

KLEBER DIAS RIBEIRO

STREPTOCOCCUS AGALACTIAE EM GESTANTES RESIDENTES
EM BELÉM-PARÁ

BELÉM
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
Núcleo de Medicina Tropical
BIBLIOTECA

KLEBER DIAS RIBEIRO

***STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM GESTANTES RESIDENTES
EM BELÉM-PARÁ**

**BELÉM
2003**

KLEBER DIAS RIBEIRO



***STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM GESTANTES RESIDENTES
EM BELÉM-PARÁ**

KLEBER DIAS RIBEIRO

**PESQUISA DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM GESTANTES
RESIDENTES EM BELÉM-PARÁ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia das Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
Núcleo de Medicina Tropical
BIBLIOTECA

BELÉM

2003

579.355
R484P
DIS

KLEBER DIAS RIBEIRO

INSTITUTO DE PESQUISA DE MEDICINA TROPICAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
RESUMO

Este trabalho tem como objetivo investigar a prevalência de infecções por *Streptococcus agalactiae* em gestantes residentes em Belém-Pará. Para isso, foram coletadas amostras de leite materno de 100 gestantes residentes em Belém-Pará, com o intuito de identificar a presença de *Streptococcus agalactiae* no leite materno. Os resultados demonstraram que 10% das amostras foram positivas para a presença de *Streptococcus agalactiae*. Este resultado indica que a infecção por *Streptococcus agalactiae* é comum em gestantes residentes em Belém-Pará, o que pode ser uma fonte de infecção para o recém-nascido.

RIBEIRO, Kleber Dias
R 484 p *Streptococcus agalactiae* em gestantes residentes
em Belém-Pará/
Kleber Dias Ribeiro.- Belém, 2003: 76 fl: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical.

1. Infecção por *Streptococcus agalactiae*. 2. Gravidez. 3. Bactéria. 4. Identificação. 5. Profilaxia. 6. Tratamento.

KLEBER DIAS RIBEIRO

PESQUISA DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM GESTANTES RESIDENTES EM BELÉM-PARÁ

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais do Curso de Pós-Graduação em Patologia das Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira
Universidade Federal do Pará

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. José de Arimatéia Freitas
Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof.^a Dr. Tereza Cristina Corvelo
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Suplente:

Prof. Dr. Eduardo Costa
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Belém, 12 de Dezembro de 2003

A meus pais
Maria das Graças e Hermínio Sebastião

A meus irmãos,
Kérina e Kelton

À minha esposa
Cynthia Manuela,
Com muito amor

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permitiu que todas as pessoas certas, estivessem presentes ao meu lado, nos momentos certos.

Ao professor e amigo José Luiz, que em todos os momentos, sempre incentivou-me a prosseguir minha caminhada.

A professora Marlene Assis pelo carinho e atenção.

Ao enfermeiro Antônio de Pádua, pois sem ele não conseguiria realizar minha coleta.

A meus pais pelo apoio que sempre tive.

A minha colega de profissão e esposa Cynthia Manuela, por tudo que fez e faz para ajudar-me.

RESUMO

Na infecção por *Streptococcus agalactiae* são reconhecidas duas formas neonatais, a de início precoce, cujo quadro clínico é caracterizado por bacteremia com envolvimento pulmonar, meningite, choque séptico e neutropenia, e a de início tardio, na qual a bacteremia associada à meningite é a manifestação clínica predominante. Considerando-se a gravidade da patologia, o desconhecimento da incidência desta bactéria em gestantes residentes na região Norte do Brasil e a importância do seu diagnóstico em exames pré-natais, é fundamental a determinação da ocorrência dos estreptococos do grupo B neste referido grupo populacional. Portanto, este estudo objetivou a realização do diagnóstico laboratorial de *Streptococcus agalactiae* no trato genital feminino de gestantes, no último trimestre de gestação, determinando a incidência e alertando sobre a importância do diagnóstico no exame pré-natal. O estudo foi realizado no período de fevereiro a agosto de 2002, em 50 gestantes voluntárias residentes e domiciliadas na cidade de Belém-Pará, procedentes do setor de Tocoginecologia da Universidade Federal do Pará, e a identificação da bactéria foi realizada através da bacterioscopia e da cultura do conteúdo vaginal. Das 50 gestantes estudadas, sete (14%) apresentavam cultura positiva para *Streptococcus agalactiae*. Destas, duas (28,6%) eram primigestas e cinco (71,4%) secundigestas. Os resultados obtidos indicaram a presença significativa da bactéria, indicando a necessidade da adoção de medidas profiláticas da infecção por este agente, devido às altas taxas de morbidade e mortalidade associadas ao estreptococo do grupo B.

ABSTRACT

In the *Streptococcus agalactiae* infections in newly born two forms are recognized, that of precocious beginning, whose clinical picture is characterized by bacteremia with lung involvement, meningitis, septic shock and neutropenia, and the of late beginning, where the bacteremia associated to the meningitis is the predominant clinical manifestation. Being considered the gravity of the pathology, the absence of information about the incidence of this bacterium in resident pregnant women in the north area of Brazil and the importance of diagnosis, is fundamental the determination of the occurrence of the *Streptococcus* of the group B in this population. Therefore, this study aimed the laboratorial diagnosis of *Streptococcus agalactiae* in the pregnant women feminine genital tract, in the last quarter of gestation, determining the incidence and alerting about the importance of the diagnosis in the prenatal exam. This study was realized in the period of February to August of 2002, in 50 pregnant women resident and domiciled in the city of Belém-Pará, coming from the section of gynecology of the Federal University of Pará. The bacteria identification carry out through the bacterioscopy and culture of the vaginal contents. Of the 50 studied pregnant women, seven (14%) presented positive culture for *Streptococcus agalactiae*. Of these, two (28,6%) were first gestation and five (71,4%) second gestation. This results to indication the significant presence of the bacterium, indicating the need of the adoption procedures for prevention of the infection by this agent, due the high index morbidade and mortality associated to the *Streptococcus* of the group B.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRAT.....	iv
SUMÁRIO.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	14
1.2 CULTIVO.....	15
1.3 CLASSIFICAÇÃO SOROLÓGICA.....	16
1.4 ESTREPTOCOCOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA.....	17
1.5 <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	21
1.6 PATOLOGIAS ASSOCIADAS AO <i>STREPTOCOCCUS</i> <i>AGALACTIAE</i>	26
1.7 TRATAMENTO.....	29
2 OBJETIVO.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 CASUÍSTICA.....	32
3.2 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	32
3.3 AMOSTRAS.....	33
3.4 LOCAL DE IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL.....	33
3.5 IDENTIFICAÇÃO DE <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	34

3.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	36
3.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	36
4 RESULTADOS.....	37
4.1 DO PERFIL DAS GESTANTES.....	37
4.2 RESULTADOS DO EXAME DE CULTURA.....	38
5 DISCUSSÃO.....	44
6 CONCLUSÃO.....	48
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXO.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação de estreptococos beta-hemolítico do grupo B.....	35
Tabela 2 – Culturas positivas de <i>Streptococcus agalactiae</i> , considerando o número de gestações.....	37
Tabela 3 – Culturas positivas para <i>Streptococcus agalactiae</i> , considerando-se a faixa etária das pacientes.....	42
Tabela 4 – Condições sócio-econômica, segundo a faixa etária das participantes do estudo com cultura positiva para <i>Streptococcus agalactiae</i>	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – α -hemólise (à esquerda), β -hemólise (no centro) ou ausência de hemólise (à direita)..... 16
- Figura 2** – Coloração de Gram de secreções vaginais. Mostrando cocos Gram-positivos em pares, sugestivos de estreptococos..... 39
- Figura 3** – Prova da catalase. Catalase positiva (direita) e negativa (esquerda)..... 39
- Figura 4** – Teste de sensibilidade a bacitracina (resistente)..... 40
- Figura 5** – Teste de sensibilidade ao sulfametoxazol-trimetoprima (resistente)..... 40
- Figura 6** – Teste da hidrólise do hipurato de sódio. Reação positiva (tubos à direita e Esquerda) com precipitado abundante, e reação negativa (tubo central) sem precipitado..... 41
- Figura 7** – Teste de CAMP positivo. B-hemólise em forma de ponta de flecha..... 41
- Figura 8** – Teste da bile esculina positivo. Tubo apresentando coloração negra..... 42

LISTA DE ABREVIATURAS

CAMP - Christie, Arkins, Munch-Peterson

CCS - Centro de Ciências da Saúde

CONEP - Conselho Nacional de Ética em Pesquisa

PYR - Pirrolidonil Arilamidase

NaCl - Cloreto de Sódio

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A família Streptococcaceae está dividida em 3 gêneros: *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactococcus* (Koneman et al., 2001). O gênero *Streptococcus* é caracterizado por cocos gram-positivos, de forma esférica e oval e de 1-1,5 µm de diâmetro. Entretanto, a medida que a cultura envelhece, eles perdem sua característica tintorial Gram-positivas e parecem tornar-se Gram-negativos, tal transformação poderá ocorrer após uma noite de incubação (Schroeder, 2003).

Anaeróbios facultativos, se dispõem aos pares ou em cadeias, pela existência de pontes de parede celular. Muitos isolados também são estimulados pelo aumento de CO₂ (Koneman et al., 2001; Bates et al., 2003).

A maioria das espécies faz parte da flora normal da garganta, da pele e dos intestinos, mas podem causar doenças quando alcançam os tecidos e sangue (Jawertz, 1998; Martins, 1999; Jeng et al., 2003).

Os estreptococos formam um grupo amplo e heterogêneo, fazem parte da flora normal e se comportam como oportunistas. Alguns são patógenos e podem produzir infecções diversas no homem e nos animais (Khemaleelakul et al., 2002; Kim et al., 2002).

Os *Streptococcus viridans* e *Streptococcus pneumoniae* são encontrados principalmente na orofaringe, o *Streptococcus pyogenes* está presente na superfície da pele e na orofaringe em pequena quantidade; o *Streptococcus agalactiae* ocorre no trato genital

feminino. Os enterococos e os estreptococos do grupo D se localizam no trato intestinal inferior (Jawertz, 1998; Martins, 1999; Khemaleelakul et al., 2002; Bachrach et al., 2003).

Os membros do gênero *Streptococcus* apresentam como característica de crescimento, a formação de cadeias (ou cadeias de diplococos), quando cultivados em meios líquidos. Esta propriedade é compartilhada pelos enterococos e lactococos (Koneman et al., 2001; Dunn et al., 2002; Webb et al., 2003).

A determinação da disposição celular é melhor evidenciada corando-se os microorganismos pelo método de Gram, desenvolvidos em meio tioglicolato. Não produzem catalase e oxidase, propriedades que, juntamente com a reatividade à coloração de Gram, diferencia-os das espécies de *Neisseria* (Koneman et al., 2001; Bates et al., 2003).

A composição da parede celular dos estreptococos é similar a de outras bactérias gram-positivas, sendo formada principalmente por glicopeptídeo, no qual estão inseridos diversos carboidratos, ácidos teicóicos, lipoproteínas e proteínas antigênicas de superfície (Bates et al., 2003; Harris et al., 2003; Jeng et al., 2003; Webb et al., 2003).

1.2 Cultivo

São homofermentadores, isto é, fermentam a glicose com formação de ácido láctico, como único produto da fermentação. São mais exigentes que os *Staphylococcus* em suas necessidades nutritivas e de cultivo, bem como apresentam resistência variável aos agentes externos, dependendo da espécie (Schroeder et al., 2003; Udo et al., 2003).

Não crescem bem nos meios comuns, sendo o ágar-sangue o mais utilizado para o isolamento, pois há uma indicação presuntiva de sua ocorrência, de acordo com a hemólise. As colônias são pequenas, lisas e transparentes, podendo apresentar α -hemólise.

(parcial), β -hemólise (total) ou não-hemólise (ausência) (Baron & Finegold, 1990) (figura 1).

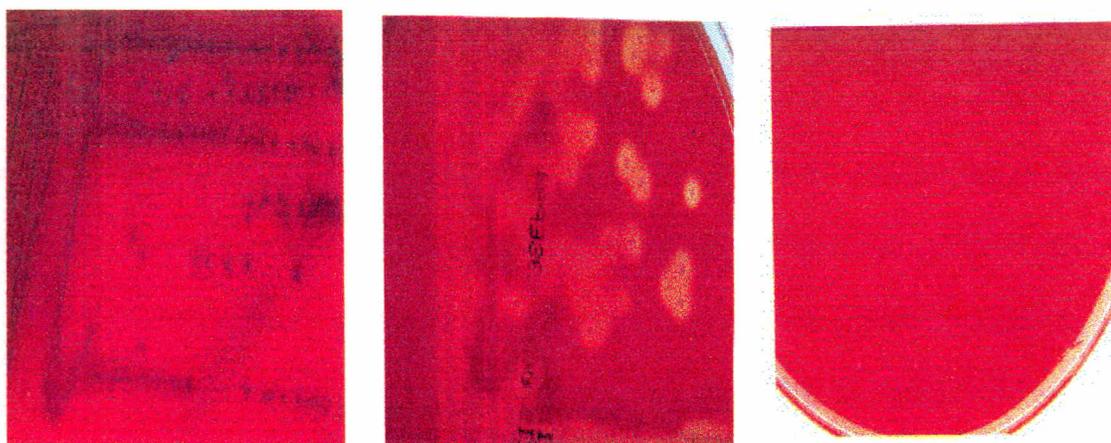


Figura 1. α -hemólise (à esquerda), β -hemólise (no centro) ou ausência de hemólise (à direita).

Fonte: Luís M. de la Mazza, Marie T. Pezzlo, Ellen Jo Baron. Atlas de Diagnóstico em Microbiologia (1999).

A temperatura ótima de crescimento é 37° C, com tempo de incubação de 24 a 48 horas (Baron & Finegold, 1990, Bates et al., 2003).

1.3 Classificação sorológica

Algumas espécies de estreptococos podem ser classificadas sorologicamente com base nos carboidratos antigênicos superficiais. O trabalho pioneiro de Rebecca Lancefield estabeleceu o **sistema de agrupamento de Lancefield** para os estreptococos β -

hemolíticos. Os antígenos detectados pelo sistema de Lancefield são polissacarídeos de parede celular (como nos estreptococos dos grupos A, B, C, D e G, oriundos de humanos) ou ácidos lipoteicóicos de parede celular (estreptococos do grupo D e espécies de *Enterococcus*) (Katz et al., 1994; Koneman et al., 2001; Slotved et al., 2002).

Originalmente, esses antígenos de agrupamento de parede celular eram extraídos com ácido clorídrico ou ácido nítrico diluídos, formamida ou por autoclavagem, e os grupos eram determinados por precipitação em tubos capilares. Atualmente os sistemas compactos disponíveis no comércio para agrupamento de estreptococos, utilizam extração enzimática e coaglutinação ou aglutinação com partículas de látex (Webb et al., 2003).

Outros estreptococos, em particular os membros do grupo viridans, não possuem qualquer dos antígenos de parede celular de Lancefield conhecidos, embora algumas cepas possam apresentar antígenos similares que reagem de modo cruzado com anti-soros específicos do grupo dos estreptococos β -hemolíticos (Katz et al., 1994; Slotved et al., 2002; Dunn et al., 2003).

Os estreptococos viridans bem estudados, como o microorganismo cariogênico *S. mutans*, foram divididos em sorotipos com base em seus carboidratos antigênicos da parede celular (Jeng et al., 2003; Webb et al., 2003).

Os diferentes sorotipos de *S. mutans* foram, em seguida, elevados à categoria de espécies e, na atualidade, compreendem o denominado grupo *S. mutans* de estreptococos bucais (Koneman et al., 2001; Khemaleelakul et al., 2002; Bachrach et al., 2003).

1.4 Estreptococos de Importância Clínica

Os seguintes estreptococos e enterococos são de particular importância clínica:

***Streptococcus pyogenes*:** A maioria dos estreptococos que contêm o antígeno do grupo A consiste em *Streptococcus pyogenes*. São β -hemolíticos. É considerado o principal patógeno humano associado a invasão local ou sistêmica e a distúrbios imunológicos pós-estreptococos. Tipicamente, *Streptococcus pyogenes* produz grandes zonas (1cm de diâmetro) de β -hemólise ao redor de colônias com mais de 0,5 mm de diâmetro. É PYR-positivo (hidrólise da Pirrolidonil Arilamidase) e, em geral, mostra-se sensível à bacitracina (Martins, 1999; Bates et al., 2003).

***Streptococcus agalactiae*:** Trata-se de **estreptococos do grupo B**, membros da microbiota normal do trato genital feminino, se constituem uma importante causa de seps e meningite neonatal. Tipicamente, são β -hemolíticos e produzem zonas de hemólise que são apenas ligeiramente maiores do que as próprias colônias (1-2 mm de diâmetro). Os estreptococos do grupo B hidrolisam o hipurato de sódio e produzem uma resposta positiva no denominado teste de CAMP (Christie, Arkins, Munch-Peterson) (Baker, 1990; Benitz, 2002).

Grupos C e G: Estes estreptococos ocorrem algumas vezes na nasofaringe e podem causar sinusite, bacteremia ou endocardite. Com freqüência, assemelham-se ao *S. pyogenes* do grupo A em meio de cultura de ágar-sangue e são β -hemolíticos (Kim, et al., 2002; Webb et al., 2003).

***Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*:** Os enterococos reagem com anti-soros do grupo D. Fazem parte da microbiota entérica normal. Como o antígeno do grupo D é um ácido teicóico, não constitui um bom marcador antigênico, de modo que os enterococos costumam ser identificados por meio de outras características. Em geral, não são hemolíticos, e, em certas ocasiões, são α -hemolíticos. Apesar de considerados catalase-negativos, os enterococos algumas vezes podem ser fracamente catalase-positivos. São

PYR-positivos (Pirrolidonil Arilamidase). Crescem na presença de bile e hidrolisam a esculina (bile-esculina-positivos). Crescem em NaCl (Cloreto de sódio) a 6,5%. São mais resistentes à penicilina G do que os estreptococos, e, raramente, os microorganismos isolados possuem plasmídios que codificam a β -lactamase. Algumas cepas são resistentes à vancomicina (Udo et al., 2003).

***Streptococcus bovis*:** Trata-se de estreptococos do grupo D não-enterocócicos. Fazem parte da microbiota entérica, provocam ocasionalmente endocardite e, algumas vezes, causam bacteremia em pacientes com carcinoma de cólon. São não-hemolíticos e PYR-negativos. Crescem na presença de bile e hidrolisam a esculina (bile-esculina-positivos), mas não crescem em NaCl (Cloreto de Sódio) a 6,5%. *S. bovis* é freqüentemente classificado como estreptococos viridans (Pumarola, 1995).

***Streptococcus anginosus*:** outros nomes para a espécie *S. anginosus* incluem *S. milleri*, *S. intermedius* e *S. constellatus*. Estes estreptococos fazem parte da microbiota normal. Podem ser β -, α - ou não-hemolíticos. *S. anginosus* inclui estreptococos β -hemolíticos que formam diminutas colônias (< 0,5 mm de diâmetro) e reagem com anti-soros para grupos A, C ou G; todos são estreptococos β -hemolíticos do grupo F. Os do grupo A são PYR-negativos. *S. anginosus* é positivo no teste de Voges-Proskauer. Podem ser classificados como estreptococos viridans (Ruoff, 1988).

Estreptococos do Grupo N: São raramente encontrados em doenças humanas, mas produzem coagulação (“azedamento”) do leite (Jawetz, 1998).

Estreptococos do Grupo E, F, G, H e K-U: Estes estreptococos são observados primariamente em animais, com as exceções já mencionadas (Martins, 1999).

***Streptococcus pneumoniae*:** Os pneumococos são α -hemolíticos. Seu crescimento é inibido pela optoquina, e as colônias são solúveis em bile (Tuomanen et al., 1995).

***Streptococcus viridans*:** os estreptococos viridans incluem *S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguis* (grupo H) e outros. Tipicamente, são α -hemolíticos, mas podem ser não-hemolíticos. Seu crescimento não é inibido pela optoquina, e as colônias não são solúveis em bile. São os membros mais prevalentes da microbiota normal das vias aéreas superiores, e são importantes para a integridade das mucosas do trato respiratório. Podem atingir a corrente sangüínea em conseqüência de traumatismo e constituem uma importante causa de endocardite em válvulas cardíacas anormais. Alguns estreptococos viridans (por exemplo, *S. mutans*) sintetizam grandes polissacarídeos como dextranos ou levanos a partir da sacarose e contribuem significativamente para a gênese das cáries dentárias (Coykendall, 1989).

Estreptococos de Nutrição Variada: Os estreptococos nutricionalmente variáveis (*Streptococcus defectivus* e *Streptococcus adjacentes*) são também conhecidos como “estreptococos nutricionalmente deficientes”, “estreptococos piridoxal-dependentes”, além de outras designações. Exigem a presença de piridoxal ou cisteína para o seu crescimento em ágar-sangue ou crescem como colônias satélites ao redor de colônias de estafilococos e outras bactérias. Em geral, são α -hemolíticos, mas podem ser não-hemolíticos. Fazem parte da microbiota normal e, por vezes, provocam bacteremia ou endocardites e podem ser encontrados em abscessos cerebrais e outras infecções. A suplementação rotineira do meio de ágar-sangue com piridoxal permite o isolamento desses microorganismos (Ruof, 1991).

Peptostreptococcus: Estes estreptococos só crescem em condições anaeróbicas ou microaerófilas e produzem várias hemolisinas. Fazem parte da microbiota normal da boca, vias aéreas superiores, intestino e trato genital feminino. Com freqüência, participam, com muitas outras espécies bacterianas, de infecções anaeróbicas no abdome, na pelve, nos pulmões ou no cérebro (Jawetz, 1998).

1.5 *Streptococcus agalactiae*

No final da década de 50, foi isolado no líquido cefalorraquidiano de recém-natos portadores de meningite bacteriana, uma cepa de estreptococos identificada como pertencente ao grupo B (*Streptococcus agalactiae*) (Hood et al, 1961). Posteriormente, estudo realizado no Boston City Hospital, mostrou que o *Streptococcus agalactiae* era responsável por 25% das infecções no berçário daquela Instituição (Finn & Holden, 1970; Ferman et al., 1984).

A partir destes estudos preliminares, maior atenção foi destinada ao *Streptococcus agalactiae* principalmente na última década, quando verificou-se o aumento no número de infecções causadas por esta bactéria, com predominância em recém-nascidos (Barrington, 2002; Gottoff, 2002; Morrow, 2002).

Até o início da década de 70, a doença causada pelo estreptococos do grupo B em seres humanos era rara, e o microorganismo considerado comensal no trato gastrointestinal, genital e respiratório. Entretanto, nos últimos anos os estreptococos do grupo B emergiram no mundo como principal causa de meningite e infecção neonatal. As razões para o aumento na incidência não são conhecidas, e a tendência parece ser universal, ocorrendo em todos os grupos sócio-econômicos e raciais (Raddi & Martins, 1991; Blowey & Davis, 2002; Hoshina et al., 2002).

Atualmente, demonstra-se que a frequência das infecções estreptocócicas nos países com clima tropical e subtropical, é similar aquela dos países com clima temperado (Hammoud et al., 2002, Kubota et al., 2002).

Em mulheres, o microorganismo coloniza a vagina e o reto. A colonização vaginal assintomática é observada em 5% a 35% das mulheres grávidas, e até 60% das mulheres infectadas podem portar a bactéria de modo intermitente (McDuffie et al., 1993, Mocelin et al., 1995). Este crescimento pode se originar a partir da contaminação retal, sendo o trato gastrintestinal o principal reservatório (Koneman et al., 2001; Manning et al., 2002).

Em um estudo realizado no Chile, 10.5% das gestantes apresentaram-se colonizadas pelo *Streptococcus agalactiae* no último trimestre de gravidez (Martinez & Ovando, 1995). Em Orlando, Flórida (EUA) a incidência foi de 24.3% (Quinlan et al., 2000).

Em Calgary, Canadá, foram colonizadas 19.5% das gestantes (Spaetgens et al., 2002) e em Budapeste, na Hungria, foi relatado incidência de 10% .

No recém-nascido, a colonização é por transmissão vertical, seja no útero ou durante o parto, a partir da mãe portadora. Além disso, pode ocorrer por exposição nosocomial após o nascimento. Cerca de 50-70% das crianças nascidas de mães com cultura positiva, tornaram-se colonizadas pelo microorganismo no primeiro dia de vida e a cesariana não protegeu à criança. Entre os lactentes, a doença pode aparecer em um a quatro para cada 1.000 nascidos vivos (Raddi & Martins, 1991; Edwards & Baker, 1995; Mocelin et al., 1995; Koneman et al. 2001).

Os estreptococos do grupo B também devem ser pesquisados nos indivíduos do sexo masculino, devido a alta taxa de colonização uretral, sugerindo ser o homem um grande reservatório destes microorganismos (Manning et al., 2002).

Recomenda-se quebrar a cadeia de transmissão, como forma de diminuir a incidência da patologia, através da eliminação dos estreptococos do trato genital. Várias propostas têm sido feitas neste sentido, baseadas no tratamento profilático com antibióticos, da gestante e do parceiro sexual. A melhor época para este tratamento, seria durante o último trimestre de gravidez (Marinoff & Chinn, 2001; Manning et al., 2002).

Em um estudo realizado na Inglaterra, foi relatado o crescimento de 5,8% para 11,8% de mulheres colonizadas entre o segundo e o terceiro trimestre de gestação (Blowey & Davis, 2002). Outra pesquisa realizada na Austrália, relatou aumento de 14,8% para 25,4% do segundo para o terceiro trimestre (Hoshina et al., 2002). Estes resultados indicam a importância da cultura no último trimestre de gravidez e, o tratamento da gestante (Ferman et al., 1984; Blowey & Davis, 2002; Hoshima et al., 2002; Kubota et al., 2002).

Portanto, percebe-se que o período adequado para identificação dos estreptococos do grupo B em gestantes é no último trimestre de gestação (28^a a 40^a semana de gestação), porque otimiza o valor preditivo para colonização no parto, minimiza o tempo durante o qual nova contaminação pode ocorrer e permite a identificação de mulheres infectadas e com parto prematuro (Noya & Baker, 1992; Mocelin et al., 1995).

O único método para identificação do estado de portador deste microorganismo, adequadamente estudado até hoje, é o da cultura pré-parto, que pode identificar a maioria de mulheres sob risco de transmissão do *Streptococcus agalactiae* para os neonatos (Mocelin et al., 1995; Gosling et al., 2002).

A profilaxia deverá ser instituída quando as mulheres com cultura positiva apresentarem ruptura precoce das membranas (> 12 horas), febre intraparto e/ou trabalho de parto prematuro (< 37 semanas) (Mocelin et al., 1995; Facchinetti et al., 2002).

Apesar da eficácia, estes critérios falham na prevenção de 25 a 30% dos casos de sepse de início precoce e de 10% dos óbitos, que representam neonatos a termo com menos de 12 horas de ruptura de membranas ou cujas mães não estavam febris durante o trabalho de parto (COMMITTEE on infectious diseases, 1992; Facchinetti et al., 2002).

A cultura pré-parto, apresenta dificuldade na sua execução, pois, um grande número de mulheres não passa pelo pré-natal, não é feita como rotina e os resultados positivos para estreptococos do grupo B poderiam levar ao uso indiscriminado de antibióticos (AMERICAN college of obstetricians, 1993; Vergani et al., 2002).

Há desconhecimento no fato que o tratamento falha na erradicação dos estreptococos do grupo B de seus reservatórios no colón, e que a quimioprofilaxia com ampicilina ou penicilina G é apropriada somente para aquelas pacientes com fatores de risco, bem como o uso deliberado de antibióticos pode levar a reações alérgicas e ao crescimento exacerbado de organismos resistentes (AMERICAN college of obstetricians, 1993; Facchinetti et al., 2002; Gosling et al., 2002; Vergani et al., 2002).

Soma-se aos fatores acima mencionados, alguns casos, em que a cultura negativa neste período pode passar a ser positiva no período do trabalho de parto, pela concentração do microorganismo nos reservatórios ou parceiro sexual (Slotved et al., 2002)

Outra forma de profilaxia é a coleta de amostras para cultura no início do trabalho de parto prematuro ou ruptura de membranas. Como as culturas são demoradas e os testes para diagnósticos rápidos são imperfeitos, a terapia deverá ser instituída, até que se

saiba o resultado da cultura; se esta for positiva a antibioticoterapia será mantida, e se negativa será interrompida (Benitz, 2002).

Neste método, há o inconveniente de se submeter, desnecessariamente, um grande número de mulheres à profilaxia, além de falhar em não considerar neonatos com mais de 36 semanas de gestação, que constituem 66 a 92% dos casos de sepse de início precoce (Benitz, 2002).

Um terceiro método é selecionar as mulheres para profilaxia intraparto pela presença de fatores de risco como: idade, número de gestações, abortos, idade gestacional, ruptura precoce das membranas, febre intraparto, trabalho de parto prematuro, etc. É considerado eficaz, entretanto, resultaria em exposição desnecessária das gestantes que não são portadoras de estreptococos do grupo B (AMERICAN college of obstetricians, 1993; Mocelin et al, 1995).

Sob condições ideais, a triagem para estreptococos do grupo B pré-parto feito com culturas reto-vaginais e profilaxia intraparto subsequente, é associada com taxas menores de contaminação neonatal e mortalidade, e com resultado superior ao emprego de protocolos com métodos de triagem rápidos intraparto (Yancey & Duff, 1994; Levine, 2002).

Entretanto, em populações nas quais o controle pré-parto é difícil, a diferença entre os dois métodos pode ser minimizada, pois estudos demonstraram taxa de mortalidade de neonatos de 0,21 por 1000 em mulheres que apresentavam fatores de risco e fizeram a triagem pré-parto e profilaxia intraparto (Yancey & Duff, 1994; Mocelin et al. 1995; Barrington, 2002).

Para mulheres que não apresentavam fatores de risco, com cultura positiva e realizaram antibioticoterapia, a taxa de mortalidade dos neonatos foi de 0,18 por 1000. (Yancey & Duff, 1994; Mocelin et al. 1995; Barrington, 2002).

1.6 Patologias associadas ao *Streptococcus agalactiae*

Os estreptococos produzem um amplo espectro de infecções variando de faringite e infecções celulares à septicemia e meningite. Podem causar também, desordens imunológicas como febre reumática e glomerulonefrite aguda (Jawertz, 1998; Martins, 1999; Hikita et al., 2002).

Nos Estados Unidos, onde o estreptococo do grupo B é considerado a principal causa de sepse neonatal, estima-se anualmente que 12.000 infantes e 50.000 gestantes têm patologias associadas ao estreptococo do grupo B (COMMITTEE on infectious diseases, 1992; Morrow, 2002).

Estudos realizados no Brasil, Chile, Cuba e E.U.A., demonstraram que os estreptococos β -hemolíticos do grupo B (*Streptococcus agalactiae*) representam uma importante causa de doenças (septicemia e meningite) nos períodos neonatal e perinatal (Raddi & Lorencetti, 1998; Morrow, 2002).

Os estreptococos β -hemolíticos do grupo B (*Streptococcus agalactiae*) foram reconhecidos em 1887 como causadores de mastite bovina, antes da classificação sorológica proposta por Lancefield (1933). O seu papel nas infecções humanas foi descrito por Fry (1938) que relatou 7 casos de febre puerperal causada por estreptococos do grupo B (Lancefield, 1933; Fry, 1938; Raddi & Martins, 1991; Dinger et al., 2002; Estuningsih et al., 2002).

São reconhecidas duas formas de infecções neonatais na área clínica e epidemiológica a saber: doença de início precoce e de início tardio (Raddi & Lorencetti, 1998; Miura & Martin, 2001).

A **doença de início precoce** possui incidência mundial de 0,7:1.000 a 3,7:1.000 nascidos vivos, e está associada à aquisição do microorganismo no útero ou durante o período perinatal (Edwards & Baker, 1995; Barrington, 2002). A bactéria é adquirida por infecção ascendente no útero antes do parto, através das membranas fetais rompidas ou durante a passagem através do canal do parto colonizado com estreptococos do grupo B (Barrington, 2002; Hammoud et al., 2002).

Embora um número substancial de lactentes (cerca de 50%) sejam colonizados pelo estreptococos, apenas 2% deles tornam-se infectados (Raddi & Martins, 1991; Edwards & Baker, 1995; Koneman et al., 2001).

O início da doença ocorre nos primeiros 5 dias de vida, em mais da metade dos casos, as crianças adoecem 12 a 20 horas após o nascimento (Koneman et al., 2001). Os achados caracterizam-se pôr bacteremia com envolvimento pulmonar, que é a apresentação clínica predominante, pneumonia, meningite, choque séptico e neutropenia (Palacios et al., 2002).

Embora mais de 50% dos casos ocorram em recém-nascidos a termo, as maiores taxas de infecções e morbidade encontram-se nas crianças prematuras (Ferrieri, 1990; Koneman et al., 2001).

A mortalidade associada à doença de início precoce entre lactentes a termo varia 2% a 8%; em prematuros, são observadas taxas maiores e inversamente proporcionais ao peso ao nascer (Schuchat et al., 1990; Yagupsky et al., 1991; Miura & Martin, 2001).

Os principais fatores maternos que aumentam o risco da infecção de início precoce nos recém-nascidos são trabalho de parto prematuro, ruptura das membranas fetais, bacteremia pós-parto, amnionite materna, colonização vaginal intensa e bacteriúria por estreptococos do grupo B (Barrington, 2002; Levine, 2002).

A **doença de início tardio** apresenta incidência mundial de 0,5:1.000 a 1,8:1.000 nascidos vivos, sendo evidenciada de 7 dias a 3 meses (3 a 4 semanas em média) após o nascimento (Raddi & Martins, 1991; Edwards & Baker, 1995; Koneman et al., 2001).

Cerca de 50% das infecções de início tardio são adquiridas a partir do canal de parto das mães colonizadas. Os demais resultam da aquisição pós-natal do microorganismo a partir da mãe, de outras pessoas que cuidam da criança ou do ambiente hospitalar (Kubbota et al., 2002; Palacios et al., 2002).

A bacteremia com meningite é a apresentação clínica predominante. A mortalidade associada à doença de início tardio é cerca de 10 a 15%. Até 50% das crianças acometidas apresentam seqüelas neurológicas irreversíveis (Raddi & Martins, 1991; Koneman et al., 2001).

Outras infecções causadas pelo estreptococo do grupo B em crianças e adultos incluem endocardite, osteomielite, artrite séptica e septicemia puerperal (Gosling et al., 2002).

O diagnóstico e tratamento da infecção por estreptococos do grupo B no recém-nascido é uma atribuição da neonatologia (Noya & Baker, 1992; Koneman et al., 2001). E como as crianças nascidas de mães altamente colonizadas têm maior probabilidade de contrair a doença de início precoce, bem como os lactentes que adquirem uma grande carga bacteriana durante o parto têm maiores chances de desenvolver tanto a

doença de início precoce quanto a tardia, portanto a detecção das mães colonizadas tornou-se o ponto central das estratégias de prevenção quimioproláticas (Marinoff & Chinn, 2001; Hammoud et al., 2002; Levine, 2002).

1.7 TRATAMENTO

A administração de antimicrobianos antes do parto não chega a eliminar a colonização por estreptococos do grupo B em quase 70% das mulheres (Baron & Finegold, 1990; Koneman et al, 2001). Entretanto, a transmissão do microorganismo, a infecção neonatal de início precoce e as complicações maternas pós-parto podem ser amplamente evitadas pela administração de ampicilina intravenosa durante o trabalho de parto (Facchinetti et al., 2002).

Estudos demonstraram que cepas de *Streptococcus agalactiae* analisadas foram sensíveis aos antibióticos beta-lactâmicos ensaiados, sendo que a penicilina e a ampicilina apresentaram os menores valores de Concentração Inibitória Mínima (CIMs), isto é, 0,03 ug/mL em 90% das cepas estudadas (Teixeira et al., 1993; Martinez et al., 1994; Facchinetti et al., 2002).

Apesar da alta sensibilidade *in vitro* deste microorganismo a penicilina e a ampicilina, freqüentemente são relatados fracassos terapêuticos, especialmente na erradicação da colonização vaginal do estreptococo em grávidas, tal fato está associado a coexistência na vagina de microorganismos produtores de penicilinase e ao pH vaginal (Teixeira et al., 1993; Martinez et al., 1994; Vergani et al., 2002).

A eritromicina é empregada como alternativa a penicilina, na erradicação da colonização vaginal de grávidas (Martinez et al. 1994; Gosling et al., 2002).

Face ao desconhecimento da prevalência deste microorganismo na cidade de Belém e à gravidade da infecção passível de benefícios profiláticos, avaliou-se a incidência de estreptococos do grupo B na flora vaginal de gestantes, acrescentando-se estas informações à escassa documentação nacional disponível, pois os pré-natais realizados em maternidades do Brasil, especificamente na cidade de Belém, não levam em conta o diagnóstico deste microorganismo.

2 OBJETIVO

Realizar o diagnóstico laboratorial de *Streptococcus agalactiae* em gestantes residentes na cidade de Belém, Pará, com vistas a verificar a incidência da bactéria, alertando a comunidade médica sobre a importância do seu diagnóstico no exame pré-natal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

O estudo foi realizado no período de fevereiro a agosto de 2002, em 50 gestantes no último trimestre de gravidez residentes e domiciliadas na cidade de Belém, Pará, procedentes do Setor de Tocoginecologia da UFPA.

As gestantes foram selecionadas voluntariamente para participação na pesquisa, e estavam realizando o pré-natal regularmente.

Foram considerados motivos de exclusão do projeto, aquelas que apresentavam patologia tocoginecológica ou sistêmica, diagnosticada pelos médicos responsáveis pelo Setor de Tocoginecologia da UFPA. No grupo pesquisado nenhuma paciente estava fazendo uso de medicação tópica ou sistêmica durante a gestação, exceto vitaminas. Todas estavam fora de trabalho de parto e com bolsa amniótica íntegra. As coletas foram realizadas antes do exame ginecológico, e as gestantes não tinham sido submetidas a este procedimento pelo período mínimo de 15 dias.

3.2 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O Setor de Tocoginecologia da UFPA está localizada na Rua Oliveira Bello, nº 395, na cidade de Belém, Pará. É um serviço que recebe em sua maioria, pessoas com um poder aquisitivo baixo, procedentes do Sistema Único de Saúde, com atendimento médio de 15 gestantes por dia.

3.3 AMOSTRAS

Para o diagnóstico laboratorial de *Streptococcus agalactiae* foi realizada a coleta da secreção do fundo do saco vaginal com swab vaginal estéril, com auxílio de espéculo vaginal (Moura, 1998).

Uma ficha de identificação clínico-laboratorial (Anexo 1) foi utilizada para a coleta de dados dos casos a serem estudados, os quais foram armazenados em um banco de dados do programa Microsoft Access[®].

Foram seguidas as seguintes recomendações na coleta das amostras:

1. A amostra constou de material do sítio real de infecção e coletada com o mínimo de contaminação dos tecidos, órgãos e secreções adjacentes;
2. Estabeleceu-se o momento ótimo para a coleta, com o objetivo de aumentar a possibilidade de isolamento dos microorganismos causadores da enfermidade (o paciente deve, de preferência, ir ao laboratório pela manhã, sem ter feito higiene e não ter urinado pelo menos uma hora antes da coleta);
3. Foi obtida uma quantidade suficiente de amostra para realização das técnicas de cultivo solicitadas;
4. Foram utilizados dispositivos de coleta, recipientes de amostras e meios de cultura apropriados para assegurar o isolamento ótimo dos microorganismos.

3.4 LOCAL DE IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL

Após a coleta, as amostras foram levadas para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Pará, onde foram submetidas aos procedimentos descritos a seguir.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Imediatamente após a coleta do material biológico, foi confeccionado o esfregaço em lâmina e a semeadura realizado em meio de enriquecimento (Caldo Tioglicolato) para repique, mantido a temperatura ambiente e transportado ao laboratório. O tempo decorrido para o transporte do material biológico foi inferior a 3 horas (Pumarola, 1995; Moura, 1998; Koneman et al., 2001).

A seguir, foi realizada a coloração de Gram sobre o esfregaço, para identificação preliminar do gênero, evidenciando cocos gram-positivos pequenos, isolados, em pares ou em cadeias (Facklam & Washington, 1991; Pumarola, 1995; Moura, 1998).

O material semeado em caldo tioglicolato foi incubado em estufa a 37°C, por 24 a 48 horas e, posteriormente, repicado para placa de petri, contendo ágar sangue padrão (5% de sangue de carneiro com 4 mm de profundidade) que, também foi incubado em estufa a 37°C, por 24 a 48 horas (Raddi & Martins, 1991; Edwards & Baker, 1995; Pumarola, 1995; Kubota et al., 2002).

Após incubação, foi realizada a identificação das colônias por seus aspectos macroscópicos, caracterizada por coloração cinza, geralmente com mais de 2 mm de diâmetro, circundada por uma fraca zona de β -hemólise, que é facilmente distingüida da hemólise apresentada por outros estreptococos β -hemolíticos. A maioria das cepas de estreptococos do grupo B apresentaram β -hemólise apenas em profundidade (Edwards & Baker, 1995; Pumarola, 1995; Miura & Martin, 2001).

Foi realizada a coloração de Gram destas colônias, para confirmar o gênero (Figura 2) (Facklam & Washington, 1991; Moura, 1998; Koneman et al. 2001).

Após a confirmação morfológica, foi realizada a prova da catalase, que é negativa, caracterizando assim o, *Streptococcus sp* (Anexo 5). Como a colônia é β -

hemolítica realizou-se a prova da sensibilidade à bacitracina para identificação presuntiva dos estreptococos β -hemolítico do grupo A (sensível) (Anexo 6), e a da sensibilidade ao sulfametoxazol-trimetoprima, cujos grupos A e B são resistentes e os demais sensíveis (Anexo 6) (Tabela 1) (Raddi & Martins, 1991; Koneman et al., 2001; Khemaleelakul et al., 2002; Schoroeder, 2003).

A seguir, foi executada a identificação presuntiva do *S. agalactiae*, que hidrolisa o hipurato de sódio (Anexo 7), e secreta o fator CAMP, que produz uma ação hemolítica sinérgica com cepas de *Staphylococcus aureus* (cepa de *Staphylococcus aureus* cowan I (ATC 12598)) produtoras de hemolisina β , quando são semeadas em estrias perpendiculares em placas de ágar sangue (Anexo 8), não cresce em ágar bile-esculina o que ocorre com *Streptococcus* do grupo D (Anexo 9) (Tabela 1) (Raddi & Martins, 1991; Pumarola, 1995; Koneman et al., 2001; Miura & Martin, 2001).

Tabela 1 – Identificação de estreptococos β -hemolítico do grupo B.

Grupo	A	B	A, B, C Negativos	D
Reações				
Sensibilidade a bacitracina	+	-	-	-
Sensibilidade ao sulfametoxazol-trimetoprima	-	-	+	+
Hidrólise da bile esculina	-	-	-	+
Hidrólise do hipurato de sódio	-	+	-	-
CAMP	-	+	-	-

Fonte: Raddi *et al.*, 1991

3.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Para avaliação estatística dos resultados dos dados obtidos, foi empregado o teste do qui-quadrado com nível de significância de 5%, com auxílio do pacote estatístico Bioestat 2[®]

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

Segundo a resolução N°196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), foram obedecidos os critérios de preenchimento do Termo de Consentimento com assinatura do paciente ou responsável (menor de idade), autorizando a pesquisa, conforme modelo intitulado TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Anexo 2). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA (Anexo 3).

As grávidas participantes do estudo foram, primeiramente, esclarecidas sobre a natureza do estudo, seus objetivos e conseqüências, em linguagem clara e acessível pelo médico responsável, o qual foi instruído pelo pesquisador.

Após os esclarecimentos preliminares, as grávidas que concordaram, com o seu ingresso no estudo, receberam um termo de consentimento, sendo fornecidas todas as informações necessárias e maiores esclarecimentos.

No caso de resultados positivos, estes foram repassados a direção do Estabelecimento de Saúde envolvido na pesquisa para comunicação ao médico responsável, que se encarregou do tratamento adequado sem ônus aos pacientes participantes, de modo a assegurar a saúde e o bem estar dos mesmos.

4 RESULTADOS

Em um período de 7 meses, foram isolados *Streptococcus agalactiae* em 7 (14%) das cinquenta pacientes, que fizeram seus pré-natais no Tijolinho, Setor de Tocoginecologia da UFPa, na cidade de Belém, Pará, participantes deste estudo. O perfil epidemiológico das participantes, juntamente com os resultados de cultura para *Streptococcus agalactiae*, encontram-se descritos no Anexo 4.

4.1 Do Perfil das Gestantes

A idade média das pacientes pesquisadas foi de 23 anos (mínima de 14 anos – máxima de 44 anos), e o tempo de gravidez foi de 34 semanas (Anexo 4).

As gestantes foram distribuídas, segundo o número de gestações, em 3 grupos: primigestas (primeira gestação), secundigestas (segunda gestação) e multigestas (terceira gestação em diante). Das gestantes estudadas 29 (58%) eram primigestas, 14 (28%) secundigestas e 7 (14%) multigestas (Tabela 2).

TABELA 2 – Culturas positivas de *Streptococcus agalactiae*, considerando o número de gestações.

Número de Gestações	Número de Gestantes	%	Cultura Positiva	%
Primigestas	29	58	2	28.6
Secundigestas	14	28	5	71.4
Multigestas	7	14	0	0

Comparando-se as primigestas com as secundigestas não se observou diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Todas as pacientes estudadas tiveram procedência urbana (100%)

Os aspectos sócio-econômicos das participantes do estudo encontram-se incluídos no Anexo 4, onde os dados demonstram que das 50 gestantes analisadas, 29 não tinham filhos, 14 apresentavam apenas 1 filho, 5 apresentavam 2 filhos, 1 apresentava 3 e outra 4 filhos.

Destas, 34 gestantes eram solteiras e apenas 16 apresentavam-se casadas.

4.2 Resultado do Exame de Cultura

Das 7 pacientes com cultura positiva para *Streptococcus agalactiae* 1 apresentava idade dentro da faixa etária de 14-20 anos, 4 entre 21-30 anos, e 2 entre 31-44 anos (Tabela 3). Destas, 2 eram primigestas (28,6%) e 5 secundigestas (Tabela 2).

Os estreptococos isolados das 7 gestantes foram identificados como *Streptococcus agalactiae* (estreptococos do grupo B).

Os resultados das culturas microbiológicas são apresentados na Anexo 4.



Figura 2. Coloração de Gram de secreções vaginais. Mostrando cocos Gram-positivos em pares, sugestivas de estreptococos.

Fonte: Arquivo Pessoal.

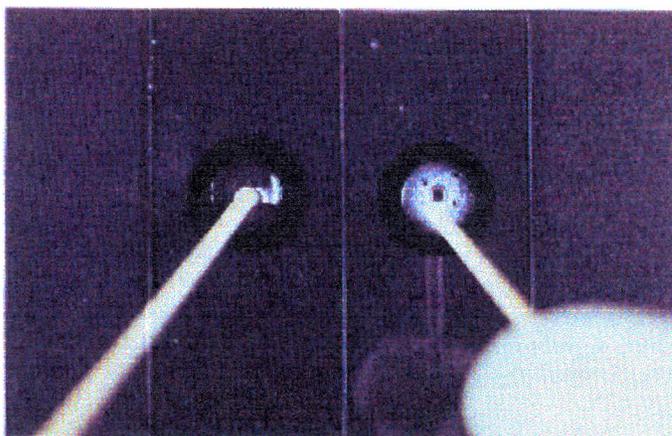


Figura 3. Prova da catalase. Catalase positiva (direita) e negativa (esquerda).

Fonte: Arquivo Pessoal.

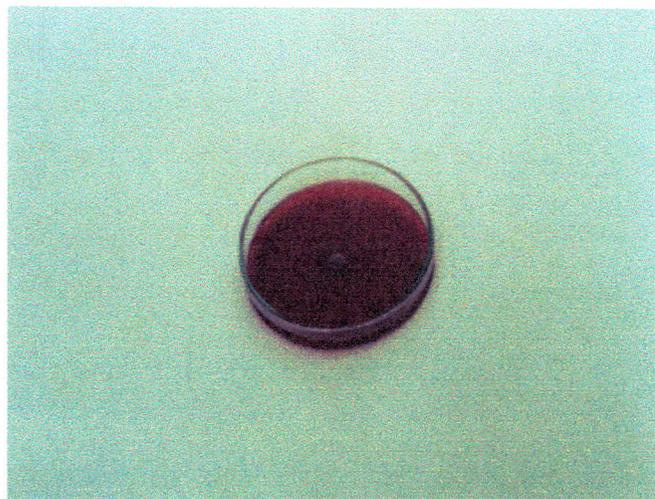


Figura 4. Teste de sensibilidade a bacitracina (resistente).

Fonte: Arquivo Pessoal.

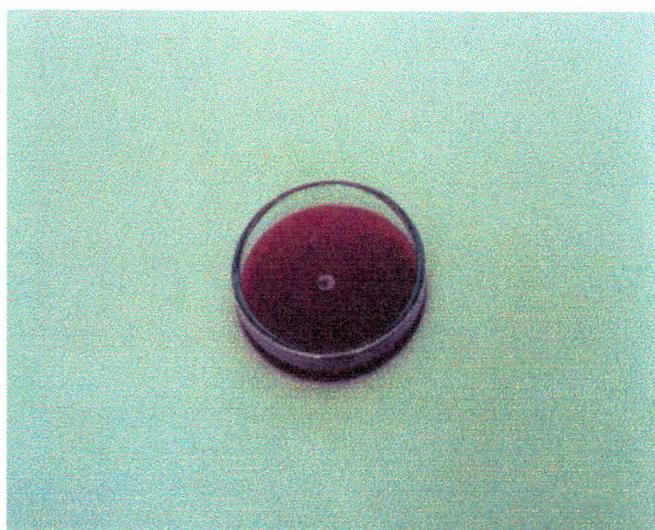


Figura 5. Teste de sensibilidade ao sulfametoxazol-trimetoprima (resistente).

Fonte: Arquivo Pessoal.

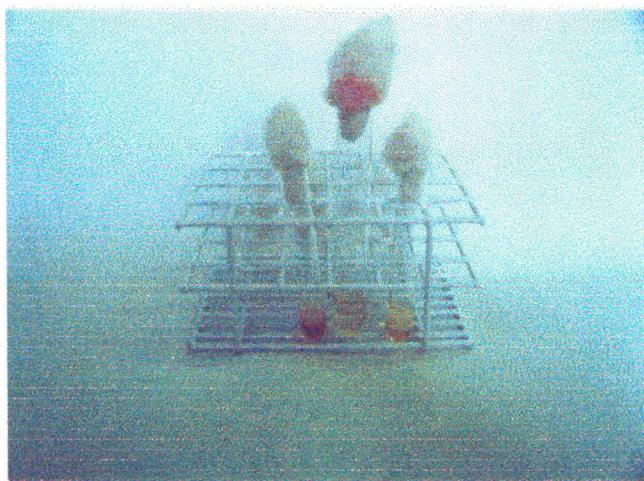


Figura 6. Teste da hidrólise do hipurato de sódio. Reação positiva (tubos à direita e esquerda) com precipitado abundante, e reação negativa (tubo central) sem precipitado.

Fonte: Arquivo Pessoal.

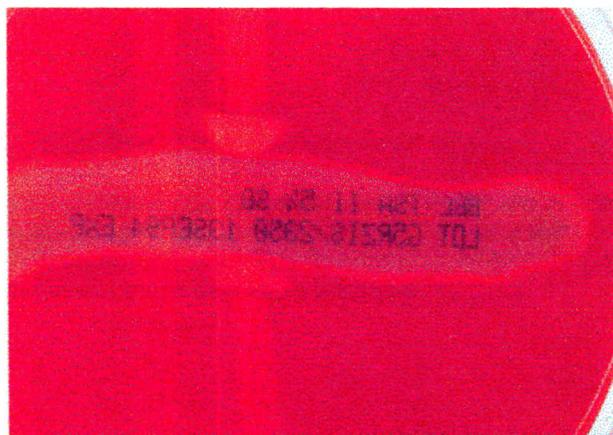


Figura 7. Teste de CAMP positivo. β -hemólise em forma de ponta de flecha.

Fonte: Arquivo Perssoal.



Figura 8. Teste da bile esculina positivo. Tubo apresentando coloração negra.

Fonte: Arquivo Pessoal.

TABELA 3 – Culturas positivas para *Streptococcus agalactiae*, considerando-se a faixa etária das pacientes.

Faixa Etária	Número de Gestantes	Cultura Positiva	%
14 – 20	20	1	14,3
21 – 30	25	4	57,1
31 - 44	5	2	28,6

Considerando-se todas as faixas etárias não se observou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a cultura positiva para *Streptococcus agalactiae*, após o emprego do teste G.

Ressalta-se que as gestantes com cultura positiva eram assintomáticas.

TABELA 4 – Condição sócio-econômica, segundo a faixa etária das participantes do estudo com cultura positiva para *Streptococcus agalactiae*.

Faixa Etária	<1 salário mínimo	1-3 salários mínimos	4-6 salários mínimos
14 – 20	0	1	0
21 – 30	0	4	0
31 – 44	0	1	0

A maioria das pacientes apresentavam renda de 1 a 3 salários mínimos, na faixa etária de maior incidência.

5 DISCUSSÃO

Por ser evidente a relação entre presença do *Streptococcus agalactiae* na flora vaginal, e a colonização do recém-nascido, parece lógico como primeiro passo para o estudo e compreensão da extensão do problema, determinar a percentagem de gestantes colonizadas.

Os resultados obtidos demonstram taxa de colonização por *Streptococcus agalactiae* de 14% no grupo populacional selecionado na cidade de Belém-PA. Outros trabalhos realizados no Brasil, como no Hospital das Clínicas de Porto Alegre, com taxas de 15%, em São Paulo de 17% de colonização e em Londrina 15%, corroboram com os resultados deste trabalho, indicando incidência preocupante no país, tornando-se necessária à adoção de medidas preventivas e corretivas. (Ferman et al., 1984; Mocelin et al., 1995; Miura & Martin, 2001).

A incidência mundial da colonização de gestantes pela bactéria não segue um padrão característico, como observado em determinadas patologias infecciosas, nas quais as condições sócio-econômicas desempenham papel fundamental na colonização e disseminação do microorganismo. Como exemplo na Inglaterra, estudo demonstrou incidência de 56% de colonização. Por outro lado, pesquisas conduzidas em diversas cidades dos Estados Unidos demonstraram incidência de 4,6% em Denver, 12% em Palm Beach, 17% em Atlanta e 12% em Houston, resultado que, a exceção de Denver, aproximou-se dos resultados obtidos neste estudo (Eickhoff et al., 1964; Franciosi et al., 1983; Ferman et al., 1984; Lewin & Amstey, 1991).

Na China, em Mogappair a taxa de colonização pela bactéria foi de 12,89%, em Monza, a Itália de 18%, na Tailândia de 6,22% e na Nova Zelândia de 22%. Ressaltem-

se os contrastes sócio-econômicos dos países citados, e a semelhança da incidência do microorganismo nas gestantes (Vergheze et al., 2001; Werawatakul et al., 2001; Grimwood et al., 2002).

Os resultados apresentados na Tabela 3, demonstram que a faixa etária, com maior incidência da colonização pela bactéria, foi dos 21 aos 30 anos. Tal fato, justifica-se pelo número de grávidas maior, os quais têm uma vida sexual mais ativa, e conseqüentemente, maior número colonização (Marinoff & Chinn, 2001; Manning et al., 2002).

Todos estes estudos demonstram que, a colonização no trato genital feminino por *Streptococcus agalactiae* ocorre na maioria dos continentes, não havendo distinção entre povos, e que atualmente, esta importância é confirmada por trabalhos atuais, alertando ainda mais, para o perigo que esta bactéria pode representar para os recém-nascidos (Raddi & Martins, 1991; Koneman et al., 2001; Blowey & Davis, 2002; Hoshima et al., 2002).

O grupo deste estudo consistia de cinquenta gestantes – 29 primigestas, 14 secundigestas e 7 multigestas. Das que apresentavam cultura positiva para *Streptococcus agalactiae*, observou-se duas primigestas (28,6%) e cinco secundigestas (71,4%), apresentando diferença estatística significativa ($p < 0,05$). A maior incidência encontrada foi entre as secundigestas. Isto se justifica, pelo fato, de que as secundigestas apresentavam idade maior do que as primigestas, conseqüentemente, vida sexual mais ativa, o que possibilita maior colonização (Gerard, et al., 1979; Blowey & Davis, 2002; Hoshima et al., 2002).

As gestantes com cultura positiva para *Streptococcus agalactiae* eram assintomáticas, fato comprovado em outros dados da literatura, que consideram o *Streptococcus agalactiae* um representante da flora vaginal, sendo encontrado em menor

número em orofaringe, trato urinário e em região anal. Sendo que a importância da infecção está relacionada ao recém-nascido (Ferman et al., 1984; Mocelin et al., 1995; Hoshima et al., 2002).

As gestantes com cultura positiva eram 3 jovens com idade inferior a 26 anos e quatro adultos com idade superior a 29 anos, tendo a idade variada de, 18 a 44 anos, o uso de testes estatístico demonstram diferenças significativas nas faixas etárias, dado que não está de acordo com a literatura, pois esta mostra uma maior incidência entre jovens menores de 25 anos, este resultado caracteriza a colonização na região, de mulheres com baixa e média idade. Fato, também relacionado as condições sócio-econômicas das participantes deste estudo, conforme a renda mensal média relatada durante as entrevistas, constantes no Anexo 4 (Gerard et al., 1979; Ferman et al., 1984; Kubota et al., 2002).

A metodologia analítica empregada neste estudo foi de fácil execução, adequada satisfatoriamente aos objetivos propostos, baixo custo com facilidade operacional, o que a recomenda para uso na rotina da pesquisa desta bactéria nas gestantes.

Os resultados deste estudo alertam para a necessidade de implantação de medidas preventivas e curativas das infecções por *Streptococcus agalactiae* através do diagnóstico, e principalmente a prevenção (Ferman et al., 1984; Noya & Baker, 1992; Mocelin et al., 1995; Hoshima et al., 2002).

A avaliação dos questionários aplicados as pacientes indicam que, o *Streptococcus agalactiae*, ainda não é devidamente valorizado no estudo etiológico dos processos infecciosos que acometem os recém-nascidos na cidade de Belém, Pará. Contudo, o resultado encontrado neste trabalho indica que, este microorganismo deve desempenhar papel relevante nas infecções nesta faixa etária. Assim sendo, através da inclusão no pré-natal, recomenda-se a pesquisa sistemática do *Streptococcus agalactiae* na

secreção de gestantes, entre a 28^a a 40^a semana, para, nos casos positivos, realizar o tratamento da gestante e a pesquisa no recém-nascido, logo após o nascimento, além do rigoroso seguimento clínico na primeira semana.

O último trimestre de gestação (28^a a 40^a semana de gestação) é o período adequado para identificação do *Streptococcus agalactiae*, pois otimiza o valor preditivo para colonização no parto, minimiza o tempo durante o qual nova contaminação pode ocorrer e permite a identificação de mulheres infectadas com parto prematuro (Noya & Baker, 1992; Mocelin et al., 1995)

6 CONCLUSÃO

A incidência de *Streptococcus agalactiae* neste estudo foi de 14%.

A idade média das gestantes colonizadas foi de 29 anos.

A renda familiar média das gestantes colonizadas foi de 2 salários mínimo.

As gestantes com cultura positiva eram assintomáticas.

A facilidade da colheita do material para a pesquisa dos estreptococos do grupo B e o bom resultado do método laboratorial, obtido através da cultura bacteriológica, e que fornece o resultado em 72 horas, de fácil realização e baixo custo, demonstram a aplicabilidade desta técnica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALGER LS, LOVCHIK JC, HEBEL JR, BLACKMAN LR, GRENSHAW MC: The association of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and group B streptococci with preterm rupture of the membranes and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 159:397-404, 1988.

American College of Obstetricians and Gynecologists and American Academy of Pediatrics: Group B streptococcal infections. An obstetrical viewpoint *Pediatrics* 11:148-149, 1993.

BACHRACH G, LEIZEROVICI-ZIGMOND M, ZLOTKIN A, NAOR R, STEINBERG D: Bacteriophage isolation from human saliva. *Lett Appl Microbiol* 36(1): 50-3, 2003.

BAKER CJ: Immunization to prevent group B streptococcal disease: Victories and vexations. *J Infect Dis* 161:917, 1990.

BALDY JLS: Streptococcias. In Veronese R, Focaccia R (eds), *Tratado de Infectologia* 8ª ed, pp 654-688. São Paulo, Atheneu, 1996.

BARON EJ, FINEGOLD SM: Streptococci and Related Genera. In _____ (eds), *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 8ª ed, pp 333-349. ST. Louis, Mosby, 1990.

BASSI GE, SANTIAGO MF, NOVAES FILHO AA, MENDES CMF, FRANCISCO W: Infecções graves em recém-nascidos por bactérias do trato genital. *Rev Paul Med* 97:36, 1981.

BARRINGTON KJ: Group B streptococcal infection risk factors. *CMAJ* 167(6):625, 2002.

BATES CS, MONTAÑEZ GE, WOODS CR, VICENT RM, EICHENBAUM Z: Identification and characterization of a *Streptococcus pyogenes* operon involved in binding of hemoproteins and acquisition of iron. *Infect Immun* 71(3):1042-55, 2003.

BENITZ WE: Perinatal treatment to prevent early onset group B Streptococcal sepsis. *Semin Neonatal* 7(4):301-14, 2002.

BERKOWITZ K, REGAN JA, GREENBERG E: Antibiotic resistance patterns of group B Streptococci in pregnant women. *J Clin Microbiol* 28: 5-7, 1990.

BLOWEY RW, DAVIS JR: Increased incidence of *Streptococcus agalactiae*. *Vet Rec* 150(15):492, 2002.

CHRISTENSEN KK, DAHLANDER K, EKSTROM S, SVENNINGSSEN N, CHRISTENSEN P: Colonization of newborns with group B Streptococci: Relation to maternal urogenital carriage. *Scand. J Infect Dis* 13:23, 1981.

Committee on infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn: Guidelines for prevention of group B streptococcal (GBS) infection by chemoprophylaxis. *Pediatrics* 90 (5):775-778, 1992.

COYKENDALL AL: Classification and identification of the viridans streptococci. *Clin Microbiol Rev* 2:315.

DARLING LC: Standardization and evaluation of the CAMP reaction from the prompt presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material. *J Clin Microbiol* 1(2):171-174, 1975.

DE LA MAZA LM, PEZZLA MT, BARON EJ: Micrococcaceae. In _____ (eds), *Atlas de Microbiologia*, 1^a ed, pp 32-36. Porto Alegre, Artmed, 1999.

- DILLON HC JR, GRAY E, PASS MA: Group B streptococcal carriage and disease: a 6-year prospective study. *J pediatr* 110:31-36, 1987.
- DINGER J, MÜLLER D, PARGAC N, SCHWARZE R: Breast milk transmission of group B streptococcal infection. *Pediatr Infect Dis J* 21(6): 567-8, 2002.
- DUNN LA, MCMILLAN DJ, BATZLOFF M, ZENG W, JACKSON DC, UPCROFT JÁ *et al*: Parenteral and mucosal delivery of a novel multi-epitope M protein-based group A streptococcal vaccine construct: investigation of immunogenicity in mice. *Vaccine* 20(21-22): 2635-40, 2002.
- DURACK DT: The Streptococci. In Schaechter M *et al* (eds), *Mechanisms of Microbial Disease*, 3th ed, pp 205-217. Baltimore, U.S.A 1989.
- EDWARDS MS, BAKER CJ: *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus). In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4th ed, pp 1835-1845. New York, Churchill Livingstone, 1995.
- ESTUNINGSIH S, SOEDARMANTO I, FINK K, LÄMMIER C, WIBAWAN IW: Studies on *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Indonesia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49(4): 185-7, 2002.
- FACCHINETTI F, PICCININI F, MORDINI B, VOLPE A: Chlorhexidine vaginal flushings versus systemic ampicillin in the prevention of vertical transmission of neonatal group B streptococcus, at term. *J Matern Fetal Neonatal Med* 11(2):84-8, 2002.
- FACKLAM RR, WASHINGTON JA: Streptococci and aerococci. In Balows A *et al* (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed, pp 238-256. Wasnigton DC, American Society for Microbiology, 1991.

FERMAN BG, CARVALHO PR, ROCHA MLF, BELTRAME LMR: Prevalência de *Streptococcus agalactiae* em flora vaginal durante o último trimestre de gravidez. *Jornal de Pediatria (RJ)* 57(3):253-257, 1984.

FERRIERI P: Neonatal susceptibility and immunity to major bacterial pathogens. *Rev Infect Dis* 12(suppl 4):394-400, 1990.

FINN SC, HOLDEN FA: Observation and comments concerning the isolation of group B beta-hemolytic *Streptococci* from human sources. *CMA Journal* 103(5):249, 1970.

FRY RM: Fatal infections by Grupo B haemolytic streptococci. *Lancet* 1:199-201, 1938.

FUCHS PC: Multiple-inocula (Replicator) CAMP test for presumptive identification of group B Streptococci. *J Clin Microbiol* 7(2):232-233, 1978.

GERARD P, VERGHOTE DM, BACHY A, DUHAUT G: Group B streptococcal colonization of pregnant women and their neonatos. *Acta Pediatr Scand* 68(2):819-823, 1979.

GOSLING IA, STONE PR, GRIMWOOD K: Early-onset group B streptococcus prevention protocols in New Zeland public hospitals. *Aust N Z J Obstet Gynecol* 42(4):362-4, 2002.

GOTOFF SP: Group B streptococcal infections. *Pediatr Rev* 23(11):381-6, 2002.

GRIMWOOD K, STONE PR, GOSLING IA, GREEN R, DARLOW BA, LENNON DR *et al*: Late antenatal carriage of group B Streptococcus by New Zealand women. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 42(4):182-6, 2002.

HAMMOUD MS, THALIB L, MAIYEGUN SO: The epidemiology of group B streptococcal colonization among obstetrical and newborn populations in Kuwait. *Int J Gynecol Obstet* 76(3):315-6, 2002.

- HARRIS TO, SHELVER DW, BOHNSACK JF, RUBENS CE: A novel streptococcal surface protease promotes virulence resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. *J Clin Invest* 111(1):61-70, 2003.
- HIKITA T, ARAI K, INOKAMI T, KANDA Y, MATSUI K, HIDAKAS *et al*: A case of fulminant acute poststreptococcal glomerulonephritis showing mesangiolytic and crescent formation preceded by erysipelas. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 44(7):558-63, 2002.
- HOLMES RL, HARADA WA: Rapid method for identification of group B Streptococci in neonatal cultures. *J Clin Microbiol* 13:279-282, 1981.
- HOOD M, JANNEY AAS, DAMERON G: Beta-Hemolytic Streptococcus group B associated with problems of perinatal period. *Am J Obst Gynec* 82:809, 1961.
- HOSHINA K, SUZUKI Y, NISHIDA H, KANEKO K, MATSUDA S, KOBAYASHI *et al*: Trend of neonatal group B streptococcal infection during the last 15 years. *Pediatr Int* 44(6):641-6, 2002.
- HWANG MN, EDERER GM: Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B Streptococci. *J Clin Microbiol* 1(1):114-115, 1975.
- JAWETZ E & LEVINSON W *et al*: Cocos Gram Positivos In _____ (eds), *Microbiologia Médica e Imunologia*, 4^a ed, pp 64-68. Porto Alegre, Artes Médicas, 1998.
- JENG A, SAKOTA V, LI Z, DATTA V, BEALL B, NIZET V: Molecular genetic analysis of a group A Streptococcus operon encoding serum opacity factor and a novel fibronectin-binding protein, Sfbx. *J Bacteriol* 185(4):1208-17, 2003.
- JOKIPII A, JOKIPPI L: Presumptive identification and antibiotic susceptibility of group B Streptococci. *J Clin Path* 29:736-739, 1976.

KATZ VL, MOOS M-K, CEFALO RC: Group B streptococci: results of a protocol of antepartum screening and intrapartum treatment. *Am J Obstet Gynecol* 170:521-526, 1994.

KHEMALEELAKUL S, BAUMGARTNER JC, PRUSAKORN S: Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 94(6):746-55, 2002.

KIM NH, PARK JP, JEON SH, LEE YJ, CHOI HJ, JEONG KM *et al*: Purulent pericarditis caused by group G streptococcus as an initial presentation of colon cancer. *J Korean Med Sci* 17(4):571-3, 2002.

KONEMAM EW, ALLEN SD, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PC, WINN WCJr: Cocos Gram-Positivos Parte II: Estreptococos e Bactérias "Similares a Estreptococos" In _____ (eds), *Diagnóstico Microbiológico*, 5ª ed, pp 589-659. Rio de Janeiro, Medsi, 2001.

KUBBOTA T, NOJIMA M, ITOH S: Vaginal bacterial flora of pregnant women colonized with group B streptococcus. *J Infect Chemother* 8(4):326-30, 2002.

LANCEFIELD RC: A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 57:571-595, 1933.

LEE RM, EDERER GM: Evaluation of the hippurate hydrolysis test with enterococcal group D Streptococci. *J Clin Microbiol* 5(3):290-292, 1977.

LEVINE EM: Implementation of group B Streptococcus prevention strategy. *Am J Obstet Gynecol* 186(2):335, 2002.

LEWIN EB, AMSTEY MS: Natural history of group streptococcus colonization and its therapy during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 139 (5):512- 515, 1981.

Organización Panamericana de la Salud (OPS): Manual de Procedimientos. Aislamiento e identificación de estreptococos. Washington, 1980.

MAC DONALD SW: Localization of group B beta-hemolytic Streptococci in the female urogenital tract. *Am J Obstet Gynecol* 133(1):57-59, 1979.

MANNING SD, TALLMAN P, BAKER CJ, GILLESPIE B, MARRS CF, FOXMAN B: Determinants of co-colonization with group B streptococcus among heterosexual college couples. *Epidemiology* 13(5):533-9, 2002.

MARINOFF DN, CHINN A: Preventing recurrent second trimester group B streptococcus chorioamnionitis by intermittent prophylactic ampicillin. *Obstet Gynecol* 98(5 Pt2):918-9, 2001.

MARTINS LM: *Streptococcus e Enterococcus* In Trabulsi LR *et al* (eds), *Microbiologia*, 3ª ed. Pp 157-170. São Paulo, Atheneu, 1999.

MARTINEZ MA, OVALLE AG, GIGLIO MS, YURAC R, BECKER J, CAMPO E *et al*: Sensibilidad antimicrobiana de streptococcus agalactiae. *Rev Chil Infect* 11(3):168-171, 1994.

MARTINEZ MA, OVANDO IRS: Diagnostico de *Streptococcus agalactiae* (group B) de muestras vaginales. *Rev Chil Infect* 12(3):160-163, 1995.

McDUFFIE RS Jr, McGREGOR JA, GIBBS RS: Adverse perinatal outcome and resistant Enterobacteriaceae after antibiotic usage for premature rupture of the membranes and group B streptococcus carriage. *Obstet Gynecol* 82 (4 Pt 1):487-489, 1993.

MEYN LA, MOORE DM, HILLIER SL, KROHN MA: Association of sexual activity with colonization and vaginal acquisition of group B Streptococcus in nonpregnant women. *Am J Epidemiol* 155(10):949-57, 2002.

- MIRANDA ECBM, SILVA BM, OLIVEIRA BPR: Meningites In Leão RN (eds), *Doenças Infecciosas e Parasitárias, Enfoque Amazônico*, 1ª ed, pp 172-189. Belém, Cejup, 1997.
- MIURA E, MARTIN MC: Group B streptococcal neonatal infections in Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 43(5):243-6, 2001.
- MOCELIN CO, CARVALHO DAF de, BRITES C, CHRISTOFOLLI D, MOCELIN AO, FRACALANZA *et al*: Isolamento de *Streptococcus agalactiae* de gestantes na Região de Londrina-PR. *Ver Bras Ginec Obste* 17(9):915-918, 1995.
- MOREIRA MA: Infecção Puerperal In Leão RN (eds), *Doenças Infecciosas e Parasitárias, Enfoque Amazônico*, 1ª ed, pp 163-170. Belém Cejup, 1997.
- MORROW RJ: Debate over group B streptococcal recommendations. *CMAJ* 167(5):448-9, 2002.
- MOURA RA: Culturas de Material do Trato Geniturinário In Moura RA *et al* (eds), *Técnicas de Laboratório*, 3ª ed, pp 207-225. São Paulo, Atheneu, 1998.
- NETO SGK, MIRANDA ECBM, BRAZÃO RV: Sepsis In Leão RN (eds), *Doenças Infecciosas e Parasitárias, Enfoque Amazônico*, 1ª ed, pp 192-204. Belém, Cejup, 1997.
- NOCARD M, MOLLEREAU: Sur une mammite contagiense des vaches laitieres. *Ann Inst Pasteur* 1:109-126, 1887.
- NOYA FJD, BAKER CJ: Prevention of group B streptococcal infection. *Infectious Disease Clinics of North America* 6(1):41-55, 1992.
- PALACIOS SG, CALTENCO SR, TORRES LJ, TAPIA CR, MUÑOZ HO, SOLÓRZANO SF: Exposición a Estreptococo del grupo B en mujeres mexicanas en edad reproductiva. *Salud Publica Mex* 44(1):50-6, 2002.

- PAREDES A, WONG P, MASON EO JR: Nosocomial transmission of group B streptococci in a newborn nursery. *Pediatrics* 59:679-682, 1976
- PASNICK M, MEAD PB, PHILLIP AGS: Selectiva maternal culturing to identify group B streptococcal infection. *Am J Obst Gynecol* 138:480-484, 1980.
- PUMAROLA A: Streptococcus In Pumarola A *et al* (eds), *Microbiologia y Parasitologia Medica*, 2ª ed, pp 343-352. Barcelona, Mason, 1995.
- QUINLAN JD, HILL DA, MAXWELL BD, BOONE S, HOOVER F, LENSE JJ: The necessity of both anorectal and vaginal cultures for Group B *Streptococcus* screening during pregnancy. *The Journal of Family Practice* 49(5):447-448, 2000.
- RADDI MSG, LORENCETTI NC: Cervicovaginal aerobic microflora of women with spontaneous abortion or preterm delivery in Araraquara-Brazil. *Rev Microbiol* 29(4):311-313, 1998.
- RADDI MSG, MARTINS M do CD: *Streptococcus agalactiae* e gravidez. *Laes/Haes* 13(73):56-58, 1991.
- ROSS P: Group B Streptococcus. Profile of on organism. *J Med Microbiol* 18:139-66, 1984.
- ROUSE DJ, GOLDENBERG RL, CLIVER SP, CUTTER GR, MENNEMEYER ST, FARGASON CA Jr: Strategies for the prevention of early-onset neonatal group B streptococcal sepsis: a decision analysis. *Obstet Gynecol* 83(4):483-494, 1994.
- RUOF KL: Nutritionally variant streptococci. *Clin Microbiol Rev* 4:184, 1991.
- RUOF KL: *Streptococcus anginosus* ("Streptococcus milleri"): The unrecognized pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1:102, 1988.
- SCHROEDER BM: Diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. *Am Fam Physician* 67(4):880, 883-4, 2003.

SCHUCHAT A, OXTOBY M, COCHI S: Population based risk factors for neonatal group B streptococcal disease: results of a cohort study in metropolitan Atlanta. *J Infect Dis* 162:672-677, 1990.

SCHUCHAT A, ROOME A, ZELI ER, LINARDOS H, ZYWICKI S, O'BRIEN KL: Integrated monitoring of new group B streptococcal disease prevention program and other perinatal infections. *Matern Child Health J* 6(2):107-14, 2002.

SKLOVSKY E, BERTSCHINGER B, PROCIANOY RS: Colonização materna por streptococcus do grupo B (SGB). *Nota prévia J Ped* 52(6):387-388, 1982.

SLOTVED HC, SAUER S, KONRADSEN HB: False-negative results in typing of group B streptococci by the standard lancefield antigen extraction method. *J Clin Microbiol* 40(5):1882-3, 2002.

SPAETGENS R, DEBELLA K, MA D, ROBERTSON S, MUCENSKI M, DAVIES HD: Perinatal antibiotic usage and changes in colonization and resistance rates of group B streptococcus and other pathogens.

SZABÓ J, MOINÁR L, PÉCH E, LINTNER F, BOROS V: Experience in the screening of *Streptococcus* group B infection during pregnancy: can severe neonatal infection be prevented?. *Orv Hetil* 143(24): 1479-82, 2002.

TAÑO AMF, SILVA JLZ, CABRERA MS: Valoración de dos pruebas para la identificación presuntiva de estreptococos del grupo B. *Rev Cub Hig Epid* 22(3):352-359, 1984.

TEIXEIRA LA, FIGUEIREDO AMS, BARRETO JLP, BENCHETRIT LC: A new médium for group B streptococcal enrichment that can detect the bacteria in heavily colonized women. *Rev Microbiol* 24(4):275-277, 1993.

- TUOMANEN EI, AUSTRIAN R, MASURE HR: Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med* 332:1280, 1995.
- UDO EE, AL-SWEIH N, PHILLIPS AO, CHUGH TD: Species prevalence and antibacterial resistance of enterococci isolated in Kuwait hospitals. *J Med Microbiol* 52(Pt 2):163-8, 2003.
- VERGANI P, PATANÈ L, COLOMBO C, BORRONI C, GILTRI G, GHIDINI A: Impact of different prevention strategies on neonatal group B streptococcal disease. *Am J Perinatal* 19(6):341-8, 2002.
- VERGHESE S, PADMAJA P, ASHA M, ELIZABETH ST, KUNDAVI KM, VARMA T: Vaginal carriage of group B Streptococcus in infertile women. *Indian J Pathol Microbiol* 44(1):37-9, 2001.
- WEBB PD, HANDLEY V, FRASER JD: Two novel superantigens found in both group A and group C Streptococcus. *Infect Immune* 71(3):1361-9, 2003.
- WEISMAN LE, STOLL BJ, CRUESS DF: Early-onset group B streptococcal sepsis: a current assessment. *J Pediatr* 121:428-433, 1992.
- WERAWATAKUL Y, WILAILUCKANA C, TAKSAPHAN S, THINKUMRUP J, PRAGARASUNG M, CHOUWAJAROEN P *et al*: Prevalence and risk factors of *Streptococcus agalactiae* (group B) colonization in mothers and neonatal contamination at Srinagerind Hospital. *J Med Assoc Thai* 84(10):1422-9, 2001.
- YAGUPSKY P, MENEGUS MA, POWELL KR: The changing spectrum of group B streptococcal disease in infants: an eleven-year experience in a tertiary care hospital. *Pediatr Infect Dis J* 10:801-808, 1991.

YANCEY MK, DUFF P: An analysis of the cost-effectiveness of selected protocols for the prevention of neonatal group B streptococcal infection. *Obstet Gynecol* 83(3):367-371, 1994.

ZUAZO SJL: Infección estreptocócica en una población escolar primaria. *Rev Cub Trop* 32(2):131-144, 1980.

ZUAZO SJL: Los estreptococos como agentes etiológicos de patología ginecobstétrica y neonatales. *Bol Epid (INHEM)* 2(2):11, 1980.

ANEXO

ANEXO 1 – Ficha de identificação clínico-laboratorial.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

PROJETO: Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em gestantes em Belém –
Pará.

FICHA PROTOCOLO

FICHA Nº _____

DATA ___/___/___

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Cor: () Sexo: () Idade: ____ Data de Nascimento: ___/___/___

1 Naturalidade: _____ **Procedência:** _____

Endereço atual: _____

Fone: _____

Contato/Referência: _____

2 Fone: _____

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Casada: Sim () Não ()

Filhos: Sim () Não ()

Nº de Filhos: _____

Grávida: Sim () Não ()

Tempo de Gravidez: _____

Renda Familiar: _____

Medicação: _____

DADOS SOBRE O MATERIAL COLHIDO

Data da Coleta: ___/___/_____

Tipo de Material: _____

Características: _____

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Resultado: _____

ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em gestantes em Belém – Pará.

Você está recebendo uma solicitação para participar voluntariamente de uma pesquisa que procura investigar laboratorialmente a **presença de uma bactéria (ser vivo microscópico) em suas partes íntimas (vagina e vulva)**, procurando, com isso, **prevenir possíveis doenças ao seu filho, ocasionadas pela contaminação na hora do parto**. Para isso, faremos a seguir alguns esclarecimentos:

1. A bactéria “*Streptococcus agalactiae*” é um ser que vive naturalmente na região do ânus (bunda) e que pode passar para a vagina.
2. Essa passagem pode ocasionar em algumas mulheres inflamações microscópicas, mas somente sendo notada por exame laboratorial.
3. Quando de uma gravidez (prenhez), há o risco do bebê se contaminar na hora do parto. Isso pode ocasionar septicemia (infecção que chega aos órgãos) ou meningite (infecção da meninge – membrana do cérebro) e levar a danos irreversíveis dos órgãos atingidos ou, na grande maioria à morte.
4. Para evitar danos ao bebê, há necessidade de se realizar um exame laboratorial que diga se essa bactéria está ou não na sua vagina.
5. Esse exame consiste em coletar de sua vagina uma secreção que será examinada em aparelho microscópico, com a finalidade de identificar a presença do “*Streptococcus agalactiae*”.
6. O material coletado de você, após o uso para pesquisar o “*Streptococcus agalactiae*” será descontaminado e descartado. O material não será reutilizado para outra finalidade.
7. O resultado desse exame será informado por seu médico ginecologista que, se for positivo fará o tratamento adequado.
8. Esse tratamento consiste em administrar na veia o antibiótico “ampicilina”, no momento mais adequado ao seu bebê, definido por seu médico conjuntamente com você..
9. A pesquisa não implica, em princípio, em riscos graves a você ou ao bebê, uma vez que a coleta ocorrerá no último mês de sua gestação. Todo cuidado será tomado para não haver contaminação sua e/ou do seu bebê. Para isso, será usado material descartável (estéril) e será realizada a coleta pelo médico ginecologista de sua confiança – Dr. Jorge O. Vaz (End: Tv. Curuzú, 446, Ap-104, Pedreira, CEP: 66085-110, Belém-Pará, fone: 233-2805 e 9985-8686).
10. Se você aceitar participar da pesquisa poderá estar evitando problemas da maior gravidade à saúde do bebê e assim beneficiar sua família com uma boa saúde.
11. Garantimos a você que todas as informações que você fornecer, ao estudo, bem como seu material coletado será mantido no mais absoluto sigilo. Seu nome ou informações que lhe compromete, não será mencionado. Seus dados serão estudados de forma estatística.
12. No caso de haver algum acidente que provoque danos a vocês, lhe asseguramos que os mesmos serão amparados pelos responsáveis pelo projeto.

13. Você é inteiramente livre para participar ou não deste estudo. Se durante o período da pesquisa você decidir retirar sua participação lhe garantimos que não haverá nenhuma de represália, pois você é totalmente livre para participar ou não de nossa pesquisa. Se você não se sentir segura, procure orientação com pessoas de sua confiança ou mesmo os pesquisadores deste estudo.

Estamos prontos para atendê-lo a qualquer momento nos endereços e telefones:

KLEBER DIAS RIBEIRO
END: BR-316, KM-01, AL. ANABIJÚ,
068, AP-403, BL-B, CASTANHEIRA,
CEP: 67010-090, FONE: 235-5358 e
9144-4468.

JORGE O. VAZ
END: TV. CURUZÚ, 446,
AP-104, PEDREIRA,
CEP: 66085-110, FONE: 233-
2805 e 9985-8686.

Belém, ____ / ____ / ____

Kleber Dias Ribeiro
Pesquisador responsável
Farmacêutico-Bioquímico

Jorge O. Vaz
Médico

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Declaro que li as informações sobre a pesquisa intitulada de **Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em gestantes em Belém – Pará** e que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, ____ / ____ / ____

Paciente sujeito da pesquisa

ANEXO 3 – Parecer de ética de projeto de pesquisa envolvendo seres humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS -CEP¹

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. PROTOCOLO Nº: 025/00
2. DATA DE ENTRADA: 29/12/00
3. PROJETO DE PESQUISA: Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em gestantes em Belém – PA
4. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Kleber Dias Ribeiro
5. INSTITUIÇÃO / UNIDADE: DPTO. DE FARMÁCIA/UFPA
6. DATA DO PARECER: 22/06/01

PARECER

Após análise detalhada do projeto intitulado Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em gestantes em Belém – PA, e, considerando as normas estabelecidas na Resolução 196/96 do CNS, a Comissão de Ética manifesta-se por aprovar este projeto.

Parecer: *Aprovado.*

Belém, 25 de junho de 01.

Maria da Conceição Nascimento Pinheiro
Coordenadora da CEP/NMT/UFPA.

¹ Av. Generalíssimo Deodoro, 92, Umarizal, Belém – PA – CEP 66255-240
Fone/Fax: (0xx91) 241-0032; (0xx91) 241-9864 – Fone: (0xx91) 215-2311

ANEXO 4 – Tabela 5. Aspectos Epidemiológicos e Clínico-Laboratorial das participantes do estudo.

Paciente*	Idade (anos)	Estado Civil	Renda Familiar (salário mínimo)	Número de Filhos	Tempo de Gravidez (Semanas)	Data da Coleta	Cultura
EBA	19	Solteiro	3	00	38	20/03/2002	-
MOC	18	„	1	„	30	27/03/2002	-
CPS	22	Casado	2.5	„	34	„	-
ILCA	21	Solteiro	3	„	38	03/04/2002	-
JFN	28	„	2	„	37	10/04/2002	-
CPS	23	„	5	„	30	„	-
LPD	19	„	1	„	36	„	-
CCCV	18	„	2	„	37	„	-
ACGF	32	Casado	1	„	„	17/04/2002	-
JCB	40	„	1	01	„	„	-
NBO	29	„	1	01	38	„	-
ESB	18	Solteiro	2	00	34	„	-
JSJC	23	„	1	02	37	„	-
LFLR	22	„	2	00	33	„	-
VCC	19	„	1	01	36	„	-
ECSN	17	„	3	00	33	24/04/2002	-
DSS	23	Casado	3	03	35	„	-
ECL	15	„	2	00	34	15/04/2002	-
ACM	20	Solteiro	1	„	35	22/05/2002	-
ROC	22	„	1	01	38	„	-
FPS	26	„	1	02	34	„	-
CSB	19	Casado	8	00	„	„	-
DDS	32	„	1	01	33	„	+
ERB	30	„	3	04	34	05/06/2002	-
MRL	25	Solteiro	2.5	00	30	„	-
CCCS	30	Casado	1	„	„	„	+
LFC	18	Solteiro	2	„	34	06/05/2002	+
LMM	25	Casado	1	01	„	12/06/2002	+
BP	23	Solteiro	2	„	„	„	-
OGSB	19	Casado	1	„	„	„	-
MSCS	24	„	1	„	„	„	+
VAS	27	Solteiro	1	„	35	„	-
MSS	25	„	8	00	30	„	-
AAGP	21	„	2	„	37	„	-
LSC	17	Casado	1	„	34	„	-
LLT	30	Solteiro	2.5	„	„	03/07/2002	-
DJOM	30	„	3	02	33	„	-
DBN	16	„	1	00	30	„	-
LCSC	28	„	3	02	35	„	-

MSMP	44	Casado	5	01	34	„	+
ESF	27	Solteiro	3	00	29	07/08/2002	-
ASS	24	„	3	„	30	„	-
MRFA	20	„	4	02	35	14/08/2002	-
ENC	18	Casado	3	00	34	21/08/2002	-
ANMS	22	Solteiro	1	01	„	„	-
MTS	15	„	2	00	30	„	-
JSF	20	„	3	„	31	28/08/2002	-
LMS	14	„	2	„	34	„	-
MNPC	30	„	2	01	35	04/09/2002	+
EGCL	19	„	4	„	37	„	-

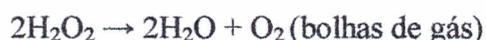
Nota: * Iniciais

ANEXO 5 – Prova da catalase

1. Princípio

A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. É uma hemoproteína com estrutura similar à hemoglobina, exceto que os quatro átomos de ferro de sua molécula estão no estado oxidado (Fe^{3+}), em vez do estado reduzido (Fe^{2+}). A não ser pelos estreptococos, a maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas possui atividade de catalase.

O peróxido de hidrogênio é formado como um dos produtos finais de oxidação do metabolismo aeróbio dos carboidratos. O acúmulo é letal para as células bacterianas. A catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, segundo a seguinte reação:



A prova da catalase é utilizada com frequência para diferenciar membros da família Micrococcaceae de membros da família Streptococcaceae.

II. Reagentes

- A. Peróxido de hidrogênio a 3% conservado em frasco âmbar sob refrigeração.
- B. Cultivo de 18 a 24 horas do microrganismo em estudo.

III. Controle de Qualidade

O reagente peróxido de hidrogênio deve ser avaliado com microrganismo-controle negativo e positivo, todos os dias ou logo antes da análise de bactérias desconhecidas.

- A. Controle positivo: *Staphylococcus aureus*.
- B. Controle negativo: espécie de *Streptococcus*.

IV. Procedimento

1. Com um filamento de inoculação em agulha ou com um palito de madeira transferir parte do centro de uma colônia para uma lâmina.
2. Adicionar uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% e observe a formação de bolhas.

V. Interpretação dos Resultados

O aparecimento rápido e a produção sustentada de bolhas de gás ou efervescência constituem reação positiva. Como algumas bactérias possuem outras enzimas que não a catalase e que podem decompor o peróxido de hidrogênio, a observação de umas poucas bolhas pequenas após 20 a 30 segundos não é considerada como resultado positivo. Além disso, como os eritrócitos possuem catalase, deve-se cuidar para não transportar eritrócitos junto com as células da colônia.

ANEXO 6 – Prova de sensibilidade a bacitracina e ao sulfametoxazol-trimetoprima.

I. Princípio

A sensibilidade a baixas concentrações do antibiótico polipeptídico bacitracina e à combinação de sulfonamidas sulfametoxazol-trimetoprima (SXT) proporciona um método sensível e econômico para identificação presuntiva de estreptococcus β -hemolítico do grupo A e B. Embora ainda utilizada em muitos laboratórios, essa prova vem sendo amplamente substituída por procedimentos sorológicos confiáveis e mais econômicos.

Os estreptococos do grupo A são sensíveis a concentrações relativamente baixas de bacitracina e são resistentes ao SXT. Os estreptococos do grupo B são resistentes a ambos os antibióticos. Outros estreptococos β -hemolíticos apresentam sensibilidade variável à bacitracina, mas são usualmente sensíveis ao SXT. Portanto, a prova de SXT junto com a de bacitracina aumenta a sensibilidade e o valor prognóstico do teste de bacitracina.

II. Reagentes

- A. Ágar sangue de carneiro em placas.
- B. Discos diferenciais de bacitracina Taxo "A" (0,04 unidades/disco).
- C. Discos de SXT (sulfametoxazol-trimetoprima, 1,25 μ g/23,75 μ g).

III. Controle de Qualidade

- A. Bacitracina S, SXT R: estreptococcus do grupo A.
- B. Bacitracina R, SXT R: estreptococcus do grupo B.
- C. Bacitracina S ou R, SXT S: estreptococos β -hemolíticos, grupo C, F ou G.

IV. Procedimento

1. Colher três ou quatro colônias isoladas de estreptococos β -hemolíticos e estriar até o centro da metade de uma placa de ágar sangue.
2. Com auxílio de um *swab* esterilizado ou uma alça, espalhar sobre toda a metade da placa.
3. Com auxílio de pinças esterilizadas, colocar um disco de bacitracina taxo "A" e um disco de SXT sobre a área semeada. Cuidar para que os discos fiquem uniformemente separados. Pressione os discos, com cuidado para melhor aderência à superfície do ágar.
4. Incubar a placa em ar ambiente a 35°C.

V. Resultados

A. Interpretação

1. Sensível (S): qualquer tamanho de halo ao redor de qualquer dos discos.
2. Resistentes (R): crescimento até a borda do disco.

Bacitracina	SXT	Identificação
S	R	Presumivelmente do grupo A
R	R	Presumivelmente do grupo B
S/R	S	Nem A nem B

3. Os resultados devem ser informados como “estreptococo β -hemolítico, presumivelmente do grupo A, por prova de bacitracina/SXT” ou “estreptococo β -hemolítico, presumivelmente não do grupo A, por prova de bacitracina/SXT”.

4. Como essas provas são realizadas com isolados de garganta, presumidos como estreptococos do grupo A, a suspeita de grupo B em geral não é informada.

VI. Limitações da Prova

Devem ser comprovados apenas os estreptococos β -hemolíticos, porque muitos estreptococos α -hemolíticos (incluindo pneumococos) são sensíveis a baixas concentrações de bacitracina.

Não existem dados disponíveis que indiquem a necessidade de medir os halos de inibição. A interpretação de sensibilidade ao SXT pode ser difícil, porque os microrganismos podem apresentar ligeiro desenvolvimento antes de haver inibição total do crescimento.

A camada de inóculo bacteriano deve ser confluenta. Um inóculo muito diluído pode permitir que os estreptococos não pertencentes ao grupo A pareçam sensíveis à bacitracina.

ANEXO 7 – Prova do Hipurato de Sódio.

Prova do hipurato de sódio.

Se utiliza o seguinte meio:

Caldo infusão de coração	25g
Hipurato de sódio	10g
Água destilada	1000g

Estereliza-se no autoclave durante 15 minutos a 121°C, logo utiliza-se 5 ml em tubo com tampa de rosca 15x125mm. Aperta-se a tampa para impedir a evaporação.

Acrescenta-se o seguinte reativo:

FeCl ₃ . 6H ₂ O	12g
HCl a 2% em água	100ml

(O HCl a 2% se prepara agregando 5,4 ml de HCl concentrado (37%) a 94,6 ml de água).

Descrição da prova

Inoculamos dois ou três colônias de estreptococos β-hemolíticos no meio descrito. incubamos os tubos a 37°C durante 20 horas ou mais. Após esse período, o caldo é centrifugado e o sobrenadante é recuperado. A um volume do sobrenadante (0,8ml) é adicionado reagente de cloreto férrico (0,2ml), ocorrendo, assim um precipitado abundante.

Interpretação

Se o precipitado espesso que se forma perdurar por mais de 10 minutos, significa que ocorreu a hidrólise do hipurato a ácido benzóico e glicina, resultado positivo; o ácido benzóico produzido se detecta por sua precipitação quando se acrescenta cloreto férrico.

Se o conteúdo do tubo clarear imediatamente, deve concluir-se que o hipurato não foi degradado, sendo o resultado negativo.

Ocasionalmente, ocorre reações mais fracas, em cujo caso o tubo do cultivo deve se reincubado durante outras 24 horas, depois deve-se repetir a prova.

As cepas que produzem resultados negativos, deve-se submeter-se, novamente a prova, depois de um período adicional de cultivo.



ANEXO 8 – Prova de CAMP

I. Princípio

A identificação presuntiva de estreptococos β -hemolíticos do grupo B pode ser realizada por meio da prova de CAMP, que é confiável e fácil de ser realizada. O fenômeno hemolítico foi descrito pela primeira vez em 1944 por Christie, Atkins e Munch-Petersen, cujos nomes deram origem ao acrônimo (CAMP) da prova.

A atividade hemolítica da β -hemolisina produzida pela maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* é intensificada por uma proteína extracelular formada por estreptococos do grupo B. A interação da β -hemolisina com esse fator produz “hemólise sinérgica”, que pode ser facilmente observada em uma placa de ágar sangue. Esse fenômeno é observado com isolados hemolíticos e não-hemolíticos de estreptococos do grupo B.

II. Materiais

1. Cepas de *Staphylococcus aureus* produtora de β -hemolisina.
2. Placa de ágar sangue de carneiro.

III. Controle de Qualidade

- A. Controle positivo: estreptococos do grupo B.
- B. Controle negativo: estreptococos do grupo A.

IV. Procedimento

1. Semear, em uma única linha reta, a cepa de *S. aureus* produtora de β -hemolisina no centro da placa de ágar sangue.
2. Cuidado para não tocar na estria de estafilococos, estriar o estreptococo a ser identificado em sentido perpendicular à estria do estafilococo. Realizar essas semeaduras de tal modo que, após incubação, o crescimento dos dois microrganismos não os junte. A estria de estreptococo deve ter 3 a 4 cm de comprimento. Na mesma placa devem ser semeadas, de forma similar, cepas conhecidas de estreptococos do grupo A e do grupo B como controles negativo e positivo, respectivamente.
3. Incubar a placa a 35°C em ar atmosférico durante 18 a 24 horas.

V. Resultados

A. Interpretação

A área de intensificação de lise é observada quando a β -hemolisina secretada por estafilococos e o fator CAMP secretado por estreptococos do grupo B se intersectam. Qualquer estreptococo β -hemolítico resistente à bacitracina, resistente ao SXT e positivo na prova de CAMP pode ser relatado como “estreptococo β -hemolítico presumivelmente do grupo B pela prova CAMP”.

VI. Limitações

Alguns estreptococos do grupo A são positivos para prova de CAMP quando a placa é incubada em jarra com vela, em atmosfera de CO₂ ou em condições de anaerobiose. Portanto, a incubação deve ser realizadas em condições aeróbias.

ANEXO 9 – Prova da bile esculina.

1. Princípio

A prova é baseada na capacidade de certas bactérias, em particular estreptococos do grupo D e espécies de *Enterococcus*, hidrolisarem esculina em presença de biliar (4% de sais biliares ou 40% de biliar). A esculina é um derivado glicosídico de cumarina (6-β-glicosídeo-7-hidroxicumarina). As duas moléculas do composto (glicose e 7-hidroxicumarina) estão unidas por uma ligação éster através do oxigênio.

As bactérias biliar-esculina-positivas são fundamentalmente capazes de crescer em presença de sais biliares. A hidrólise da esculina no meio resulta de formação de glicose e de um composto denominado esculetina. A esculetina, por sua vez, reage com íons férricos (fornecidos pelo componente inorgânico do meio, o citrato férrico), formando um complexo negro difusível.

II. Materiais

A. Meio de ágar biliar-esculina, preparado como ágar em tubos inclinados ou em placas, tem a seguinte composição:

Peptona	5g
Extrato de carne	3g
Oxgall (biliar)	40g
Esculina	1g
Citrato férrico	0,5g
Ágar	15g
Água destilada	11
pH = 7.0	

III. Controle de Qualidade

- A. Controle positivo: espécie de *Enterococcus* (p.ex., *E. faecalis*).
 B. Controle negativo: estreptococo viridans, não do grupo D.

IV. Procedimento

1. Com auxílio de filamento bacteriológico em anel ou agulha, semear duas ou três colônias morfológicamente similares de estreptococos na parte inclinada do ágar biliar-esculina com um movimento em S, ou estriar uma placa desse ágar para obter colônias isoladas.
2. Incubar o tubo ou a placa a 35°C durante 24-48 horas em estufa com ar atmosférico.

V. Resultados

A. Interpretação

O enegrecimento difuso de mais da metade da área inclinada do ágar em 24-48 horas indica hidrólise da esculina. Nas placas são observadas halos negros ao redor das colônias isoladas e qualquer grau de enegrecimento é considerado positivo. Todos os estreptococos do grupo D são bílis-esculina positivos dentro de 48 horas.

VI. Limitações da Prova

Alguns estreptococos do grupo viridans (cerca de 3%) podem hidrolisar a esculina em presença de bílis.

