso a técnicas de controlo de infecção dentro e fora das instituições um factor a ter em conta: pode ocorrer transmissão de patogénios entre pacientes através de prestadores de cuidados de saúde que estejam colonizados persistente ou temporariamente pela bactéria.

A resistência antimicrobiana é um problema predominantemente nosocomial mas já se verifica uma disseminação a considerar na comunidade (Rice et al 2003).

Outra fonte de aparecimento e dispersão de bactérias resistentes corresponde a nichos não humanos nos quais se utilizam antibióticos em excesso (nomeadamente em rações) para a promoção e aceleração do crescimento de animais.

A resistência aos agentes antimicrobianos adquirida resulta de processos bioquímicos codificados por genes bacterianos que podem ser devidos a mutações de genes da célula, aquisição de genes de resistência exógenos e mutação de genes adquiridos.

Todos os antibióticos têm alvos, normalmente proteínas, com responsabilidades funcionais ao nível do crescimento e manutenção celulares. Na mutação de genes celulares, essas proteínas são codificadas por genes celulares e as interacções entre antibióticos e proteínas-alvo são por norma específicas. A mudança de um único aminoácido frequentemente resulta na alteração de uma base no gene que pode alterar as interacções. Acontece, por exemplo, na resistência ao linezolide devida a mutações no RNA ribossómico (rRNA).

Se as bactérias não conseguirem desenvolver resistências através de mutações, não têm outra escolha senão procurar novos determinantes de resistência e têm a seu favor o facto de a maioria dos agentes antimicrobianos serem produtos naturais ou seus derivados estando disponíveis quer nas espécies produtoras de antibiótico quer nas espécies que vivam no mesmo nicho ecológico (Rice et al 2003). O desafio para as estirpes susceptíveis é encontrarem e adquirirem estes determinantes de resistência recorrendo para tal a técnicas que promovam a troca de genes (aquisição de genes de resistência exógenos).

Uma das técnicas mais simples, corresponde à transformação natural através da capacidade de algumas estirpes absorverem moléculas de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) do ambiente (Rice et al 2003) que uma vez capturadas atingem o cromossoma bacteriano através de recombinação em regiões homólogas, podendo mesmo dar origem a genes funcionais da bactéria.

No entanto, algumas bactérias não são capazes desta transformação natural e desenvolvem outros mecanismos de aquisição de determinantes genéticos. O mecanismo mais frequente corresponde à transferência de plasmídeos conjugáveis que podem codificar genes importantes.
As bactérias patogénicas tendo sido confrontadas com duros desafios do sistema imunitário humano e com uso de agentes antimicrobianos em excesso desenvolveram mecanismos de resistência que não são mais do que uma resposta ao desafio letal com que se deparam (Rice et al 2003).

2.1.1 - Mecanismos de resistência

São quatro os mecanismos bioquímicos de resistência (Rice et al 2003):

- modificação do antibiótico - estão descritas enzimas capazes de modificar antibióticos, nomeadamente β-lactamases. Estas enzimas são em alguns casos adquiridas mas também podem ser intrínsecas a determinadas espécies.

- acesso restrito ao alvo - quando o antimicrobiano tem que atravessar a membrana citoplasmática, a diminuição do número de canais que permitam o movimento de material através da mesma, por exemplo, contribui para o desenvolvimento de um mecanismo de resistência (Rice et al 2003).

- modificação da molécula-alvo – a interacção do antibiótico com a molécula-alvo é muito específica e pequenas alterações podem ter efeitos significativos na ligação. Este mecanismo tem um papel importante na resistência dos macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B.

- bombas de efluxo – as bombas capazes de remover uma ou mais classes de antibióticos da célula podem ser muito selectivas ou apresentar uma ampla especificidade para o substrato.

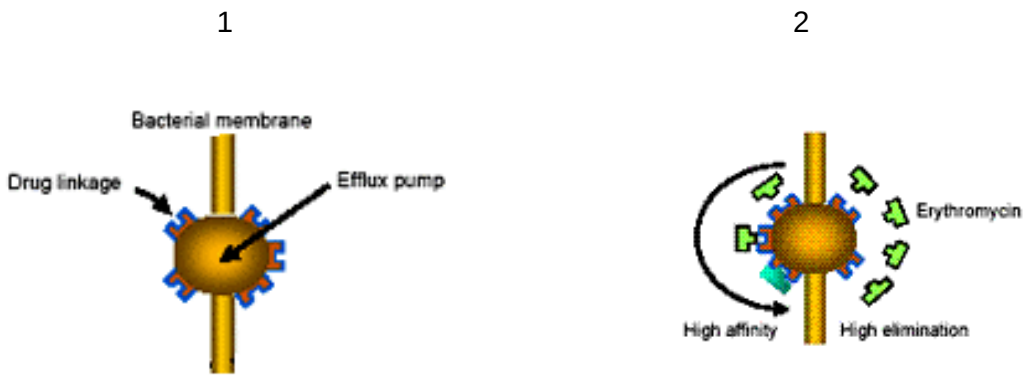

Figura 2 - Bomba de efluxo: na membrana da bactéria encontram-se os locais de elevada afinidade para os antibióticos (1). Na presença da bomba de efluxo, embora os receptores para os antibióticos sejam de elevada afinidade, a droga não consegue estabelecer ligação e é eliminada (2).

A maioria destas bombas está localizada na membrana citoplasmática e usam força motriz protónica na condução do efluxo da droga. A combinação de diferentes tipos de bombas pode resultar em níveis mais elevados de resistência comparativamente a bombas isoladas (Rice et al 2003).

2.2 - Penicilina G

A penicilina G pertence ao grupo dos antibióticos que actuam na fase parietal da biossíntese do peptidoglicano. Os antibióticos antiparietais inibem a síntese do peptidoglicano podendo actuar em diferentes fases: fase citoplasmática, fase membranar e fase parietal (Sousa 2006).

Trata-se de um grupo com relevância clínica dada a sua eficácia terapêutica e a sua baixa toxicidade. O peptidoglicano sendo uma molécula tipicamente encontrada nos procariotas (e que está ausente nos seres eucarióticos) permite que os antibióticos β-lactâmicos possuam uma toxicidade antibacteriana selectiva.

A parede das bactérias de Gram positivo não constitui um obstáculo à penetração destes antibióticos (Figura 3), ao contrário do que se verifica no caso das de Gram negativo, nas quais a parede celular constitui uma barreira adicional de permeabilidade, tratando-se, por isso, de antibióticos que são activos apenas em bactérias de Gram positivo.

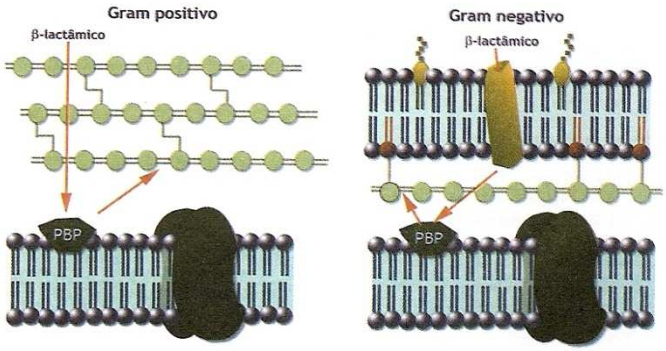

Figura 3 – Penetração dos β-lactâmicos na parede celular de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo (adaptado de Sousa 2006)

Independentemente do local onde actuam, os antibióticos antiparietais só são bacteriolíticos contra bactérias em crescimento e que se encontrem em ambientes hipotónicos (Sousa 2006). Este grupo de antibióticos tem efeito bacteriostático e o efeito lítico ocorre graças à activação do sistema autolítico endógeno da bactéria (Sousa 2006).

Este antimicrobiano produzido inicialmente por *Penicillium notatum* e actualmente, em larga escala, por mutantes de *Penicillium chrysogenum* é a benzilpenicilina.

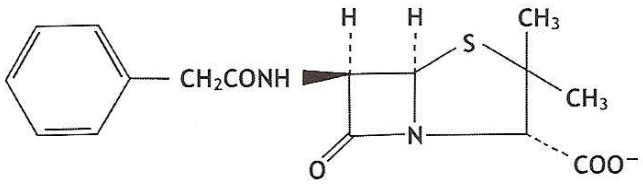

Figura 4 – Estrutura química da Penicilina G (adaptado de Sousa 2006)

Pode apresentar-se sob a forma de sal sódico ou potássico os quais se apresentam como pós secos moderadamente higroscópicos (Sousa 2006) o que obriga a que se conserve em meio isento de humidade. Estes antibióticos são inactivados pelo calor o que obriga a que a sua esterilização deva ser feita recorrendo a radiação ou através de gases, como o óxido de etileno.

As “impurezas” de alto peso molecular e os produtos de degradação das penicilinas têm potencial antigénico quando associados a proteínas admitindo-se que possam desempenhar um papel importante nas manifestações alérgicas provocadas por estes antibióticos.

A eliminação da penicilina G faz-se por via renal e em cerca de 1-2 horas cerca de 90% da dose administrada é recuperada na urina numa forma biologicamente activa. É esta característica comum a todos os β-lactâmicos que justifica a sua grande utilização no tratamento de infecções urinárias (Sousa 2006).

2.3 - Clindamicina

A clindamicina pertence ao grupo das lincosamidas juntamente com a lincomicina mas a primeira apresenta melhor absorção e maior potência antimicrobiana.

As lincosamidas são antibióticos inibidores da síntese proteica, que actuam na subunidade 50S do ribossoma, impedindo a translocação/transpeptidação, e que têm efeitos bacteriostáticos. O seu comportamento é semelhante ao dos macrólidos (Sousa 2006).

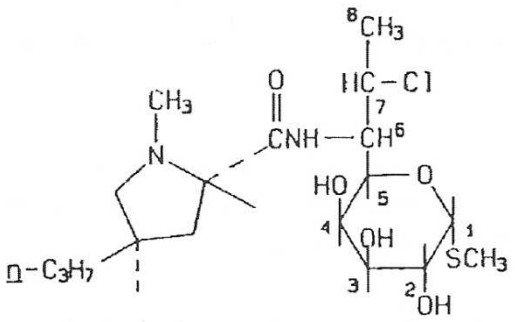

Figura 5 - Estrutura química da Clindamicina (adaptado de Sousa 2006)

Este fármaco administrado em doses terapêuticas não afecta as funções fisiológicas do fagócito; no entanto, em concentração muito elevada inibe a desgranulação do lisossoma e a produção de superóxidos sem que a sua mobilidade seja afectada.

A clindamicina apresenta boa difusão nos tecidos e fluidos corporais atingindo concentrações significativas no tecido ósseo, saliva, líquidos pleural, sinovial e biliar e no humor aquoso. Não atravessa a barreira hematoencefálica mas atravessa a barreira placentária (Sousa 2006). Sofre metabolização hepática e é excretada pela bílis e pela urina, podendo ser também excretada pelo leite materno (Sousa 2006).

Tem sido empregue no tratamento de septicémia, em infecções intra-abdominais e infecções femininas da pélvis e do tracto genital.

2.4 - Eritromicina

A eritromicina pertence ao grupo dos macrólidos tendo sido o primeiro macrólido a ser isolado (Sousa 2006). Foi obtido por extracção a partir de culturas de *Saccharopolyspora erythraea*, uma espécie dos solos das Filipinas. Só a eritromicina A é usada terapeuticamente.

Quimicamente, a eritromicina é uma base insolúvel em água e os seus sais são usados por via gastrointestinal. Tem elevada ligação proteica e distribui-se largamente pelos tecidos e fluidos corporais, sendo excretada por via hepatobiliar, pelas fezes e em pequena quantidade pela urina.

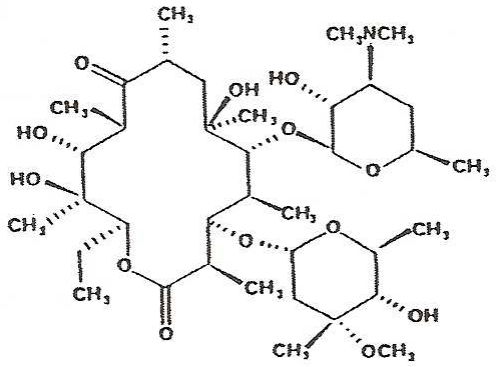

Figura 6 - Estrutura química de Eritromicina A (adaptado de Sousa 2006)

Os macrólidos atingem elevadas concentrações intracelulares e permanecem microbiologicamente activos nos fagócitos, cooperando deste modo com o sistema imune. São inibidores da síntese proteica com acção bacteriostática, exercendo a sua actividade ao nível dos ribossomas procariotas na subunidade 50S inibindo a transpeptidase/translocação (Sousa 2006) e destaca-se a sua acção contra bactérias de Gram positivo.

Tendo actividade contra bactérias de Gram positivo, a eritromicina tem constituído uma alternativa aos β-lactâmicos, principalmente nos doentes com alergia a este grupo de antibióticos.

A eritromicina é eliminada por via hepatobiliar. Difunde bem nos tecidos e fluidos do organismo, não tem capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica, atinge boas concentrações nos fluidos do ouvido médio e na próstata e consegue atravessar a barreira placentária.

O seu uso em conjunto com outros fármacos deverá ser ponderado, uma vez que a eritromicina reprime as enzimas do citocromo P_{450} e pode interferir na metabolização hepática de outros medicamentos condicionando um aumento dessas drogas em circulação.

A resistência dos SGB aos macrólidos está principalmente associada a dois mecanismos: o efluxo activo do antimicrobiano e a modificação do alvo. O efluxo activo do antimicrobiano, que mantém os níveis de eritromicina baixos, resulta da síntese de uma bomba de efluxo dependente de energia. Esta resistência associa-se à expressão de um gene descrito como *mefA* e as amostras que possuem este gene apresentam fenótipo M que representa a resistência aos macrólidos, mas sensibilidade a lincosamidas e a estreptograminas B (Azavedo et al 2001).

A modificação do alvo é mediada por uma metilase, que é codificada pelos genes *ermA* e *ermB.* Esta resistência deve-se à N.N'-dimetilação de um resíduo de adenina ao rRNA 23S (mediada pela metilase, produto do gene *erm*) que provoca alterações de conformação no ribossoma, que conduzem a uma diminuição da ligação de macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B (que embora quimicamente distintos, apresentam mecanismos de acção semelhantes e alvos sobrepostos) (Borger 2005). Este fenótipo de resistência denominado MLS_B.

2.5 - Fenótipo de resistência aos macrólidos

A acção antibacteriana dos Macrólidos (M) parece ser idêntica à das Lincosamidas (L) e da Estreptogramina B (S), sendo possível que as estirpes bacterianas apresentem reacções cruzadas aos mesmos antibióticos.

A CLSI recomenda o estudo da resistência induzida à clindamicina recorrendo a testes de difusão usando o D-teste (CLSI 2010) também designado Método do Duplo Disco. Este teste, de acordo com as indicações da CLSI, deverá ser realizado utilizando discos de 15µg de eritromicina e de 2 µg de clindamicina com uma distância entre si, na mesma placa, de 15-26 mm (CLSI 2010). O meio a utilizar deverá ser Mueller-Hinton com 5% de sangue (MHS), inoculado com uma suspensão de 0,5 MacFarland da estirpe a estudar.

Após 18-24 horas de incubação poderão ser visíveis zonas de inibição à volta dos dois discos (Melo-Cristino et al 2006).

Figura 7 - D-teste positivo

O fenótipo M de resistência observa-se quando há sensibilidade apenas à clindamicina: a resistência verifica-se apenas aos macrólidos (eritromicina) (Azavedo et al 2001, Borger 2005).

No fenótipo MLS_B a produção da metilase pode ser constitutiva (quando há diminuição acentuada ou ausência de halo de inibição em volta dos dois discos) ou induzida (quando há necessidade de um antibacteriano indutor), podendo verificar-se a diminuição acentuada ou ausência de halo de inibição no disco de eritromicina e uma diminuição sectorial da zona de inibição em volta do disco de clindamicina proximal ao disco de eritromicina (Azavedo e tal 2001, Borger 2005).

São então estes fenótipos de resistência à eritromicina que se detectam laboratorialmente através do D-teste.

3 - Síndromes clínicas

Durante a década de 70 verificou-se um aumento da incidência de infecções por SGB e tornou-se aparente uma distribuição bimodal dos casos por idade de início dos sintomas (Edwards e Baker 2005).

Em geral, a infecção de início precoce define-se como uma infecção sistémica durante os primeiros seis dias de vida (Edwards e Baker 2005) e os sintomas clínicos da infecção por SGB adquirida *in utero* ou durante o nascimento caracterizam-se por bacteriémia, pneumonia ou meningite (Edwards e Baker 2005, Murray et al 2000) sendo difícil de distinguir da sépsis causada por outros agentes devido aos sinais presentes (letargia, má alimentação, icterícia, temperatura anormal, grunhidos respiratórios, palidez e hipotensão) que são indistinguíveis daqueles provocados por outros agentes bacterianos (Edwards e Baker 2005).

Ao estabelecer-se uma forma de diagnosticar e tratar precocemente esta patologia verificou-se um decréscimo da taxa de mortalidade para 5% (Murray et al 2000).

Contudo, 15 a 30% dos lactentes que sobrevivem à meningite causada por este agente apresentam sequelas neurológicas que podem incluir cegueira, surdez e grave atraso mental (Murray et al 2000).

Neste tipo de infecção são frequentes complicações obstétricas maternas e as crianças nascidas antes das 37 semanas de gestação apresentam taxas de risco mais elevadas que os recém-nascidos de termo (Edwards e Baker 2005).

A implementação de terapias de suporte e uma maior consciência da existência da patologia conduziram a uma diminuição da mortalidade nas crianças com este tipo de infecção na qual também se verifica uma taxa de mortalidade inversamente proporcional ao peso à nascença.

A infecção de início tardio pode começar entre os 7 e os 89 dias de idade, com uma média de 24 dias (Edwards e Baker 2005) e as complicações obstétricas maternas são

pouco frequentes. Esta patologia é adquirida através de fonte exógena e manifesta-se através de bacteriémia oculta e meningite, que tal como na patologia referida anteriormente, podem ser confundidas com infecções causadas por outras bactérias.

A taxa de sobrevida é elevada mas são frequentes complicações neurológicas em crianças com meningite (Murray et al 2000). Os sinais iniciais de infecção de início tardio como letargia, má alimentação e irritabilidade surgem geralmente associados com febre e estas crianças podem aparecer com infecção fulminante caracterizada pela rápida progressão a um estado moribundo com choque séptico em que o risco de morte ou de sequelas neurológicas permanentes está aumentado (Edwards e Baker 2005). As infecções do osso ou de articulações são outras formas clínicas da patologia que ocorrem com alguma frequência.

Crianças com mais de três meses constituem 10 a 15% do total com infecção de início tardio (Edwards e Baker 2005) verificando-se que muitas destas infecções ocorrem em crianças com baixo peso à nascença que permaneceram hospitalizadas por complicações da prematuridade. O termo início muito tardio é usado com frequência nesta situação (Edwards e Baker 2005).

Para além das patologias relacionadas com os recém-nascidos, o SGB também pode causar infecções em mulheres grávidas e noutros adultos (homens e mulheres não grávidas).

Nas grávidas podem ocorrer infecções das vias urinárias durante e imediatamente após a gravidez sendo de excelente prognóstico quando se realiza o tratamento apropriado (Murray et al 2000) e raramente cursam com complicações secundárias.

A infecção nos homens e mulheres não grávidas verifica-se em indivíduos com mais idade do que as grávidas e que normalmente apresentam um estado de debilidade maior, factores que conduzem a uma taxa de mortalidade mais elevada neste grupo de pacientes (entre 15 e 32%) (Murray et al 2000).

3.1 - Rastreio materno

Os guias dos Centros de Controlo de Infecção e Prevenção especificam a necessidade de se rastrearem todas as grávidas entre as 35 e as 37 semanas de gestação colhendo amostras vaginais e rectais, com excepção daquelas que apresentem bacteriúria por SGB já documentada e as que previamente tiveram crianças com doença invasiva por SGB (Edwards e Baker 2005).

A detecção intra-parto de colonização por SGB deveria permitir a adequada identificação das pacientes em risco que poderiam beneficiar de tratamento empírico ou de quimioprofilaxia, devendo para isso recorrer-se ao método/técnica adequada para a detecção deste microrganismo (Edwards e Baker 2005).

3.2 – Quimioprofilaxia

A quimioprofilaxi, teoricamente, deve ser dada a mulheres grávidas antes ou durante o parto, ou a recém-nascidos no parto (Edwards e Baker 2005, Carrapato e Caldeira 2008). No entanto, a profilaxia antes do parto nem sempre permite alcançar os objectivos pretendidos, uma vez que a terapia antimicrobiana oral durante a gravidez poder falhar na eliminação completa da colonização por SGB (Carrapato e Caldeira 2008).

Em contraste, a interrupção da transmissão vertical por mães com SGB no parto pode conseguir-se apenas com a administração intravenosa de penicilina G ou ampicilina durante o trabalho de parto (Edwards e Baker 2005).

A selecção de mulheres para quimioprofilaxia pode ser determinada quer por culturas de rastreio entre as 35 e as 37 semanas de gestação quer pelo reconhecimento de um ou mais factores conhecidos com potencial para desencadearem a infecção de início precoce sem culturas de rastreio (Edwards e Baker 2005, Carrapato e Caldeira 2008).

Quando não se conhece o estado da cultura está indicada a profilaxia ao existir um risco significante de parto pré-termo, ruptura de membranas por 18 horas ou mais, quando a grávida apresentar febre durante o parto (Edwards e Baker 2005, Murray et al 2000, Carrapato e Caldeira 2008) ou quando anteriormente tenha dado à luz um lactente que tenha sofrido de doença invasiva por este agente infeccioso (Murray et al 2000, Carrapato e Caldeira 2008).

A profilaxia não se recomenda em cesarianas programadas independentemente de se conhecer ou não o estado de colonização por SGB.

Tabela 1 - Indicações para profilaxia antibiótica intra-parto (adaptado de Ayres de Campos, Montenegro e Rodrigues 2008)

Indicações para profilaxia antibiótica intra-parto	
Indicação da profilaxia intra-parto	**Profilaxia não indicada**
Anteriormente dar à luz criança com doença invasiva por SGB	Gravidez anterior com rastreio para SGB positivo (excepto se a cultura também for positiva na gravidez actual)
Bacteriúria por SGB na actual gravidez	Cesariana electiva realizada antes do início do trabalho de parto ou de ruptura de membranas (independentemente do resultado da cultura para SGB materna)
Cultura positiva para SGB durante a gravidez (excepto se cesariana electiva, na ausência de trabalho de parto ou ruptura de membranas) Estado desconhecido perante SGB (cultura não realizada, incompleta ou resultados desconhecidos) acompanhados de: -parto antes das 37 semanas de gestação; - ruptura de membranas ≥ 12 horas; -febre intra-parto (≥ 38ºC).	Rastreio vaginal e rectal negativo para SGB durante a gravidez, excepto se existirem factores de risco intra-parto

Na terapêutica, apenas a via endovenosa é aceitável pelas maiores concentrações intra-amnióticas. A profilaxia deve iniciar-se no momento da admissão por trabalho de parto ou ruptura prematura de membranas e termina no momento do parto (laqueação do cordão) (Ayres de Campos, Montenegro e Rodrigues 2008).

Se houver suspeita de amniotite, o tratamento com antibiótico de largo espectro, que englobe o SGB, deverá substituir a profilaxia.

Apesar de amplamente instituído, o recurso a quimioprofilaxia pode apresentar desvantagens. De acordo com Honest e colaboradores, a instituição de uma profilaxia antibiótica pode conduzir a potenciais anafilaxias fatais da mãe ou da criança, à medicalização do parto e do período neonatal e a infecções provocadas por organismos resistentes. Uma vez que a quimioprofilaxia pode ser pouco precisa, estes autores consideram que, no Reino Unido, as estratégias de triagem para esta prática podem ser controversas.

4 - Justificação do Estudo

Em 1996, os Centros de Prevenção e Controlo de Doenças (CDCP), apoiados pelo Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas e pela Academia Americana de Pediatria, criaram as linhas orientadoras (guidelines) para a prevenção de sépsis estreptocócica de início precoce (Stan et al 2001,Borger et al 2005), tendo sido então adoptadas duas estratégias com base na cultura de rastreio pré-natal e nos factores de risco associados a eventual infecção por SGB (temperatura ≥ a 38ºC, parto antes das 37 semanas de gestação, ruptura de membranas superior a 18 horas, bacteriúria por SGB durante a gravidez e grávida que tenha causado sépsis estreptocócica na criança após o nascimento) (Stan et al 2001, Borger et al 2005).

Em 2002, uma actualização deste guia enfatiza a maior eficácia do protocolo baseado na pesquisa da colonização pelo SGB relativamente ao protocolo baseado nos factores de risco (CDCP 2002, Borger et al 2005,Martins et al 2007).

Assim, é aconselhado o rastreio universal das grávidas às 35-37 semanas de gestação reservando-se a estratégia com base nos factores de risco para as mulheres que não apresentem resultado de cultura pré-natal (Zusman et al 2006, Ayres de Campos, Montenegro e Rodrigues 2008).

No Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, E.P.E. (CHEDV), o Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, segue as recomendações da CDCP, assumindo que a infecção neonatal por SGB é uma causa importante de morbilidade e mortalidade perinatal que convém evitar.

Assim, neste Centro Hospitalar, são considerados factores de risco para a infecção a colonização da vagina/recto da grávida, febre intra-parto, ruptura de membranas prolongada, parto pré-termo e grávida com idade inferior a 20 anos. Considera-se também que o risco é máximo para os recém-nascidos de grávidas com filho anterior com infecção por SGB e a profilaxia antibiótica intra-parto é feita com base no resultado da cultura recto-vaginal para a pesquisa do SBG.

O conhecimento epidemiológico do *Streptococcus agalactiae* em Portugal é limitado (Florindo et al 2009) sendo, por isso importante realizar estudos que nos permitam ampliar conhecimento nesta área.

Para além deste factor, torna-se importante dar informação ao clínico relativamente à colonização da grávida por SGB e em caso de positividade informar sobre o perfil de susceptibilidade do microrganismo aos antibióticos de escolha para o agente infeccioso. Deste modo, no momento da decisão sobre a necessidade da profilaxia está disponível a informação para a adequação do tratamento.

5 - Objectivos

Constituem objectivos específicos desta investigação:

I. Estudar a prevalência de SGB em grávidas do CHEDV, com recurso a amostras provenientes quer da Consulta, quer do Internamento ou mesmo da Urgência de Obstetrícia deste Centro Hospitalar;

II. Estudar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, de acordo com as orientações da CLSI mas com adequação à realidade do CHEDV;

III. Verificar possíveis alterações nos padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos usados;

IV. Fornecer ao clínico informação sobre antibióticos alternativos ao tratamento no caso de serem identificadas resistências;

V. Encontrar eventuais relações entre variáveis.

6 - Material e métodos

6.1 - Amostra populacional

A amostra populacional deste estudo corresponde ao número de rastreios de SGB pedidos pelo Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do CHEDV (através da Consulta Externa, do Internamento e/ou da Urgência) a mulheres grávidas durante o período de tempo compreendido entre 1 de Dezembro de 2009 e 31 de Março de 2010, inclusive, e que deram entrada no Serviço de Patologia Clínica do referido Centro Hospitalar. Foram realizados, neste período, 533 rastreios que foram incluídos no estudo.

As amostras colhidas preferencialmente às grávidas entre as 35 e 37 semanas de gestação deverão ser de exsudado vaginal e rectal: uma zaragatoa do terço inferior da vagina e uma zaragatoa da ampola rectal). Não se recomendam culturas cervicais e não deverá ser utilizado espéculo (Ayres de Campos, Montenegro e Rodrigues 2008)

As amostras colhidas às pacientes pelo clínico chegaram ao laboratório em meio enriquecido selectivo (Todd-Hewitt) no dia da colheita tendo sido processadas de acordo com os procedimentos de microbiologia descritos para o efeito no Serviço.

Os dados foram utilizados com autorização da Comissão de Ética e do Conselho de Administração do CHEDV de forma a garantir a protecção e a confidencialidade das informações recolhidas e trabalhados estatisticamente com recurso à versão 17.0 do programa Stastistical Package for the Social Sciences (SPSS) para Windows. Para os testes de Qui-quadrado realizados, os valores de $p<0,05$ (nível de significância 5%) foram considerados significativos.

6.2 - Amostra laboratorial

Das 533 amostras que chegaram ao laboratório para rastreio, 105 apresentaram resultado positivo tendo sido determinado o perfil de susceptibilidade do microrganismo aos antimicrobianos (penicilina, eritromicina e clindamicina).

6.3 - Processamento das Amostras

As amostras colhidas pelo clínico, zaragatoa(s) vaginal e/ou rectal, são inoculadas imediatamente após a colheita em meio de Todd-Hewitt (referência 42 116 da bioMérieux®) e enviadas ao laboratório.

Aqui, após o registo informático, são incubados na estufa de 37ºC durante 18-24 horas período após o qual é realizada a repicagem para BD Group B Streptococcus Diferential Agar (Granada Medium) que incuba em anaerobiose 18-24 horas a 37ºC.

Se após as 24 horas de incubação não forem visíveis colónias laranja no meio, a placa incuba por mais 24 horas e se continuar sem colónias laranja o resultado é reportado como negativo.

Por outro lado, se se verificar o aparecimento de uma ou mais colónias laranja na placa procede-se ao isolamento (normalmente para GS) de uma colónia para se proceder à identificação e ao antibiograma da estirpe encontrada.

O esquema de processamento da amostra laboratorialmente está descrito no fluxograma da figura 8.

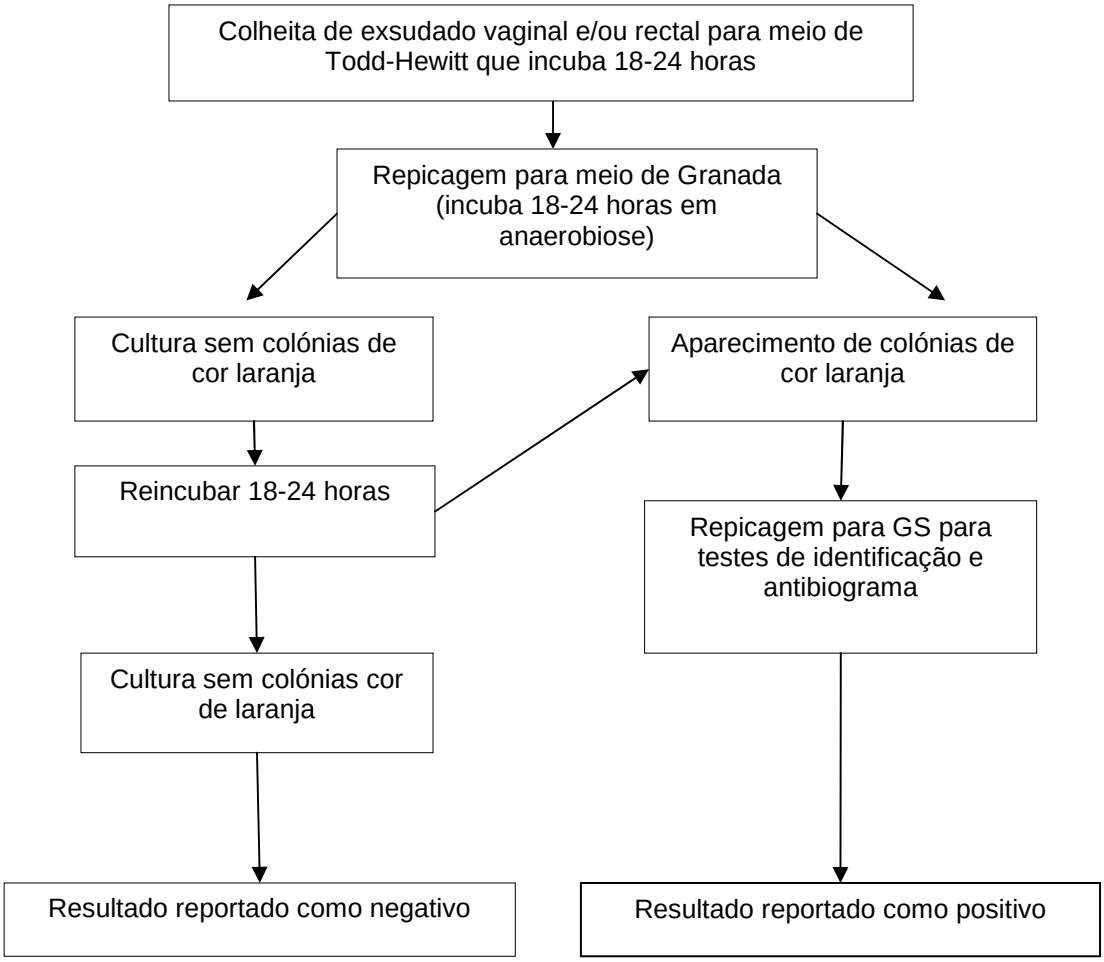

Figura 8 – Fluxograma de processamento das amostras

6.4 - Testes realizados

A técnica de referência para o isolamento de colónias de SGB em amostras provenientes do tracto genital feminino corresponde à utilização de GS ou outra gelose de sangue selectiva para a determinação da β-hemólise característica, etapa à qual se deverá seguir a identificação bioquímica ou serológica.

Alguns autores referem que a presença de um número reduzido de SGB na flora vaginal também pode constituir risco de infecção para o recém-nascido (Ruoff et al 2003) e recomendam técnicas com recurso a meios de enriquecimento.

Assim, aconselha-se a colheita da amostra vaginal e/ou rectal para meio enriquecido e, após um período de incubação, a repicagem para meio de Granada, que permite o desenvolvimento de colónias com coloração alaranjada que, independentemente do número deverão ser valorizadas e repicadas então para GS.

Deverá repicar-se uma das colónias de tonalidade alaranjada para este meio para que se possa observar a hemólise característica dos SGB e só a partir daqui realizar os testes com vista à confirmação da identificação que até este momento é presumptiva: teste da catalase e teste de aglutinação para a classificação serológica de Lancefield.

- Prova da catalase (Anexo 1)

A presença da catalase nas bactérias é detectada através da libertação de oxigénio resultante da degradação do peróxido de hidrogénio, traduzido na seguinte reacção:

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

Como já foi referido anteriormente, os SGB apresentam o teste da catalase negativo.

- Aglutinação para classificação serológica de Lancefield (Anexo 2)

O método de referência para a identificação serológica é a extracção de Lancefield que, pela sua dificuldade técnica está actualmente substituída por métodos disponíveis comercialmente (PNCI 2004).

Os estreptococos β-hemolíticos possuem frequentemente antigénios específicos que podem ser extraídos e identificados recorrendo ao uso de anti-soros específicos disponíveis comercialmente.

Os reagentes são constituídos por partículas de látex sensibilizadas com anticorpos dirigidos contra os antigénios específicos de cada grupo. Quando estão presentes os antigénios verifica-se uma aglutinação visível das partículas de látex.

O SLIDEX® Strepto Plus B (referência 58 819 da BioMérieux®) é um teste de aglutinação de partículas de látex para o agrupamento dos estreptococos B segundo a classificação de Lancefield.

Figura 9 – Teste de aglutinação para estreptococos (resultado positivo para SGB)

- Antibiogramas (Anexo 3)

O PNCI recomenda o recurso a testes de susceptibilidade aos antimicrobianos para qualquer microrganismo que seja responsável por um processo infeccioso e que necessite de terapêutica antimicrobiana, sempre que a susceptibilidade não poder ser previsível pelo conhecimento da identidade do microrganismo.

No caso em que a infecção seja provocada por um microrganismo cuja susceptibilidade a determinado antimicrobiano seja devidamente reconhecida e o doente seja alérgico a esse antimicrobiano devem testar-se outros fármacos.

Assim, ainda que seja previsível que o SGB seja susceptível à penicilina, para preservar eventuais alergias a este fármaco, deverão seguir-se as orientações da CLSI e proceder-se ao estudo da susceptibilidade à eritromicina e clindamicina (antibióticos de segunda linha para infecções causadas por SGB).

São vários os tipos de testes de susceptibilidade disponíveis e podem classificar-se em dois grandes grupos (PNCI 2004): testes de diluição e testes de difusão. Há uma variante a estes dois grupos denominada Teste de Gradiente de Difusão (E teste®) que combina o princípio dos dois métodos referidos anteriormente: a preparação do inóculo é igual à dos métodos de difusão mas as tiras utilizadas estão impregnadas com concentrações seriadas do antimicrobiano.

Os testes de diluição usam-se para medir quantitativamente a actividade de um antimicrobiano numa estirpe bacteriana "in vitro" e continuam a ser os métodos de referência.

Os testes de difusão utilizam uma suspensão bacteriana padronizada que é semeada em meio sólido apropriado e sobre a qual se dispõem discos de antimicrobiano impregnados com uma concentração conhecida. O halo é, após a incubação adequada, medido e o resultado traduzido em sensível, intermédio e resistente segundo o guia de interpretação da CLSI.

O método de difusão em agar é um dos mais usados na rotina laboratorial de microbiologia e o que é recomendado pelo CLSI baseia-se no método originalmente descrito por Bauer e colaboradores em 1966. É um método simples mas controlado que permite obter um resultado qualitativo que se baseia na relação dos "breakpoints" das concentrações mínimas inibitórias (CMI) com os níveis terapêuticos dos antimicrobianos.

As tabelas de consenso da CLSI são actualizadas anualmente e reflectem um processo contínuo de melhoria de procedimentos, métodos e protocolos e serve de orientação para a selecção dos antimicrobianos a testar por microrganismo pois inclui agentes comprovadamente eficazes para o tratamento das infecções e pode ser uma indicação dos antimicrobianos a testar.

Para o antibiograma do SGB, segundo a CLSI, deve realizar-se um teste de difusão em MHS com um inóculo de bactérias equivalente a um padrão de 0,5 na escala de McFarland e a placa deverá ser incubada a 35±2ºC com 5% de CO_2 durante 24 horas.

Utilizam-se discos de Penicilina 10U, Eritromicina 15µg e Clindamicina 2µg; estes dois últimos discos devem estar distanciados 15-26mm de modo a estudar-se a resistência indutível da clindamicina.
A leitura e a interpretação do antibiograma são feitas com base nas linhas orientadoras disponíveis pela CLSI em 2010 estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Interpretação do antibiograma

Antimicrobiano	Interpretação	Halo (mm)
Penicilina 10U	Sensível	≥ 24
Eritromicina 15µg	Sensível Intermédio Resistente	≥21 16-20 ≤15
Clindamicina 2µg	Sensível Intermédio Resistente	≥19 16-18 ≤15

O microrganismo é considerado sensível quando responde à terapêutica com o antimicrobiano utilizando a dosagem recomendada para o tipo de infecção e espécie bacteriana. Por outro lado, é considerado resistente quando é improvável obter uma boa resposta terapêutica às concentrações de antimicrobiano atingidas com as dosagens utilizadas e/ou está presente um mecanismo específico de resistência.

Nas situações em que a concentração inibitória mínima do antimicrobiano para o microrganismo é próxima do valor que pode atingir no sangue ou tecidos e para qual a resposta clínica é inferior à de uma estirpe sensível, o microrganismo é descrito como intermédio. Esta situação implica a utilização do antimicrobiano em locais onde a droga é concentrada ou a utilização de doses mais elevadas.

Apesar da informação actualmente disponível, a interpretação dos testes de sensibilidade a antimicrobianos pressupõe um vasto conhecimento sobre os antimicrobianos da estrutura química, modo de acção, farmacocinética, farmacodinâmica, mecanismos de resistência e respectivos fenótipos, resistência intrínseca e correlação dos resultados “in vitro” com a resposta clínica à terapêutica.

6.5 - Meios de Cultura

Foram utilizados meios de cultura prontos a usar disponíveis no mercado e de acordo com as indicações de uso do fornecedor.

- Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (TODD H-T)

Caldo de enriquecimento selectivo destinado à detecção dos estreptococos do grupo B na mulher grávida. A sua composição favorece o crescimento da estirpe a estudar (SGB) no seio de uma flora polimicrobiana uma vez que os antibióticos presentes no meio (ácido nalidíxico e colistina) promovem a inibição da maioria dos microrganismos de Gram negativo da flora de acompanhamento. Este caldo deverá ser repicado para meio adequado à detecção dos SGB logo após a etapa de enriquecimento. A repicagem foi realizada após 18-24 horas de incubação em estufa de 37ºC para meio de Granada.

Figura 10 - Caldo de Todd-Hewitt utilizado

- BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

Gelose diferencial para SGB utilizada para isolamento e identificação de SGB em amostras clínicas. A placa deverá incubar anaerobicamente durante 18-24 horas a

35±2ºC. Após a incubação as estirpes β-hemolíticas de SGB produzem colónias de pequena a média dimensão de cor de laranja claro a laranja intenso ou de cor de laranja-salmão que podem ou não apresentar margens incolores. Qualquer intensidade de pigmentação laranja deverá ser considerada positiva. Após as 24 horas de incubação anaeróbia, caso não sejam visíveis colónias com o aspecto anteriormente descrito, a placa deverá reincubar por mais 18-24 horas.

Figura 11 - Aspecto de estreptococos do grupo B em BD Group B Streptococcus Differential Agar (Meio de Granada).

- Gelose de Sangue (COS)

Meio enriquecido com uma mistura de peptonas e 0.5% de sangue de carneiro que permite visualizar a hemólise característica do SGB. Utiliza-se para isolar a estirpe em estudo para que se possa proceder à realização de testes complementares de identificação e à realização de testes de susceptibilidade.

- Gelose Mueller Hinton 2 + 5% de sangue de carneiro (MHS)

Meio destinado a antibiogramas por difusão para as estirpes que necessitam de sangue para o seu crescimento. A sua composição permite o crescimento das estirpes garantindo um mínimo de interferência dos componentes da sua fórmula no resultado do antibiograma. O baixo teor em elementos inibidores da actividade das sulfamidas diminui os fenómenos de crescimento à volta dos discos permitindo uma melhor determinação dos diâmetros de inibição.

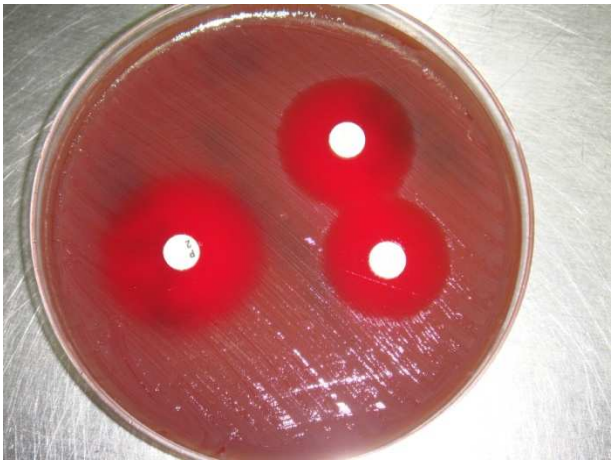

Figura 12 - Antibiograma de estreptococos do grupo B em Muller Hinton com Sangue

7 - Resultados e Discussão

A detecção da colonização por *S.agalactiae* em mulheres grávidas é importante devido às complicações ginecológicas/obstétricas que podem ser provocadas por este microrganismo. É frequente a colonização da vagina por SGB a partir do recto e é desta zona que a bactéria migra ascendentemente até ao cérvix onde, por alteração do muco cervical, pode potenciar a infecção e conduzir a uma ruptura prematura de membranas e consequente início prematuro do parto.

O SGB foi pesquisado em amostras vaginais e/rectais com a seguinte distribuição:

Tabela 3 – Frequência de amostras

Amostra	Frequência	Percentagem (%)
Vaginal-rectal	529	99,2
Vaginal	3	0,6
Rectal	1	0,2

O CHEDV, criado em 1 de Fevereiro de 2009, engloba 3 unidades hospitalares: Unidade de Santa Maria da Feira (Hospital de S. Sebastião), Hospital de Oliveira de Azeméis (Hospital de S. Miguel) e Hospital de S. João da Madeira.

No gráfico 1 é possível observar como se distribuem as amostras de acordo com a unidade hospitalar de proveniência: 87,6% das amostras (467) são provenientes da Unidade de Santa Maria da Feira, onde se realizam a maioria das consultas e onde estão instalados o internamento e a urgência de Obstetrícia. As restantes amostras foram colhidas na Unidade de Oliveira de Azeméis (12% que correspondem a 64 amostras) e na Unidade de S. João da Madeira (0,4% que correspondem a 2 amostras).

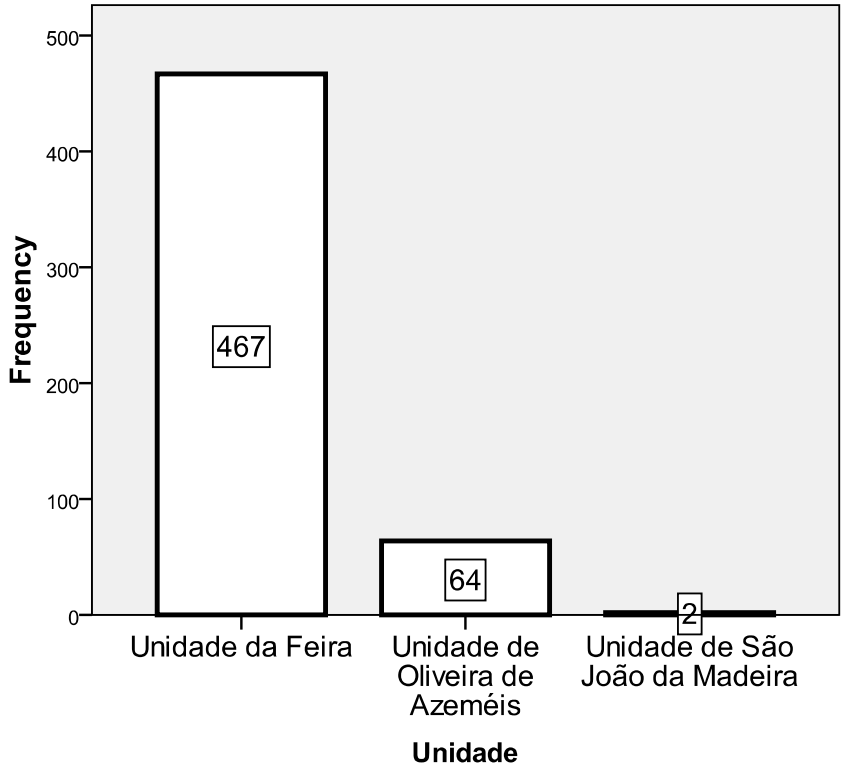

Gráfico 1 – Proveniência das amostras

O principal objectivo deste trabalho correspondeu ao estudo da prevalência de SGB em grávidas a quem foi feita pesquisa do referido agente no Laboratório de Patologia Clínica do CHEDV.

No CHEDV não existem dados disponíveis que permitam fazer comparações relativamente à administração de quimioprofilácticos e à diminuição de doença nos recém-nascidos.

Durante o período entre 1 de Dezembro de 2009 e 31 de Março de 2010, foram feitas no serviço de Patologia Clínica do referido centro hospitalar 533 pesquisas de SGB.

Obtiveram-se 105 amostras positivas, que correspondem a uma taxa de prevalência de 19,7%, como podemos ver no gráfico:

Gráfico 2 – Distribuição dos rastreios positivos e negativos

Maisey e colaboradores, num estudo publicado em 2009, referem que 25% dos adultos saudáveis são portadores de SGB. Dada a relevância clínica deste microrganismo no desenvolvimento de doenças graves nos recém-nascidos, torna-se imprescindível a sua pesquisa nas grávidas de modo a decidir a aplicação ou não de medidas de quimioprofilaxia durante o parto.

Desde 2002, ano em que a CDCP considerou imprescindível o rastreio de todas as grávidas entre as 35-37 semanas de gestação, que no CHEDV se procede a esta pesquisa. No nosso país não existem publicados dados relativos às taxas de rastreio antes e depois das recomendações da CDCP em 2002, mas um estudo realizado por Van Dyke e colaboradores em 2009, nos Estados Unidos da América, permitiu a comparação da taxa de rastreio do SGB nas grávidas. Neste estudo verificou-se um aumento de 48,1% de grávidas rastreadas em 1998-1999 para 85,0% em 2003-2004.

Neste mesmo estudo de 2009, verificou-se que a quimioprofilaxia foi administrada a 87,0% das mulheres com resultado positivo para SGB (e cujo parto foi de termo) e apenas a 63,4% das mulheres cuja colonização pelo SGB não era conhecida no momento do parto. Estes dados conduziram a um declínio na incidência de doença de início precoce no recém-nascido que é um dos principais objectivos da aplicação desta medida de prevenção e que justifica a sua aplicação em todos os Serviços de Obstetrícia.

Os estudos de prevalência mostram taxas de colonização variáveis de acordo com a população estudada, a sua localização geográfica, a região anatómica onde é feita a pesquisa - vaginal e/ou rectal - e meio de cultura utilizado - selectivo e não selectivo. (Diaz e Nieves 2008).

Alguns autores assinalam que a colonização por este microrganismo é menos frequente em mulheres de países em vias de desenvolvimento (Diaz e Nieves 2008). A prevalência não é constante nas diferentes regiões geográficas, havendo contudo estudos que demonstram que factores sociais (nível de educação, estado civil e número de parceiros sexuais, por exemplo) e demográficos (idade) não têm significado associado à colonização por SGB (Joachim et al 2009).

Church e colaboradores, num estudo de 2008, referem taxas de prevalência entre 10% e 40% nos países desenvolvidos e um estudo europeu realizado entre 1996 e 2006, revelou taxas de prevalência variáveis entre os 6,5% e os 36% (Lo 2009). Este intervalo varia entre os diferentes países: 6,6% na Grécia, 16% na Alemanha, 17,2-20% na Polónia (Strus et al 2008), 29,3% na República Checa (Motlová et al 2004), 24% na Bélgica (El Aila et al 2009). Em Portugal, a taxa de prevalência obtida por Simões e colaboradores em 2007 foi de 14,6%.

Noutros continentes as taxas de prevalência conhecidas não são muito diferentes das europeias, mas destaca-se a baixa prevalência obtida em estudos argentinos: 3,2% (El Aila et al 2009), que contrasta com a elevada prevalência na Venezuela, divulgada por Diaz e Nieves num estudo de 2008: 36,7%. Esta elevada taxa poderá dever-se ao não cumprimento das indicações da CDCP, ao limitado acesso a cuidados de saúde que poderão verificar-se neste país ou mesmo à realização de estudos de prevalência limitados a certas regiões do país.

Em 2004, nos Estados Unidos da América, a taxa de prevalência conhecida rondava os 18,6% (Honest et al 2006). Na Tanzânia os valores rondam os 23% (Joachim et al 2009) e em Hong Kong os 10,4% (Tsui et al 2009).

No Brasil são vários os estudos publicados sobre este tema e Marconi e colaboradores em 2010 obteve taxas de 25,4%, valor mais baixo do que o obtido no ano anterior por Nomura e colaboradores (27,6%). Dados curiosos relacionam-se com as taxas obtidas

em 2005 e 2006: 19,2% e 17,6%, respectivamente (Borger et al 2005, Zusman et al 2006), que sendo mais baixas do que no estudo de 2010, contrariam as tendências globais para a diminuição das prevalências após a aplicação das orientações da CDCP.

Este aumento poderá, no entanto não ser real, pois os estudos poderão estar limitados a regiões onde a prevalência na população estudada poderá ser menor ou mesmo ao tipo de amostras estudadas. No estudo de 2006, a prevalência obtida não inclui amostras rectais, por exemplo.

No nosso estudo, obteve-se uma média de idades de 29,78 ± 5,661 anos. Nas amostras cujo resultado foi positivo, a média de idades é ligeiramente superior (30,52 ± 6,073). No entanto, estatisticamente, e depois de aplicado o teste do Qui-quadrado, esta variação não traduz qualquer relação de dependência entre a idade e o resultado do rastreio (obteve-se um p=0,256), como se pode observar na tabela.

Tabela 4 - Média de Idade da amostra de acordo com resultado

Idade Resultado	Média (anos)	Frequência (n)	Desvio-padrão	Valores estatísticos
Negativo	29,60	428	5,547	
				P=0,256
Positivo	30,52	105	6,073	X^2=32,469
Total	29,78	533	5,661	

Relativamente à idade, embora estudos mais antigos referissem uma prevalência maior em mulheres mais novas (Joachim et al 2009), a média de idades que obtivemos é semelhante à obtida noutros estudos (Joachim et al 2009, Simões et al 2007). Destaca-se o facto de se verificar uma média de idades mais baixa (15-19 anos) num estudo brasileiro (Borger et al 2005) e uma média mais elevada (30-34 anos) num estudo realizado na Tanzânia (Nomura et al 2009), o que poderá uma vez mais reflectir as diferenças de nível sócio-económico existentes entre países.

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras positivas foi realizado de acordo com a resposta que o Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia do CHEDV deve dar ao Serviço de Obstetrícia do mesmo centro hospitalar. Não pareceu de todo adequado testar todos os antimicrobianos recomendados pela CLSI quando no

serviço de Obstetrícia o interesse está voltado apenas para a penicilina, a eritromicina e a clindamicina, uma vez que é com base nestes agentes que é feita a quimiprofilaxia.

No Serviço de Ginecologia/Obstetrícia do CHEDV o antimicrobiano de primeira escolha é a penicilina. No entanto, sempre que haja referência a eventual alergia a este fármaco, a escolha recai sobre a clindamicina pelas concentrações que se conseguem obter no recém-nascido. Este antimicrobiano para além de atravessar a barreira placentária é excretado no leite materno permitindo a obtenção de concentrações mais eficientes para a protecção do recém-nascido. Com base nestes dados, no Serviço de Ginecologia/Obstetrícia, o recurso à eritromicina está em desuso. No entanto, o estudo da sua susceptibilidade torna-se importante ao nível dos fenótipos de resistência aos macrólidos (resistência induzida à clindamicina).

O nosso estudo coincidiu com o início do teste da clindamicina no Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica, o que se tornou uma mais-valia para o Serviço. A implementação de novas técnicas e metodologias num Serviço, para além de permitir a evolução dos colaboradores e o seu enriquecimento ao nível profissional, mostra que um serviço apesar da sua independência relativamente aos outros deverá trabalhar em conjunto com eles e adequar os seus testes às evoluções técnicas e científicas em prol da população servida.

Neste sentido, os resultados obtidos foram disponibilizados no processo de cada paciente para que, de acordo com o protocolo de prevenção de infecção por SGB do Serviço de Obstetrícia, fossem tomadas as medidas adequadas ao nível da profilaxia. A interpretação do antibiograma foi feita de acordo com as linhas orientadoras da CLSI de 2010.

Relativamente à penicilina, o antibiótico de primeira linha no combate a infecções por SGB, todas as amostras mostraram ser sensíveis a concentrações de antibiótico de 10U, o que mais uma vez comprova a sua elevada eficácia e reforça os resultados obtidos noutros estudos nos quais também não aparecem casos descritos de resistência (Hannoun et al 2009). No entanto, como é de conhecimento geral, existem casos de alergia a este fármaco (entre 10 e 20% dos indivíduos hospitalizados referem alergia à penicilina; no entanto, apenas 3% desenvolvem reacção se submetidos a testes com o fármaco, de acordo com dados de um estudo de Rosario e Grumach de 2006), o que

inviabiliza o teste apenas deste antibiótico e reforça a necessidade de se testarem alternativas.

No que se refere aos outros antimicrobianos estudados, a eritromicina e a clindamicina, no nosso estudo obteve-se uma resistência de 22,9% para ambos.

Embora nas tabelas da CLSI devam ser considerados resultados resistentes, intermédios e sensíveis, apenas na eritromicina conseguimos obter dados para as três categorias. Na clindamicina apenas obtivemos resultados resistentes e sensíveis.

Clinicamente, considera-se que um resultado intermédio a determinado antibiótico deverá ser tratado como resistente e a terapêutica instituída deverá ter em conta esta consideração. Este facto leva-nos a considerar que a resistência à eritromicina é de 22,9% e não de 21% (pois neste valor devemos incluir também a percentagem de resultados intermédios).

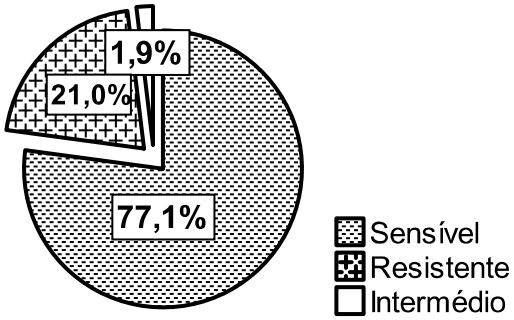

Gráfico 3 - Sensibilidade Vs Resistência da Eritromicina

As taxas de resistência à eritromicina têm variado ao longo dos tempos. Azavedo e colaboradores, em 2001, referem taxas de resistência de 18%. Em 2005, Marimón e colaboradores descreveram taxas variáveis entre 10% e 20% e no mesmo ano Al-Sweih e colaboradores referem uma taxa de 0,7%; taxa muito baixa comparada com a de um estudo brasileiro que apresentou uma resistência de 9,4%, que já era bastante inferior à conhecida nos Estados Unidos (30%), França (21,4%) e na Turquia (20%) (Borger et al 2005).

Em Portugal, em 2004, a taxa de resistência era de 10,7% (Figueira-Coelho et al 2004). No entanto, num estudo publicado em 2009 por Pinheiro e colaboradores, obteve-se uma taxa de resistência de 15% e no mesmo ano um outro estudo português (realizado por Florindo e colaboradores) refere taxas de resistência de 19%, o que pode traduzir um aumento do recurso a este agente antimicrobiano e o consequente aumento de resistências na nossa população.

A taxa de resistência à eritromicina no CHEDV obtida entre 1 de Janeiro e 31 de Dezembro de 2009 foi de 26%. Relativamente à clindamicina não estão disponíveis dados por só se começar a testar este antimicrobiano no mês de Dezembro do referido ano.

No CHEDV, o recurso à eritromicina como antibiótico de segunda escolha está a cair em desuso. Desde 1 de Dezembro de 2009 (data de início do nosso estudo) passou a incluir-se a clindamicina no teste de sensibilidade aos antimicrobianos, e a disponibilizar-se para o clínico a informação relativa à resistência ou susceptibilidade do microrganismo a este fármaco.

De acordo com as linhas orientadoras ao nível da Neonatologia e Pediatria há recomendação para o uso da clindamicina em detrimento da eritromicina, uma vez que o primeiro atravessa mais prontamente e de uma forma mais consistente a barreira placentária permitindo concentrações de fármaco mais elevadas no bebé (Aracil et al 2002, Al Sweih et al 2005) e consequentemente a sua melhor protecção perante uma eventual infecção. Como foi referido anteriormente, estes dados não inviabilizam o estudo da susceptibilidade a este fármaco uma vez que se torna necessário o seu estudo para a determinação dos fenótipos de resistência aos macrólidos.

Esta prática pode ser a explicação para a diminuição da taxa de resistência à eritromicina na Argentina entre 2000 (5,2%) e 2007 (2,4%), como descrevem Mollerach e colaboradores, num estudo de 2007, no qual consideram a modificação dos esquemas terapêuticos com diminuição do recurso a macrólidos nos tratamentos um factor relevante para as variações das taxas de resistência.

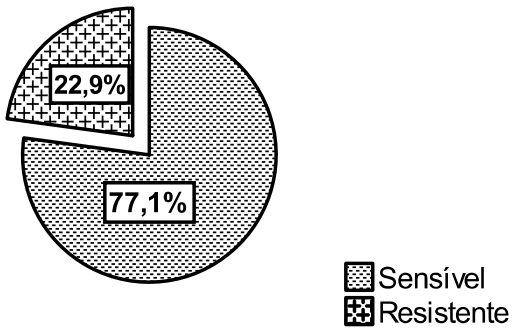

Gráfico 4 - Sensibilidade Vs Resistência da Clindamicina

As taxas de resistência relativas à clindamicina obtidas em estudos anteriores também têm variado ao longo dos tempos: em 2001 estavam descritas taxas de 8% (Azavedo et al 2001) e em 2005, Borger e colaboradores obtêm no seu estudo uma taxa de 6,2% que mais uma vez foi mais baixa do que a conhecida noutros países como a França (17,5%) e os Estados Unidos da América (11,4%) (Borger et al 2005) valores que novamente foram muito superiores aos obtidos por Al-Sweih no Kwait (1,7%). No estudo destes autores, há uma outra particularidade; a taxa de resistência da eritromicina é mais baixa do que a da clindamicina (Al-Sweih et al 2005).

Em Portugal, as taxas de resistência em 2004 eram de 9,9% (Figueira-Coelho et al 2004) e em 2009 de 9,6% (Pinheiro et al 2009), resultado semelhante ao obtido por Florindo e colaboradores também em 2009. No nosso estudo a taxa obtida foi de 22,9%.

As elevadas taxas de resistência da população estudada aos antibióticos referidos pode traduzir o recurso exagerado de fármacos de segunda linha em detrimento do fármaco de excelência, a penicilina, o que pode reflectir a importância de se conhecer a existência de alergia ou não à penicilina no momento da decisão sobre o esquema quimioprofiláctico.

Relativamente ao facto da população estudada apresentar a taxa de resistência à clindamicina superior à da eritromicina (ao contrário do que acontece na maioria dos outros estudos analisados) pode pensar-se que na população servida pelo CHEDV o recurso à clindamicina possa ser já mais frequente do que o recurso à eritromicina.

Aplicando o teste de Qui-quadrado para tentar encontrar dependência entre as variáveis estatísticas Idade das pacientes e Antibiótico utilizado, foram obtidos os valores de *p*=0,431 e *p*=0,436 para a eritromicina e clindamicina respectivamente, que permitem concluir que a idade e os antibióticos não têm relação de dependência entre si.

O recurso ao D-teste (ou teste de duplo disco) nos antibiogramas das amostras positivas permitiu identificar diferentes fenótipos de resistência, nomeadamente o fenótipo M (2,9%) e o fenótipo MLS_B (20%). O fenótipo M considera-se quando a bactéria é sensível à clindamicina e apresenta resistência à eritromicina e o fenótipo MLS_B considera-se quando há resistência tanto à eritromicina como à clindamicina (resistência constitutiva) ou quando há resistência à eritromicina com diminuição do halo da clindamicina na zona proximal ao disco da eritromicina (resistência induzida). Nos casos de resistência induzida o D-teste foi considerado positivo.

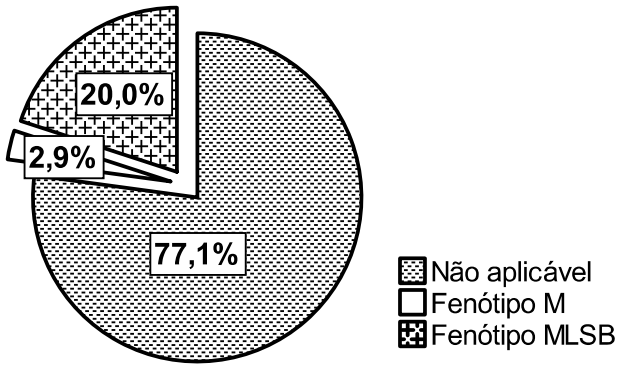

Gráfico 5 - Fenótipos de resistência

O fenótipo MLS_B de resistência induzida obteve-se em 5 das 105 amostras positivas estudadas (4,8%) e o fenótipo MLS_B de resistência constitutiva obteve-se em 16 (15,2%). O fenótipo M obteve-se em 3 das 105 amostras (2,9%).

Borger, em 2005, obteve 3,3% de amostras positivas com fenótipo MLS_B de resistência induzida e 1,1% de amostras com fenótipos M e MLS_B de resistência constitutiva. Resultados bastante diferentes dos obtidos no nosso estudo talvez por ter uma amostra mais reduzida (Borger estudou apenas 167 grávidas).

Em Portugal em 2009, as percentagens obtidas por Pinheiro e colaboradores referem 2,2% de amostras com fenótipo M, 3,2% de fenótipo MLS_B de resistência induzida e 9,7% de amostras com fenótipo MLS_B de resistência constitutiva.

Os valores referidos no estudo de 2009 realizado por Pinheiro e colaboradores estão relativamente próximos dos obtidos no presente trabalho, o que pode traduzir percentagens de fenótipos semelhantes ainda que perante taxas de resistência diferentes. Esta distribuição poderá traduzir a tendência de fenótipos na população portuguesa, uma vez que os estudos comparados realizados no mesmo país, envolvem características populacionais distintas.

8 - Conclusão

O investimento na medicina preventiva é sempre uma mais-valia na saúde. A implementação de linhas orientadoras para o rastreio e profilaxia de infecção por SGB tem permitido alcançar resultados positivos ao nível do controlo da incidência de doença de início precoce no recém-nascido.

O ideal seria que todas as grávidas fossem rastreadas para o SGB antes do parto: os resultados dos estudos de prevalência e de resistência aos antimicrobianos em cada instituição seriam mais abrangentes e traduziriam de um modo mais exacto a realidade e permitindo uma actuação mais eficaz na prevenção da infecção pelo referido agente.

A metodologia e as técnicas utilizadas para a pesquisa de SGB utilizadas neste estudo foram adequadas na medida em que se atingiram os objectivos inicialmente propostos.

Apesar da prescrição e administração da penicilina tenderem a diminuir em função de vários factores, nomeadamente o receio de reacções alérgicas e a propaganda intensiva de novos fármacos, sendo este um antibiótico de custo relativamente reduzido e o recomendado como sendo de primeira linha no tratamento de infecções por SGB pela CLSI dever-se-ia apostar na sua utilização. Também os resultados obtidos no nosso estudo reforçam esta recomendação.

O recurso a antimicrobianos de segunda linha provoca um aumento das suas taxas de resistência nas populações como se verificou no nosso estudo relativamente à eritromicina e à clindamicina.

Os diferentes serviços do CHEDV procuram trabalhar em cooperação adequando as pesquisas realizadas às necessidades da população. Neste sentido, ao ser necessário ao serviço de Ginecologia/Obstetrícia conhecer os perfis de susceptibilidade à penicilina e à clindamicina, após a realização do nosso estudo, o Laboratório de Microbiologia passou a disponibilizar informação relativa a estes antimicrobianos e não apenas a relativa à penicilina e eritromicina como até então.

Tomar conhecimento da realidade e investir no sentido de minimizar desequilíbrios é estar a contribuir para a melhoria da qualidade da prestação de cuidados em saúde. Os trabalhos na área da saúde, embora permitam o enriquecimento pessoal de quem os realiza, não apagam a ideia essencial: a melhoria da saúde dos utentes.

9 – Perspectivas futuras

Uma vez que a OMS recomenda investimentos ao nível da saúde preventiva em vez da saúde curativa, para o *Streptococcus agalactiae* dever-se-ia investir mais na pesquisa de uma vacina. As linhas orientadoras para a Neonatologia e Pediatria, sugerem uma vacina prévia à gravidez ou para administrar no início da mesma (Tumbaga e Philip 2006). No entanto, as estratégias preventivas diminuem o risco de doença de início precoce mas o seu custo é elevado (Stan et al 2001).

Estudos realizados com mulheres não grávidas e que demonstraram a possibilidade de colonização simultânea por mais do que um serótipo da bactéria podem ter relevância para o desenvolvimento de vacinas (Ferrieri e tal 2004) por permitirem a determinação dos diferentes serótipos do agente e a avaliação da eficácia na prevenção da infecção tanto das mulheres como dos recém-nascidos.

Ainda que uma vacina contra o SGB represente um avanço na saúde pública (Maisey et al 2009), não devemos esquecer que as políticas de prevenção estão dependentes da incidência da doença, das infraestruturas de apoio aos cuidados de saúde, da relação custo-benefício e das atitudes culturais de cada país (Zusman et al 2006) que são factores que, claramente, podem atrasar o desenvolvimento da vacina.

Enquanto não se desenvolve a tão desejada vacina, a alternativa passa por investimentos ao nível da detecção da bactéria para facilitar a adequada execução da profilaxia intra-parto. Neste sentido, embora as empresas disponibilizem meios de cultura diferenciais cada vez mais sensíveis para a detecção do agente, o problema prende-se com o facto de no momento da colheita (que para estudo cultural deverá ser feito antes do parto pelo tempo necessário à cultura) a grávida pode não apresentar colonização.

A natureza intermitente da colonização materna por SGB significa que o rastreio materno deveria ser feito no início do trabalho de parto. No entanto, os exames culturais requerem um período superior a 24 horas para obtenção de resultados, demasiado tempo para que se decida sobre o recurso ou não à quimioprofilaxia intraparto.

Um teste rápido, para ser útil na prática, deverá ser suficientemente preciso e sensível se comparado com o teste cultural. Por outro lado, deverá facilitar os resultados para o clínico atempadamente em caso de necessidade de quimioprofilaxia (Honest et al 2006).

São vários os estudos (El Aila et al 2009, Rojo et al 2008, Martins et al 2007) que referem o recurso a técnicas moleculares a aplicar no estudo de SGB: RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism), Ribotipagem, Electroforese de Campo Pulsado (PFGE), MLEE (Multilocus enzyme electrophoresis), RAPD (Randomly amplification of polymorphic DNA-analysis) e MLST (Multilocus sequence Typing).

A reacção de PCR (Polimerase Chain Reaction) é um ensaio hoje conhecido como mais sensível que os métodos culturais padronizados (Tsai 2009) e que deveria ser utilizado para testar a colonização das grávidas no momento do parto.

Ensaios que recorram à biologia molecular, embora sejam mais sensíveis e específicos que os testes culturais, são também mais caros e num mundo onde se verificam cortes orçamentais a todos os níveis, incluindo na saúde, são testes que não estão disponíveis na rotina laboratorial.

Embora entre 10 e 20% dos indivíduos hospitalizados refiram alergia à penicilina, a maioria apresenta testes cutâneos negativos e apenas 3% desenvolvem reacção quando submetidos a testes com o fármaco. Com vista a uma inversão da tendência de aumento de resistências e estando perante uma situação em que a penicilina deverá ser o agente de primeira escolha na prevenção e tratamento, seria recomendável incluir nos testes realizados durante a gravidez um de sensibilidade cutânea, por exemplo, à penicilina. Esta medida iria permitir conhecer uma eventual reacção da grávida ao fármaco, e a taxa real de alérgicas, para que momento de decisão pela instituição do quimioprofiláctico, se opte por aquele que é o recomendado pela CLSI.

Relativamente ao estudo realizado, no futuro seria interessante estudar-se a caracterização molecular das estirpes e SGB isoladas para se ter acesso a informação mais concreta ao nível dos polissacarídeos capsulares, definindo os serotipos capsulares conhecidos (Ia, Ib, II-VIII) e avaliando as linhagens genéticas para se distinguirem tropismos e o potencial virulento de cada estirpe. Com este tipo de estudos poder-se-ia compreender melhor a patogenicidade e definir medidas profiláticas mais adequadas.

10 - Bibliografia

- Al-Sweih N, Jamal M, Kurdia M, Abduljabar R e Rotimi V. Antibiotic Susceptibility Profile of Group B Streptococcus Streptococcus agalactiae) at the Maternity Hospital, Kwait. 2005. Med Princ Pract 14:260-263.

- Aracil B, Miñambres M, Oteo J, de la Rosa M, Gómez-Garcés JL, Alós JI. 2002. Clin Microbio Infect. 8: 745-748.

- Ayres de Campos D, Montenegro N, Rodrigues T. 2008. Protocolos de Medicina Materno-Fetal. 2ª Edição. Edições Lidel. p.32-33.

- Azavedo JCS, McGavin M, Duncan C, Donald EL, McGeer A. 2001. Prevalence and Mechanisms of macrolide Resistance in Invasive and Noninvasive Group B streptococcus Isolates from Ontario, Canada. Antimicrob Agents Chemother 45: 3504-8.

- Borger IL, d'Oliveira REC, Castro ACD, Mondino SSB. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos. 2005. Rev Bras Ginecol Obstet. 27(10):575-9.

- Borger IL. Estudo da colonização por Streptococcus agalactiae em gestantes atendidas na Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2005. Universidade Federal Fluminense. Niterói.

- Carrapato MRG, Caldeira T. 2008. Prevenção da Doença Perinatal por Estreptococo do Grupo B. Available from: http://intranet.hfeira.pt/sites/pediatria/default.aspx?rootfolder=2fsites%2pediatria%2fshared%20documents%2fprotocolos&view=%7bDB0c9c2%2df6E9%2d43D2%2d9E5C%2d47AEBA979050%7d, em 13 de Maio de 2010.

- Centers for Disease Control and Prevention (CDCP). Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2002; 51(Nº RR-11): 1-26.

- Church DL, Baxter H, Lloyd T, Miller B, Elsayed S. 2008. Evaluation of StrepB Carrot Broth versus Lim Broth for Detection of Group B Streptococcus Colonization Status of Near-Term Pregnant Women. J Clin Microb 46(8): 2780-2.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. USA. M100S19. Vol 29(3).

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2010. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. USA. M100S20. Vol 30(1).

- Diaz TM e Nieves BM. Comparación de médios de cultivos y procedimientos para detectar colonización por *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas. 2008. Ver Chil Infect. 25 (2): 108-113.

- Edwards MS, Baker CJ. 2005. *Streptococcus agalactiae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th edition. USA: Elsevier Churchill Livingstone. p. 2423-2434.

- El Aila NA, Tency I, Claeys G, Saerens B, De Backer E, Temmerman M, Verhelst R, Vaneechoutte M. 2009. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) isolated from vaginal and rectal swabs of women at 35-37 weeks of pregnancy. BMC Public Health [Internet]. [cited 2010 Jan 22]; 9:153 Available from: http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/153

- Ferreira WFC, Sousa JCF. 2000. Microbiologia – Volume 2. Portugal: Edições LIDEL. p. 52-61.

- Ferrieri P, Hillier SL, Krohn MA, Moore D, Paoletti LC e Flores AE. Characterization of vaginal & rectal colonization with multiple serotypes of group B streptococci using multiple colony picks. 2004. Indian J Med Res: 119 (Suppl) May. pp 208-212.

- Figueira-Coelho J, Ramirez M, Salgado MJ, Melo-Cristino J. Streptococcus agalactiae in a large Portuguese teaching hospital: antimicrobial susceptibility, serotype distribuition and clonal analyses of macrolide-resistant isolates. 2004. Microb Drug Res; 10(1):31-6.

- Florindo C, Viegas S, Paulino A, Rodrigues E, Gomes JP, Borrego MJ. 2009. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility profiles in *Streptococcus agalactiae* colonizing strains: association of erythromycin resistance with subtype III-1 genetic clone family. Clin Microbiol Infect. 2009 Nov 2.

- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. 1998. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 10th edition. Missouri (USA): Mosby. p. 619-35.

- Goins WP, Talbot TR, Schaffner W, Edwards KM, Craig AS, Schrag SJ, Van Dyke MK, Griffin MR. Adherence to perinatal group B streptococcal prevention guidelines. 2010. Obstet Gynecol: 115 (6): 1217-24.

- Hannoun A, Shehab M, Khairallah M-T, Sabra A, Abi-Rached R, Bazi T, Yunis KA, Araj GF e Matar GM. Correlation between Group B Streptococcal Genotypes, their antimicrobial resistance profiles, and virulence genes among pregnant women in Lebanon. 2009. International Journal of Microbiology. doi:10.1155/2009/796512.

- Hordnes K, Tynning T, Kvam AI, Jonsson R, Haneberg B. 1996. Colonization in Rectum and Uterine Cervix with Group B Streptococci May Induce Specific Antibody Responses in Cervical Secretions of Pregnant Women. Infect Immun 64: 1643-52.

- Joachim A, Matee MI, Massawe FA, Lyamuya EF. 2009. Maternal and neonatal colonization of group B streptococcus at Muhimbili National Hospital in Dar es Salaam, Tanzania: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance. BMC Public Health [Internet]. [cited 2010 May 20]; 9:437 Available from: http://www.biomedcentral.com/1471-2458/9/437

- Lo JYC. 2009. Early-onset group B streptococcus neonatal disease: a target for prevention? Hong Kong Med J 15:412-3.

- Maisey HC, Doran KS e Nizet V. Recent advances in understanding the molecular basis of group B Streptococcus virulence. 2009.Expert Rev Mol Med. 10: e27. Doi:10.1017/S1462399408000811.

- Maniatis AN, Palermos J, Kantzanou M, Maniatis NA, Christodoulou C, Legakis NJ. 1996. J Med Microbiol 44: 199-202.

- Marimón JM, Valiente a, Ercibengoa M, García-Arenzana JM, Pérez-Trallero E. Erythromycin Resistance and Genetic Elements Carrying Macrolide Efflux Genes in *Streptococcus agalactiae*. 2005. Antimicrob Agents Chemother 49(12): 5069-74.

- Martins ER, Pessanha MA, Ramirez M, Melo-Cristino J and The Portuguese Group for Study of Streptococcal Infections. Analysis of Group B Streptococcal Isolates from Infants and Pregnant Women in Portugal Revealing Two Lineages with Enhanced Invasiveness. 2007. J Clin Microbiol.45(10): 3224-9.

- Melo-Cristino J, Santos L, Ramirez M e Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias. Estudo Viriato: Actualização de dados de susceptibilidade aos antimicrobianos de bactérias responsáveis por infecções respiratórias adquiridas na comunidade em Portugal em 2003 e 2004. 2006.Rev Port Pneumol XII(1):9-29.

- Mollerach A, Méndez E, Massa R, Di Conza J. *Streptococcus agalactiae* aislados en Santa Fe, Argentina: estúdio de la sensibilidad a antibióticos de uso clínico y mecanismos de resistência a eritromicina y clindamicina. 2007. Enferm Infecc Microbiol Clin: 25 (1): 66-70.

- Motlová J, Straková L, Urbášková P, Sak P, Sever T. 2004. Vaginal & rectal carriage of *Streptococcus agalactiae* in the Czech Republic: incidence, serotypes distribuition & susceptibility to antibiotics. Indian J Med Res 119 (suppl): 84-87.

- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. 2000. Microbiologia Médica. 3ª edição. Rio de Janeiro (Brasil): Guanabara Koogan. p.158-171.

- Pinheiro S, Radhouani H, Coelho C, Gonçalves A, Carvalho E, Carvalho JÁ, Ruiz-Larrea F, Torres C, Igrejas G, Poeta P. 2009. Prevalence and Mechanisms of Erythromycin

Resistance in *Streptococcus agalactiae* from Healthy Pregnant Women. Microb Drug Resist 15(2): 121-4.

- Programa Nacional de Controlo de Infecção (PNCI). 2004. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia.

- Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. 2003. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH (ed.) Manual of clinical Microbiology. 8th edition. ASM Press. Washington, DC. p.1074-1101.

- Rojo P, Araya P, Martínez MA, Hormazábal JC, Maldonado A, Fernández J. Caracterización molecular en aislados chilenos de *Streptococcus agalactiae*. 2008. Rev Méd Chile 136: 606-612.

- Rosário NA, Grumach AS. 2006. Alergia a beta-lactâmicos na clínica pediátrica: uma abordagem prática. J Pediatr (Rio J). 82 (5 Suppl). S181-8.

- Ruoff, KL, Whiley RA, Beighton D. 2003. *Streptococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH (ed.) Manual of clinical Microbiology. 8th edition. ASM Press. Washington, DC. p.405-418.

- Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, Hadler JL, Danila R, Cieslak PR, Schuchat A. Group B Streptococcal Disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. 2000. New Engl J Med 342 (1): 15-20.

- Simões JA, Moraes V, Alves N, Fracalanzza SEL, Camargo RPS, Mathias L, Milanez HMBP, Brolazo EM. 2007. Phenotypical Characteristics of Group B Streptococcus in Parturients. Braz J Infect Dis 11(2): 261-6.

- Sousa JC. 2006. Manual de Antibióticos Antibacterianos. 2ª edição. Portugal. Edições Universidade Fernando Pessoa

- Stan CM, Boulvain M, Bovier PA, Auckenthaler R, Berner M, Irion O. 2001.Choosing a strategy to prevent neonatal early-onset group B streptococcal sepsis: economic evaluation. Br J Obstet gynaecol 108: 840-7.

- Tsai H-J. Prenatal Group B *Streptococcus* Test using Real-Time Polymerase Chain Reaction. 2009. Taiwan J Obstet Gynecol. 48:4.

- Tsui MHY, Ip M, Ng PC, Sahota DS, Leung TN, Lau TK. 2009. Change in prevalence of group B *Streptococcus* maternal colonization in Hong Kong. Hong Kong Med J 15: 414-9.

- Tumbaga PF et Philip AGS. Perinatal Group B Streptococcal Infections and the New Guidelines: an Update. 2006. Neoreviews 7: 524-530.

- Van Dyke MK et al. Evaluation of Universal Antenatal Screening for Group B Streptococcus. 2009. N Engl J Med 360;2626-36.

- Zusman AS, Baltimore RS, Fonseca SNS. Prevalence of Maternal group B Streptococcal Colonization and Related Risk Factors in a Brazilian Population. 2006. Braz J Infect Dis. 10(4): 242-6.

Anexos

Anexo 1

Teste da catalase

Reagente

ID Color Catalase (referência 55 561da BioMérieux®)

Procedimento

1.Adicionar 1 gota de reagente a uma lâmina de vidro

2.Transferir uma colónia a estudar com uma ansa esterilizada para a gota de reagente

3.Observar a existência de reacção (formação de bolhas de oxigénio)

Limites e precauções

- No caso de pesquisa directa a partir de GS, uma reacção mais tardia e não limitada ao local da colónia não deve ser valorizada (trata-se da reacção da actividade catalásica dos eritrócitos)
- Usar cultura fresca; colónias com mais de 24 horas podem falsear resultados

Anexo 2

Aglutinação para classificação serológica de Lancefield

O SLIDEX® Strepto Plus (referência 58 819 da BioMérieux®) é um teste rápido de aglutinação de micropartículas de látex para a grupagem de estreptococos do grupo B segundo a classificação de Lancefield. É um teste que se realiza a partir de colónias isoladas em meios semeados com amostras de origem humana.

Princípio

Após cultura, as colónias de estreptococos isoladas são colocadas num tubo com a enzima de extracção. O antigénio específico do grupo B que se encontra na parede da bactéria é extraído através de uma enzima e posteriormente identificado por partículas de látex sensibilizadas por um anticorpo anti-antigénio do grupo B. Se o antigénio estiver presente, o reagente de látex aglutina; por outro lado, se o antigénio estiver ausente, o reagente de látex permanece em suspensão homogénea.

Procedimento

1.Preparação da enzima de extracção com 10 ml de água destilada estéril (estável até 6 meses após a reconstituição no seu frasco de origem e nas condições de armazenamento recomendadas)

2.Num tubo de hemólise, colocar 400 µl de enzima de extracção e suspender nesta solução, com a ajuda de uma ansa esterilizada, 3 a 5 colónias isoladas da bactéria a estudar.

3.Homogenizar utilizando um agitador e incubar 10 minutos a 37ºC.

4.Depositar uma gota do reagente de látex, dispensado verticalmente, numa carta e adicionar 15 µl da suspensão preparada em 2 e homogeneizar recorrendo a um palito.

5.Dar à carta um movimento de rotação durante 2 minutos e ler sob luz normal sem utilizar lupa.

Leitura e interpretação dos resultados

- Um resultado positivo traduz-se no aparecimento de uma aglutinação nítida com o regente de látex em 2 minutos, no máximo.
- Um resultado negativo é indicado através da ausência de aglutinação (suspensão homogénea ou granulação muito fina em 2 minutos).

Limites e precauções

- A interpretação dos resultados deve ser feita tendo em conta o contexto clínico, a origem da amostra, os aspectos macro e microscópicos e, eventualmente, os resultados de outros testes.
- Utilizar apenas culturas puras.
- Podem aparecer resultados falsamente negativos se for testado um número insuficiente de colónias.

Anexo 3

Antibiograma

Procedimento

1.Preparar uma suspensão de SGB em água de inóculo ou em NaCl 0,85% ajustando-a à escala de 0,5 de McFarland (0,08-0,12 no turbidímetro)

2.Depois de bem homogeneizada dispensar 50µl da suspensão em MHS e rodar uma zaragatoa esterilizada no meio de cultura semeando em estrias apertadas em toda a superfície da placa em pelo menos 2 direcções para se garantir a distribuição uniforme do inóculo. Por fim, rodar a zaragatoa na periferia da placa.

3.Aplicar os discos de penicilina, eritromicina e clindamicina garantindo a distância de 15-26mm entre os discos de eritromicina e clindamicina.

4.Incubar 20-24 horas a 35±2ºC com 5% de CO_2.

5.Realizar leitura e interpretar de acordo com as normas da CLSI.

Limites e precauções

- Devem ser utilizadas colónias isoladas do microrganismo em causa, obtidas a partir de cultura pura.
- Estão desaconselhados testes de sensibilidade feitos directamente a partir do produto biológico.
- Nunca recolocar um disco em local diferente após contacto com a placa, porque o antimicrobiano difunde imediatamente.
- Não utilizar meios fora de prazo uma vez que os halos de inibição poderão ser afectados.