

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Fernando Hartmann Barazzetti

Avaliação de diferentes protocolos para pesquisa de *Streptococcus agalactiae* por cultura, em gestantes atendidas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis
2019

Fernando Hartmann Barazzetti

Avaliação de diferentes protocolos para pesquisa de *Streptococcus agalactiae* por cultura, em gestantes atendidas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas
Orientador: Prof., Dra. Maria Luiza Bazzo
Coorientador: Dra. Mara Cristina Scheffer

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barazzetti, Fernando Hartmann

Avaliação de diferentes protocolos para pesquisa de Streptococcus agalactiae por cultura, em gestantes atendidas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina / Fernando Hartmann Barazzetti ; orientador, Maria Luiza Bazzo, coorientador, Mara Cristina Scheffer, 2020.

52 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Streptococcus agalactiae. 3. Meios de cultura. 4. Hospital Universitário. I. Luiza Bazzo, Maria . II. Cristina Scheffer, Mara. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Fernando Hartmann Barazzetti

Avaliação de diferentes protocolos para pesquisa de *Streptococcus agalactiae* por cultura, em gestantes atendidas no Hospital universitário da Universidade Federal de Santa Catarina

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Licenciado e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 16 de dezembro de 2019.

Prof. Dr. Carlos Zanetti
Coordenador do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:

Prof. Dra Maria Luiza Bazzo
Orientadora externa
Universidade Federal de Santa Catarina- CCS

Dr. Otto Henrique May Feuerschuette
Membro titular
Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago

Prof. Dr.a Jussara Kasuko Palmeiro
Membro titular
Universidade Federal de Santa Catarina

Msc. Maria Luiza Vieira e Vieira
Membro titular
Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago

Este trabalho é dedicado à minha esposa.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Viviane, companheira e guerreira que sempre esteve e está ao meu lado sem ela não conseguiria chegar até aqui.

Aos meus colegas de curso, companheiros nessa luta, que tantos momentos compartilhei ao longo destes anos de Universidade, principalmente pela cerveja nos bares da UFSC.

À professora Maria Luiza Bazzo que me deu uma oportunidade incrível, que é fazer parte do LBMMS, pelos ensinamentos e pelo crescimento profissional que o laboratório que tem me proporcionado.

À Mara, pelos ensinamentos, por me apresentar para a Professora Luiza e para o LBMMS, pela orientação e ajuda neste trabalho junto com a professora Luiza.

Ao Dr Otto e o residente Guilherme pela ajuda com a auto coleta e pela confiança depositada no estudo.

A todos meus colegas do LBMMS. Pelo convívio e pelos ensinamentos. Só tenho a dizer muito obrigado a todos vocês: Marcos, Juliano Lica, Jéssica, Manu, Felipe, Tai, Hanna, Renata, Eduardo, Luiz, Vitor, Clarice, Prim, Cida, Mirela, Álisson, Jussara e Mara.

Quero agradecer também a Cida e a todos funcionários do DACL, pelo convívio e pelas amizades feitas, já são quase cinco anos.

Ao pessoal da Microbiologia do HU, foram quase dois anos de um estágio incrível e de muito aprendizado. São muitas histórias pra contar, muito obrigado Marcio Gil, Juliano, Gustavo, Mattei, Karine, Malu, Seu Luiz e Gabriel. Obrigado a todos pela ajuda com este trabalho e pelo convívio.

Agradeço também a equipe de enfermagem da Clínica Ginecológica do HU, meu primeiro estágio, primeiro contado em um ambiente hospitalar e de muitos aprendizados também. Setor que fiz amizades e que me ajudou a escolher um rumo dentro da Biologia. Obrigado a enfermeira Andréia que fez a ponte com DACL e assim fui parar na Microbiologia. Obrigado também a Salete, Dona Sônia, Verônica, Adriana, Fátima.

Agradeço também a todos meus professores que tive durante o curso.

Agradeço a UFSC como um todo por me proporcionar essa experiência de vida, foram mais de cinco anos vivendo UFSC. Que venham mais anos assim.....

Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.

Isaac Newton

RESUMO

Streptococcus agalactiae ou *Streptococcus* do grupo B (EGB), pode ocasionar doenças graves, como meningite, septicemia e pneumonia em recém-nascidos, além de estar associado à prematuridade e ao abortamento. Aproximadamente 30% das mulheres grávidas podem estar colonizadas por EGB, sendo este um fator de risco para a transmissão vertical durante o trabalho de parto. Desde 2002 é preconizado o rastreamento universal entre a 35^a e 37^a semanas de gestação, com triagem microbiológica para detecção de colonização nas gestantes. A coleta adequada e o exame acurado são fundamentais para detecção de EGB. O presente estudo fez a comparação de protocolos laboratoriais utilizando diferentes composições de caldos de enriquecimento (Todd-Hewitt com colistina e com gentamicina), além do uso de meio cromogênico e do ágar sangue para detecção *S. agalactiae* nas gestantes atendidas no ambulatório e na emergência obstétrica do Hospital Universitário/UFSC. Foram utilizadas neste estudo 118 amostras de *swabs* anovaginais de pacientes atendidas entre a 35^a e 37^a semanas de gestação, incluindo 28 *swabs* provenientes de auto coleta das pacientes que aceitaram participar do estudo. Um total de 42 pacientes foram detectadas como colonizadas por *S. agalactiae* em pelo menos uma das metodologias. A reação de PCR detectou 40 pacientes colonizadas. A cultura utilizando ágar cromogênico e Todd Hewitt/colistina detectou 36 pacientes colonizadas, 35 positivas na combinação ágar sangue Todd Hewitt/colistina, 32 positivas na combinação ágar cromogênico e Todd Hewitt/gentamicina, e 28 amostras positivas na combinação ágar sangue e Todd Hewitt/gentamicina. Com este estudo sugerimos a utilização da combinação do Todd/colistina como meio cromogênico para uso no protocolo de rastreamento de EGB no setor de Microbiologia do HU/UFSC/EBSERH.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*, Todd-Hewitt-colistina, Todd-Hewitt-gentamicina, meio cromogênico para EGB, auto coleta.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae or Group B *Streptococcus* (GBS) can cause serious illnesses such as meningitis, septicemia and pneumonia in newborns, and may be associated with prematurity and miscarriage. Approximately 30% of pregnant women may be colonized by GBS, which is a risk factor for vertical transmission during labor. Since 2002, universal screening has been advocated between the 35th and 37th weeks of gestation, with microbiological screening to detect colonization in pregnant women. Proper collection and accurate examination are critical for GBS detection. The present study compared laboratory protocols using different enrichment broth compositions (Todd-Hewitt with colistin and gentamicin), as well as the use of chromogenic media and blood agar for detection of *S. agalactiae* in outpatient and emergency room pregnant women. University Hospital / UFSC. A total of 118 anovaginal swab specimens from patients seen at 35 to 37 weeks of gestation were used in this study, including 28 self-collecting swabs from patients who agreed to participate in the study. A total of 42 patients were detected as colonized by *S. agalactiae* in at least one of the methodologies. The PCR reaction detected 40 colonized patients. The culture using chromogenic agar and Todd Hewitt / colistin detected 36 colonized patients, 35 positive on the Todd Hewitt / colistin blood agar combination, 32 positive on the chromogenic agar and Todd Hewitt / gentamicin combination, and 28 positive samples on the blood agar and Todd Hewitt / combination. gentamicin. With this study we suggest the use of Todd / colistin combination as chromogenic medium for use in GBS screening protocol in HU / UFSC / EBSERH Microbiology sector.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, Todd-Hewitt-Colistin, Todd-Hewitt-Gentamycin, GBE Chromogenic Medium, Self-Collection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Teste de CAMP em placa de ágar sangue de carneiro.....	25
Figura 2. Fluxograma das etapas desenvolvidas no estudo.....	21
Figura 3: Subcultivo do swab anovaginal em meio cromogênico oriundas da mesma amostra clínica.....	30
Figura 4 Subcultivo de amostra oriunda de Todd/gentamicina em placa de ágar sangue de carneiro.....	31
Figura 5 Subcultivo em meio ágar sangue de carneiro oriundo da mesma amostra clínica.....	32
Figura 6 Gel representativo da amplificação do gene constitutivo <i>atr</i>	33
Figura 7. Fluxograma do protocolo proposto.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. Comparação da recuperação de EGB entre a auto coleta e a coleta realizada pelo profissional da saúde.....	29
Tabela 3 Comparação entre coleta feita pelo profissional e a auto coleta.	29
Tabela 4. Resultados da pesquisa de EGB pelas metodologias de cultura.....	29
Tabela 5 Concordância entre PCR e a cultura em Todd/colistina e meio cromogênico	34
Tabela 6 Concordância entre PCR e a cultura em Todd/gentamicina e meio cromogênico	34
Tabela 7 Concordância entre PCR e a cultura em Todd/colistina e meio ágar sangue	34
Tabela 8 Concordância entre PCR e a cultura em Todd/gentamicina e meio ágar sangue	35
Tabela 9 Sensibilidade, especificidade e VPP e VPN das metodologias de cultura comparadas com a PCR.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAMP – dos autores, Christie, Atkins, e Munch-Peterson

CDC – do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention* – Centro de Controle de Doenças e Prevenção/EUA

DACL – Divisão de Análises Clínicas

DNA – do inglês, *deoxyribonucleic acid* – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – do inglês, *ethylene-diamine-tetraacetic acid* – Ácido etilendiamino tetra-acético

EBSERH - Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares

EGB – Estreptococos do Grupo B

EOD – do inglês, *early onset disease* – Doença de início precoce

EUA – Estados Unidos da América

HU – Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago

IAP – do inglês, *Intrapartum antibiotic prophylaxis* – Profilaxia antimicrobiana intraparto

LBMMS – Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia

LOD – do inglês, *late onset disease* – Doença de início tardio

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos.....	19
3	JUSTIFICATIVA	20
4	METODOLOGIA.....	21
4.1	Fluxograma de trabalho	21
4.2	Tipo de estudo e amostragem	22
4.3	Coleta do material clínico	23
4.4	Etapa de enriquecimento	23
4.5	Etapa de subcultivo	24
4.6	Análise do crescimento em cultura e identificação de EGB	24
4.7	PCR para detecção de EGB.....	26
4.7.1	Extração de DNA.....	26
4.7.2	PCR para detecção do gene constitutivos	27
4.8	Análise estatística	27
5	RESULTADOS	28
5.1	Descrição das amostras	28
5.2	Auto coleta.....	28
5.3	Resultados da cultura.....	29
5.4	Identificação fenotípica das colônias sugestivas de <i>S. agalactiae</i>	30
5.5	Resultados da PCR do gene <i>atr</i>	32
5.6	Comparação entre as metodologias de cultura para pesquisada de <i>Streptococcus agalactiae</i>	33
6	DISCUSSÃO.....	35

7 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS	42
ANEXO A	47
ANEXO B	51
ANEXO C	52

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus agalactiae foi descrito em 1887 por Nocard e Mollereau, como um agente de mastite bovina. Em humanos as infecções por esta bactéria só foram relatadas cerca de 50 anos mais tarde, em meados da década de 1930 (BISHARAT et al., 2004). Em 1935 Lancefield e Hare fizeram a identificação de *S. agalactiae* em swabs vaginais (LE DOARE, 2013). É considerado um microrganismo oportunista, que coloniza o trato gastrointestinal e geniturinário de mais de 50% dos adultos saudáveis (JOHRI et al., 2006).

S. agalactiae, ou estreptococo do grupo B de Lancefield (EGB), é um coco gram positivo em forma de cadeias, geralmente beta hemolítico, encontrado como parte da microbiota de membranas mucosas humanas e coloniza principalmente os tratos geniturinário e intestinal, com potencial invasivo, especialmente no período perinatal, afetando mulheres grávidas e recém-nascidos, além de estar associado a infecções no período pós-parto, em pacientes idosos e/ou diabéticos (FIOLO et al., 2012). A partir da década de 1970, este microrganismo assumiu grande importância médica, como agente de doenças graves em recém-nascidos causando: meningite, septicemia, pneumonia, doença pulmonar crônica, perda da audição, perda da visão, paralisia cerebral e retardo mental (GRAY et al.2007; LEDGER, 2008). Nesse período, o microrganismo emergiu como principal causa infecciosa de morbidade e mortalidade neonatal de início precoce nos Estados Unidos, com taxa de mortalidade superior a 50% (VERANI et al., 2010; CRETI et al., 2013). Em gestantes, EGB tem sido associado a endometrite puerperal, corioamnionite e infecção urinária, além de prematuridade e abortamento (GIBBS et al., 2004). No mundo inteiro EGB está relacionado, a aproximadamente 319.000 casos de infecção invasiva (SEALE et al., 2019). No Brasil, devido à ausência de um programa de vigilância para EGB, não há dados epidemiológicos nacionais, somente dados de estudos regionais (BATTISTIN et al., 2018).

Aproximadamente 30% das mulheres grávidas podem estar colonizadas com EGB no reto e/ou vagina (CRETI et al., 2013). A colonização do trato gastrointestinal e geniturinário em gestantes, constitui o principal fator de risco para a infecção neonatal por transmissão vertical durante o trabalho de parto. EGB pode ser transmitido verticalmente da mãe para o filho durante a passagem pelo canal vaginal, ou quando o microrganismo ascende o trato genital alcançando o líquido amniótico, onde é aspirado ou ingerido pelo bebê (SCHUCHAT, 1998).

Na ausência de estratégias preventivas, cerca de 50% dos recém-nascidos de mães colonizadas por EGB, acabam colonizados nas mucosas e na pele, desses, 1 a 2% apresentarão infecções invasivas de início precoce. O microrganismo pode causar infecção e morte em cerca de 2% dos recém nascidos de mulheres colonizadas, quando não há profilaxia antibiótica intraparto (IAP - *Intrapartum antibiotic prophylaxis*) (LE DOARE, 20018; KIRSTY et al., 2018; BOYER, 1985; SCHUCHAT, 1996). Infecções por EGB durante o período neonatal que ocorrem nos primeiros sete dias de vida, são denominadas doença de início precoce (EOD - *early onset disease*). As manifestações mais comuns são sepse, pneumonia e meningite, com taxa de mortalidade de aproximadamente 50% (SCHURAG et al., 2002). Infecções de início tardio (LOD - *late onset disease*), podem ocorrer entre sete dias a 12 semanas após o nascimento, e são associadas à transmissão vertical de menor dimensão ou ao contato com equipes de assistência e familiares no hospital. A LOD se apresenta como meningite, além de infecções em tecidos, partes moles, articulações e ossos. As taxas de mortalidade são baixas, mas as sequelas neurológicas dos que sobrevivem são permanentes (TUROW; SPITZER, 2000).

Os fatores de virulência de EGB que influenciam na infecção e na transmissão do microrganismo da mãe para o feto e neonato, ainda não são completamente conhecidos. Recentemente, o complexo clonal de hipervirulência e proteínas de superfície, como a Alp, Rib e Pilus, foram associados ao aumento do risco de doença e também de persistência da colonização (LE DOARE, et al., 2018).

Na década de 1990 estudos clínicos demonstraram que a administração de antimicrobianos no trabalho de parto em gestantes colonizadas por EGB tem um papel importante na prevenção da EOD (MATORRAS et al., 1991). No entanto, apesar do sucesso da profilaxia intraparto para a prevenção da infecção no neonato, o número de casos de nascimento prematuro, natimorto e sepse de início precoce, associados a infecções por EGB, permaneceram elevados (VERANI et al., 2010; WESTON et al., 2011). Em 1996, o centro de controle de doenças e prevenção/EUA (CDC) publicou as primeiras diretrizes para a prevenção da infecção estreptocócica do grupo B no período perinatal (SCHUCHAT, A et al., 1996). Em 2002 o CDC reformulou essas diretrizes, as quais preconizaram o rastreio universal por cultura para prevenção de doenças neonatais causadas por EGB, recomendando a triagem microbiológica por cultura em meio seletivo de amostra anovaginal de gestantes entre a 35^a e 37^a semanas de gravidez para identificar as pacientes colonizadas pelo microrganismo e que receberam IAP.

Em 2010 as estratégias de prevenção foram atualizadas, sendo dadas novas orientações referentes ao uso racional dos antimicrobianos, triagem de urina e metodologias laboratoriais (VERANI, 2010). Alguns estudos indicam alterações na microbiota infantil em lactentes que são expostos à IAP e estudos recentes publicaram evidências que sugerem diferenças precoces na microbiota de bebês de baixo risco expostos à IAP em comparação com bebês não expostos e aqueles nascidos por cesariana (LE DOARE, et al., 2018). O protocolo do CDC padroniza a coleta de amostra anovaginal (anorretal e introito vaginal) por introdução de um *swab* estéril no introito vaginal, sem uso de espéculo, atingindo o seu terço inferior e girando para coletar um volume maior de secreção, em seguida o mesmo *swab* deve ser introduzido até 2,5 cm além do esfíncter anal externo para coleta da amostra anorretal. No laboratório, o *swab* deve ser inoculado em um tubo contendo meio de enriquecimento com antibiótico (caldo Todd Hewitt), e incubado em estufa bacteriológica (35 a 37°C) por 18 a 24 horas. O caldo deve ser subcultivado em ágar sangue de carneiro e após 18 a 24 horas de incubação, colônias sugestivas de *S. agalactiae*, caracterizadas pela presença de zonas de beta-hemólise ou ausência, devem ser selecionadas para identificação por métodos fenotípicos (SCHRAG et al., 2002; MCGEE et al., 2010). No entanto, cerca de 5 a 8% dos isolados de EGB não produzem beta-hemolisina, conseqüentemente suas colônias não apresentam beta-hemólise, podendo levar a resultados falsos negativos (DE LA ROSA et al. 1992; NICKMANS et al., 2012). Exames falso negativos resultam em pacientes colonizadas por EGB que não receberão profilaxia (GOINS et al.; VAN DYKE et al., 2009).

Meios alternativos foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar a sensibilidade do isolamento de EGB. O ágar granada, por exemplo, no qual as colônias de *S. agalactiae* que produzem um pigmento carotenoide (Granadaene) formam colônias de cor laranja, possibilita a identificação de EGB e diferenciação de outras bactérias. No entanto, o pigmento carotenoide é a mesma hemolisina produzida por EGB. Portanto, os isolados não hemolíticos também não são identificados em ágar granada. Contudo, o meio granada é considerado mais sensível que o ágar sangue para cultura de EGB (NICKMANS et al., 2012). Mais recentemente foram desenvolvidos meios seletivos para *S. agalactiae* as quais utilizam substratos cromogênicos para enzimas específicas do microrganismo, entre eles o ChromID Strepto B ou STRB (BioMérieux, França). O ágar STRB contém três substratos cromogênicos para enzimas específicas de EGB e a liberação desses substratos distintos resulta na formação de colônias com coloração cor-de-rosa a vermelho, facilmente visualizadas na inspeção de rotina. Os meios cromogênicos para EGB são considerados seletivos, inibindo o crescimento

de microrganismos de outras espécies, especialmente de bactérias gram negativas. Outras espécies gram positivas apresentam colônias de colorações distintas (violeta, azul ou incolor) (CRAVEN et al., 2010). Tazi e colaboradores (2008) e Robin e colaboradores (2010), relataram que o meio STRB recuperou mais EGB quando comparado ao ágar sangue de carneiro, gerando menos resultados falsos negativos (TAZI et al., 2008; ROBIN et al., 2010).

Mesmo com a utilização dos novos meios, a etapa de enriquecimento deve ser realizada para garantir maior sensibilidade de isolamento (MCGEE et al., 2010). O aumento no tempo para retorno dos resultados devido a etapa de enriquecimento não é considerado um problema, pois o rastreio universal é realizado precocemente, entre 35^a e 37^a semanas de gestação (GOINS et al.; VAN DYKE et al., 2009). Esse tempo de retorno dos resultados, devido a etapa de enriquecimento e de cultura, exige 36 a 72 horas e, quando utiliza ágar sangue de carneiro, requer um técnico experiente para realizar a identificação das colônias sugestivas nas culturas que nem sempre são beta-hemolíticas (BAKHTIARI, R. et al, 2012). Todas as etapas do processo laboratorial são críticas para o sucesso da caracterização do EGB (FIOLO, K. et al 2012).

O microrganismo pode também ser detectado por ensaios baseados em biologia molecular, como o da reação em cadeia da polimerase (PCR) (GAVINO, M., & WANG, E. 2007). Atualmente, diferentes métodos tanto para a extração como para a amplificação do DNA e a detecção de produtos de PCR são relatados na literatura (BERGSENG et al., 2007; WERNECK et al., 2009). Os métodos moleculares têm demonstrado maior sensibilidade para detecção de EGB quando comparados a métodos baseados em cultura (PICARD et al., 2004). Diversos métodos de diagnóstico molecular estão surgindo como potenciais candidatos para identificação mais rápida de mulheres colonizadas e de doença invasiva por EGB. A abordagem de diagnóstico molecular também possibilita investigar genes de resistência e fazer a sorotipagem do microrganismo simultaneamente (LE DOARE et al., 2018).

Devido a necessidade de identificar com acurácia as gestantes colonizadas por EGB para minimizar os problemas causados pelo microrganismo tanto para a gestante como para o recém-nascido, o presente trabalho visou avaliar diferentes protocolos para detecção de colonização por EGB em gestantes, no setor de Microbiologia da Divisão de Análises Clínicas - DACL do Hospital Universitário (HU/UFSC/EBSERH). O estudo comparou a eficácia da auto coleta da amostra anovaginal com a coleta tradicional por profissional de saúde. Além disso, testou a capacidade de recuperação de EGB utilizando diferentes formulações de caldo de enriquecimento, bem como de meios de subcultivo, comparando a

recuperação em ágar cromogênico com cultura tradicional em ágar sangue de carneiro. Os resultados da pesquisa foram utilizados para elaboração de um protocolo mais efetivo para detecção de EGB, visando sua implementação na rotina do laboratório e redução de resultados falso negativos nas análises realizadas no HU/UFSC/EBSERH.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar diferentes protocolos para pesquisa de EGB por cultura, em gestantes atendidas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a capacidade de recuperação de EGB em amostras obtidas por auto coleta, tendo como referência a coleta realizada por profissional de saúde;
- Comparar a capacidade de recuperação de EGB com a utilização de duas diferentes formulações de caldo de enriquecimento;
- Comparar a capacidade de recuperação de EGB, após enriquecimento em caldo Todd Hewitt em subculturas utilizando meio cromogênico e ágar sangue;
- Identificar fenotipicamente as colônias sugestivas de EGB, determinando a especificidade do ágar cromogênico;
- Avaliar a capacidade de amplificação do gene *atr* de EGB por PCR diretamente do meio de enriquecimento;
- Desenhar um protocolo de pesquisa de EGB mais efetivo, para a rotina do Setor de Microbiologia que apresente maior acurácia.

3 JUSTIFICATIVA

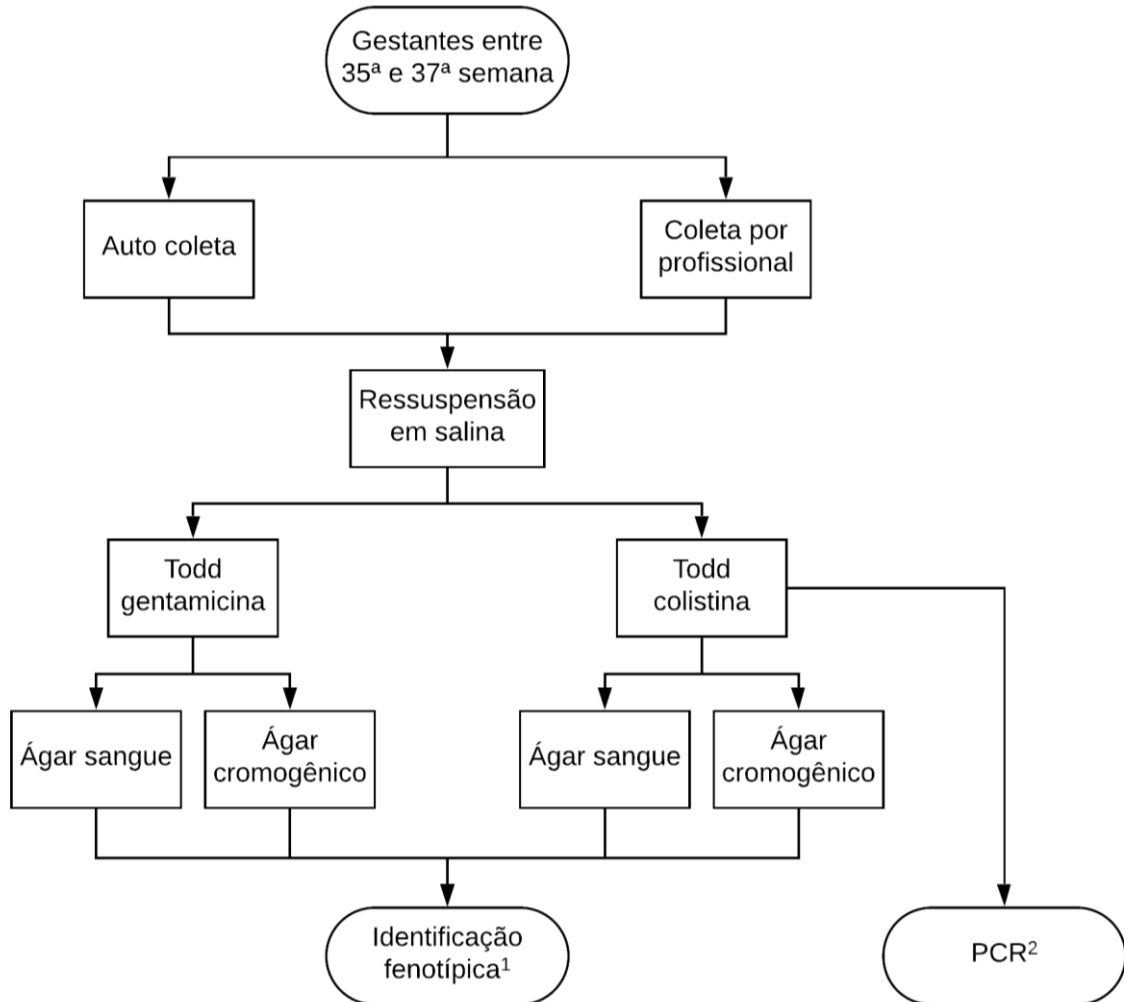
As diretrizes do CDC (2010) sugerem a utilização de caldo de enriquecimento com colistina ou gentamicina, e meios sólidos como ágar sangue, ágar granada ou ágar cromogênico para pesquisa de EGB no rastreio universal. No entanto, alguns autores afirmam que meios cromogênicos e caldo Todd Hewitt com colistina possibilitam maior recuperação de *S. agalactiae*, diminuindo o crescimento da microbiota que pode mascarar as colônias de *S. agalactiae* (KWATRA et al., 2013; MORITA 2014; LEBER 2016).

O presente estudo foi sugerido pelo setor de microbiologia da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário - DA CL HU/UFSC/EBSERH, onde se observou uma queda na positividade das pesquisas de EGB em gestantes atendidas no hospital. A porcentagem de gestantes colonizadas caiu de 29,9% no ano de 2017 quando o serviço utilizava o meio de enriquecimento com colistina, para 16,5% no ano de 2018, quando passou a utilizar o caldo Todd Hewitt com gentamicina. As hipóteses para a menor positividade observada, levantadas pelo setor e que foram testadas no presente estudo, incluem a superioridade do caldo de enriquecimento com colistina, utilizado em 2017 e não utilizado em 2018 no setor de microbiologia, e/ou deficiências relacionadas a coleta da amostra clínica, especialmente higiene realizada pela paciente antes da consulta médica.

4 METODOLOGIA

4.1 Fluxograma de trabalho

Figura 1. Fluxograma das etapas desenvolvidas no estudo.



¹Teste de catalase e teste de CAMP; ²PCR gene *atr*

4.2 Tipo de estudo e amostragem

Este é um estudo transversal analítico. O estudo utilizou amostras de *swab* anovaginal de gestantes atendidas no ambulatório do HU/UFSC/EBSERH, que estavam entre a 35^a e 37^a semanas de gestação para rastreamento universal de EGB, conforme preconizado pelo CDC (VERANI et al., 2010) e padronizado pelo Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, localizado no Campus Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis – SC. No período de abril a setembro de 2019, as gestantes atendidas pelo serviço, que foram submetidas no pré-natal à coleta padrão de amostra para pesquisa de EGB pelo profissional de saúde, foram convidadas a participar do estudo realizando também auto coleta da amostra anovaginal.

A participação das gestantes no estudo de auto coleta foi voluntária, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo A**). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) CAAE 09344119.7.0000.0121.

Critérios de inclusão:

- Gestantes com 18 anos ou mais, atendidas no serviço de ginecologia do HU/UFSC/EBSERH, entre a 35^a e 37^a semanas de gestação, cujo atendimento pré-natal de rotina solicitou pesquisa de EGB;
- Assinar o TCLE concordando em participar do estudo.

Critérios de exclusão:

- Gestantes menores de 18 anos;
- Gestantes que não concordaram em participar do estudo.

4.3 Coleta do material clínico

Para as amostras de auto coleta as pacientes foram instruídas a realizar a auto coleta em casa, pela manhã, ao acordar e antes de tomar banho, no mesmo dia da consulta médica. Na consulta pré-natal anterior elas foram convidadas a participar do estudo e receberam os materiais necessários para realização da coleta anovaginal, incluindo um folheto explicativo (**Anexo B**) e uma etiqueta para identificação do *swab* como amostra por auto coleta.

No momento da consulta, o profissional de saúde realizou coleta da amostra anovaginal, seguindo a rotina pré-estabelecida no Serviço, conforme as instruções descritas no Manual de Coleta de Microbiologia/DACL/HU, disponível na página do HU/UFSC/EBSERH: <http://www.hu.ufsc.br/setores/laboratorio/exames-realizados-no-hu/> (**Anexo C**).

Instrução de coleta anovaginal para pesquisa de EGB: Para a coleta do material foi introduzido um *swab* estéril alginatado no introito vaginal, sem uso de espécuro, atingindo o seu terço inferior do canal vaginal para coletar um volume maior de secreção. Em seguida o mesmo *swab* foi utilizado na coleta do material anal, sendo introduzindo até 2,5 cm além do esfíncter anal externo. Após a obtenção das amostras o *swab* foi inserido no tubo com meio de transporte Amies (Copan®, USA). O *swab* dentro do tubo com meio de transporte deve ser encaminhado ao laboratório de microbiologia dentro de 12 horas a temperatura ambiente, sendo processado imediatamente.

4.4 Etapa de enriquecimento

No laboratório de microbiologia cada *swab* foi colocado em um tubo contendo 500 µl de solução salina estéril 0,9%, que foi agitado em vortex durante um minuto. A solução salina foi dividida em duas alíquotas de 250 µl que foram inoculadas em dois frascos contendo caldo Todd-Hewitt; um com colistina (bioMérieux®, França), e outro com gentamicina (Plastlabor, Brasil). Após a inoculação, os frascos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C +/- 1°C em atmosfera de CO₂ por 18-24 horas.

4.5 Etapa de subcultivo

Após o enriquecimento, cada frasco foi homogeneizado em vortex e utilizando alça calibrada estéril de 1 µl, realizou-se semeadura por esgotamento em uma placa de ágar cromogênico e em uma placa de ágar sangue de carneiro. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C +/- 1°C, por 18-24 horas, as placas de ágar sangue de carneiro em atmosfera de CO₂ e as placas de ágar cromogênico em atmosfera ambiente, seguindo as instruções do fabricante.

4.6 Análise do crescimento em cultura e identificação de EGB

A rotina de identificação de EGB baseou-se em técnicas microbiológicas clássicas, compreendendo as características das colônias, principalmente a presença de beta hemólise em ágar sangue de carneiro, ou a coloração típica em ágar cromogênico, prova da catalase e teste CAMP (WINN WC JR, 2006; VERSALOVIC, 2011).

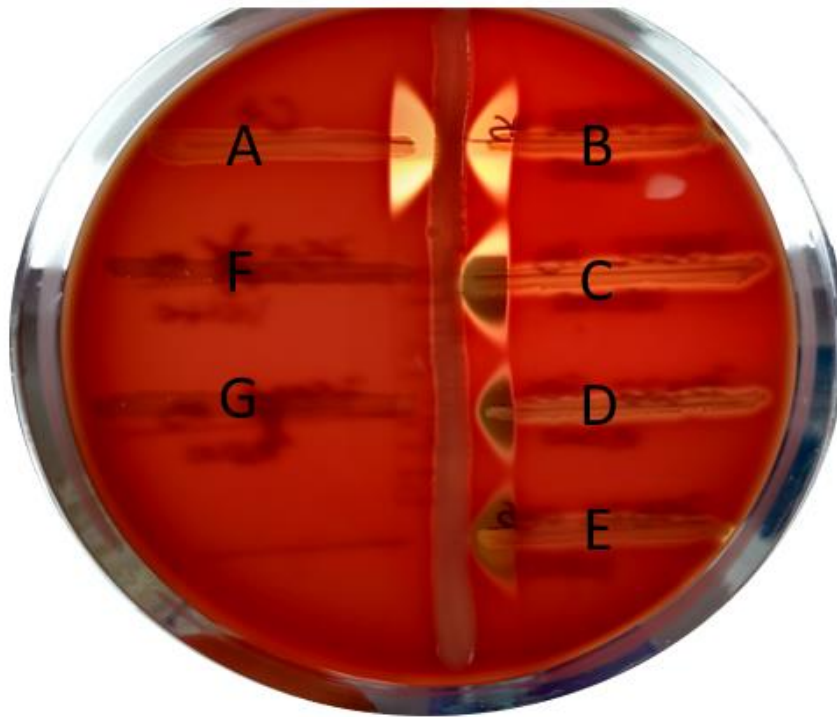
No meio cromogênico, segundo as instruções do fabricante, foram selecionadas para identificação fenotípica as colônias com coloração rosa a vermelho. No ágar sangue de carneiro, as colônias com características morfológicas compatíveis com EGB, ou seja, colônias pequenas, acinzentadas, circundadas por pequeno halo de β-hemólise ou sem hemólise, foram selecionadas para os testes de identificação fenotípica.

A identificação das colônias com morfologia compatível com EGB foi realizada conforme padronizado no setor de microbiologia do HU, inicialmente por teste de catalase, sendo as colônias catalase negativas submetidas ao teste de CAMP.

O teste de CAMP foi realizado em ágar sangue de carneiro semeando a cepa padrão *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) na forma de uma estria no centro da placa, e perpendicular a ela foram feitas estrias com as amostras a serem analisadas. Paralelamente, em todas as placas utilizadas, foi realizado o controle positivo do teste utilizando a cepa padrão *Streptococcus agalactiae* (ATCC12386). As estrias das amostras iniciaram a aproximadamente 3mm do inóculo central, sem entrar em contato com a estria de *Staphylococcus aureus*. Após a semeadura, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°-37°C em atmosfera de CO₂ por 18-24 horas. O teste positivo foi

caracterizado pela formação de uma seta, dada pela potencialização da hemólise, que ocorrem devido à interação da hemolisina do *S. aureus* com o fator CAMP do EGB. O fator CAMP é uma proteína termoestável produzida pelo EGB, que em contato com a esfingomielase C produzida por *S. aureus* se liga à membrana dos eritrócitos depositados na placa e intensifica sua lise, fenômeno conhecido por CAMP positivo (**Figura 2**) (FIOLO et al., 2012). As amostras com resultados duvidosos, foram identificadas pelo equipamento de automação *Vitek 2 Compact* (BioMérieux Vitek Inc., St. Louis, MO), o qual é um sistema de identificação de bactérias automatizado.

Figura 2. Teste de CAMP em placa de ágar sangue de carneiro.



A: controle CAMP; **B, C, D, E:** amostras positivas no teste CAMP; **F e G:** amostras negativas no teste CAMP. Fonte: Arquivo pessoal (2019).

4.7 PCR para detecção de EGB

4.7.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA, o tubo de Todd Hewitt com colistina, contendo amostra da paciente em um volume total de 9 ml foi centrifugado a 4.600 x g por 20 minutos; após a centrifugação, 7 ml do sobrenadante foi desprezado, utilizando os 2 ml restantes do sedimento. Estes 2 ml foram homogeneizados em duas alíquotas de 1 ml cada, sendo uma para armazenamento em tubo tipo microtubos de 1,5 ml a -80°C, e outra alíquota de 1 ml para a extração. Esta última alíquota, para extração, foi centrifugada novamente a 5.200 x g por 5 minutos, seguido da remoção do sobrenadante e adição 1 ml de tampão TE (Tris-EDTA 1X pH 8,0) (SIGMA-ALDRICH®), seguido de homogeneização. Do volume total, 200 µl foram utilizados para a extração de DNA. O restante foi armazenado a -80°C.

Para a extração do DNA foi utilizado o kit ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System (Promega®, Madison, USA). De acordo com as instruções do fabricante foram adicionados em tubo tipo microtubo 200 µl de amostra juntamente com 20 µl de solução de proteinase K fornecida pelo próprio kit de extração (Promega®, Madison, USA), seguida de homogeneização por 15 segundos. Foram adicionados 200 µl de tampão de lise celular, seguida de homogeneização em vortex por 15 segundos, e após incubou-se a temperatura de 56°C por 10 minutos. Terminada a incubação, adicionou-se 250 µl de tampão de ligação, homogeneizando novamente em vortex por 15 segundos. Transferiu-se a amostra para a coluna *ReliaPrep Binding Column* de extração juntamente com o tubo coletor que foi centrifugada em 20.800 x g por 1 minuto. Terminada a centrifugação, o DNA ficou retido na coluna e o restante do líquido passou para o tubo coletor. Então foram adicionados 500 µl de solução de lavagem e centrifugado por 3 min em 20.800 x g e descartando o filtrado. Essa etapa de lavagem foi repetida por mais duas vezes. Na finalização da extração foram adicionados 50 µl de água livre de nucleases para a eluição do DNA, seguindo de uma centrifugação por 1 min em 20.800 x g. Após centrifugação, descartou-se a coluna e o DNA eluído foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento *NanoVue*, *General Electric Company*, seguido de armazenamento a -80°C. (FIOLO, K. et al., 2012).

4.7.2 PCR para detecção do gene constitutivo

Para detecção de EGB, por metodologia molecular, utilizamos uma reação de PCR de ponto final. Esta reação padronizada previamente em nosso laboratório, utilizou iniciadores para o gene o *atr*, um gene constitutivo e altamente conservado de EGB, com baixa probabilidade de ocorrerem mutações. Este gene foi pesquisado nas amostras clínicas para comparação com a metodologia por cultura. (DE-PARIS et al., 2011; KE et al., 2000).

Utilizou para a reação da PCR o protocolo descrito por Schörner e colaboradores (2014), com os seguintes iniciadores: ATR 1 (5'-CAACGATTCTCTCAGCTTTGTTAA-3') e ATR 2 (5'-TAAGAAATCTCTTGTGCGGATTTC-3') que geram produtos de 780 pares de bases (pb). As reações de PCR foram feitas com volume final de 25 µl cada. As seguintes concentrações de reagentes foram utilizadas: 1,5 mM de MgCl₂; 10 picomoles de cada oligonucleotídeo iniciador; 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato; 20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e KCl 50 mM; 2,0 µl de DNA do isolado e 1µ da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA). Para as amplificações, utilizou-se o termociclador modelo 2720 Applied Biosystems, com um ciclo de desnaturação inicial de 60 segundos a 94°C, seguidos por 30 ciclos de 94°C por 60 s, 58°C por 45 s, e 72°C por 1 min, e um ciclo final de 72°C por 10 min.

Os produtos da PCR foram visualizados com a utilização de gel de agarose 1,5%. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio e após uma corrida eletroforética de 30 min a 120 V os fragmentos resultantes foram visualizados no equipamento *ImagenQuant LAS500* (GE Healthcare, EUA). Para comparação do tamanho dos fragmentos, utilizou-se o padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brasil).

4.8 Análise estatística

As amostras foram desvinculadas da identificação do hospital, sumarizadas como números absolutos e percentuais e anotadas em um banco de dados. Realizou-se o teste Kappa para determinar a concordância da detecção de EGB entre as metodologias de enriquecimento, cultura estudadas e PCR do gene *atr*. Os valores de Kappa adotados como referência segundo Altman (1991) foram: concordância pobre entre 0,00 a 0,20, concordância razoável entre 0,21 a 0,40, concordância moderada para 0,41 a 0,60, boa concordância para

0,61 a 0,80 e concordância excelente entre 0,81 a 1,00. A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) das metodologias pesquisadas foram determinados pelo *Software Microsoft Office Excel* versão 2016. Utilizou-se o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS software, versão 17.0, EUA) para a realização do teste de Kappa.

5 RESULTADOS

5.1 Descrição das amostras

Entre os meses de maio e outubro de 2019, 118 pacientes foram submetidas ao rastreio para colonização por *S. agalactiae* no Setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC/EBSERH. As amostras foram oriundas de gestantes atendidas no ambulatório do hospital, que estavam entre a 35^a e 37^a semanas de gestação. Dentre as 118 pacientes, 28 aceitaram também fazer a auto coleta, totalizando 146 amostras. Do total, duas amostras (anogenitais) foram excluídas da comparação entre a biologia molecular as metodologias de cultura devido a presença de inibidores da PCR. Um total de 42 pacientes (35,6%) foram detectadas como colonizadas por EGB em pelo menos um dos métodos estudados (cultura e biologia molecular).

5.2 Auto coleta

Dos 52 kits de auto coleta distribuídos (**Anexo B**), somente 28 pacientes retornaram com o *swab* anovaginal para análise. Entre eles, nove foram positivos para EGB, dos quais sete foram positivos em ambos (auto coleta e coleta pelo profissional), dois foram positivos somente no *swab* de auto coleta, e um foi positivo somente na coleta realizada pelo profissional (**Tabela 1**). A concordância entre as duas metodologias de coleta, segundo o índice Kappa, foi boa (Kappa 0,747; $p < 0,001$; IC = 95% (0,000-0,025) (**Tabela 2**).

Tabela 1. Comparação da recuperação de EGB entre a auto coleta e a coleta realizada pelo profissional da saúde.

	EGB+	EGB-	Total
Auto coleta	9	19	28
Coleta por profissional de saúde	8	20	28

Tabela 2 Comparação entre coleta feita pelo profissional e a auto coleta.

		Coleta pelo Profissional			Concordância*
		Não detectado	Detectado	Total	
Auto coleta	Não detectado	18 64,3%	1 3,6%	19 67,9%	Boa
	Detectado	2 7,1%	7 25,0%	9 32,1%	
	Total	20 71,4%	8 28,6%	28 100,0%	

*Kappa 0,747; p < 0,001; IC = 95% (0,000-0,025)

5.3 Resultados da cultura

Nas metodologias por cultura um total de 38 pacientes (32,2%) foram detectadas como colonizadas por EGB em pelo menos um dos métodos. Analisando as metodologias de cultura separadamente, a cultura utilizando a combinação ágar cromogênico e Todd Hewitt com colistina detectou 36 pacientes colonizadas (30,5%), 35 (29,7%) foram positivas na combinação ágar sangue e Todd Hewitt com colistina, 32 (27,2%) na combinação ágar cromogênico e Todd Hewitt com gentamicina e 28 (23,8%) amostras positivas na combinação ágar sangue e Todd Hewitt com gentamicina (**Tabela 3**).

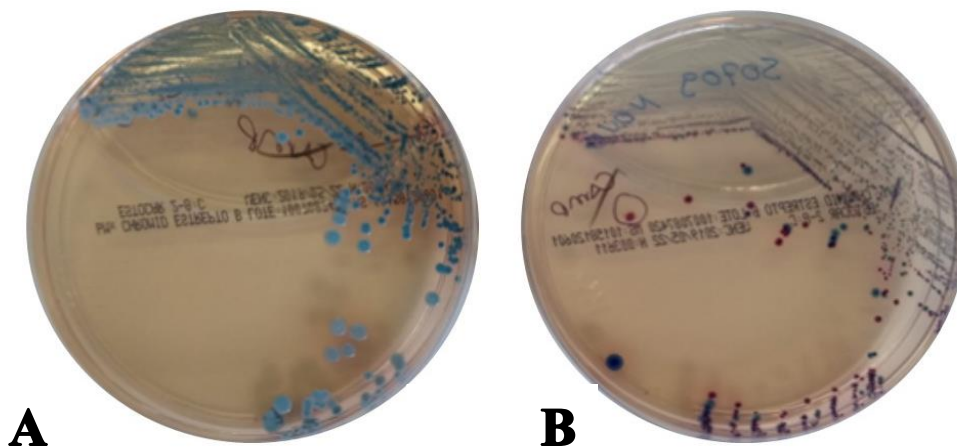
Tabela 3. Resultados da pesquisa de EGB pelas metodologias de cultura.

	EGB +	Total
Todd/colistina + cromogênico	36 (30,5 %)	118 amostras
Todd/colistina + sangue	35 (29,7 %)	
Todd/gentamicina + cromogênico	32 (27,2 %)	
Todd/gentamicina + sangue	28 (23,8 %)	

5.4 Identificação fenotípica das colônias sugestivas de EGB

Durante o estudo, por observação do crescimento em ágar sangue de carneiro e ágar cromogênico, foi possível verificar que com a utilização de colistina no caldo de enriquecimento, houve inibição do crescimento de espécies de *Staphylococcus spp.* presentes nas amostras clínicas. Da mesma forma, a utilização de gentamicina inibiu o crescimento de espécies de *Enterococcus spp.* Assim, em amostras com predomínio de *Staphylococcus spp.*, a visualização das colônias de EGB foi mais evidente no subcultivo do caldo de enriquecimento com colistina. Por outro lado, em amostras clínicas com predomínio de *Enterococcus spp.*, a visualização das colônias de EGB foi mais evidente no subcultivo a partir do caldo de enriquecimento com gentamicina (**Figura 3**).

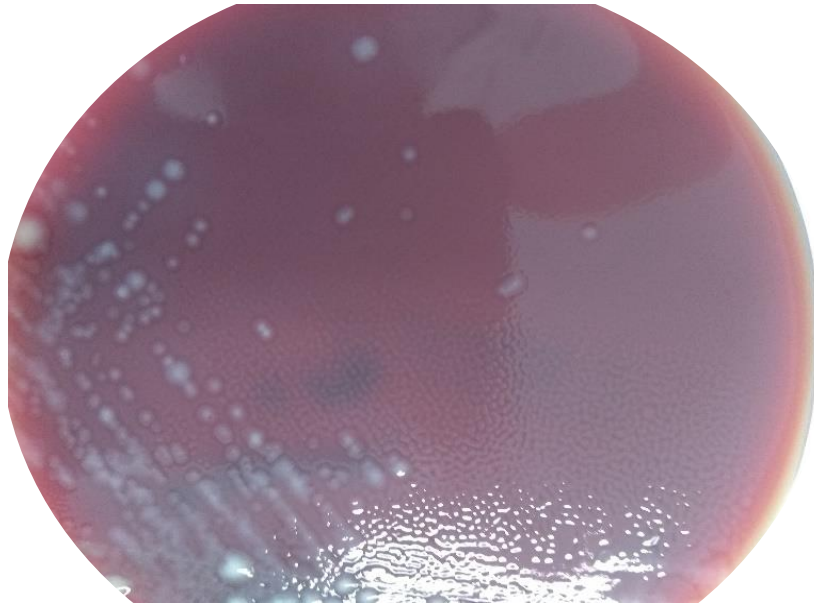
Figura 2: Subcultivo do swab anovaginal em meio cromogênico oriundas da mesma amostra clínica.



Placa A Subcultivo em meio cromogênico a partir do caldo Todd/gentamicina mostrando predomínio de colônias azuladas características de *Staphylococcus sp*; **Placa B** subcultivo em meio cromogênico a partir do caldo Todd/colistina mostrando colônias avermelhadas características de *Streptococcus agalactiae*. Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Outra observação importante durante o estudo foi a dificuldade de visualização e recuperação de EGB em amostras clínicas subcultivadas em ágar sangue de carneiro, quando havia crescimento de bacilos gram negativos, especialmente espécies de *Proteus sp.* Entre as características do gênero *Proteus*, a formação de *swarming* em ágar sangue se destaca na maioria das espécies (**Figura 4**). Ambos os caldos de enriquecimento possuem azida sódica na constituição para inibir o crescimento de bactérias gram negativas.

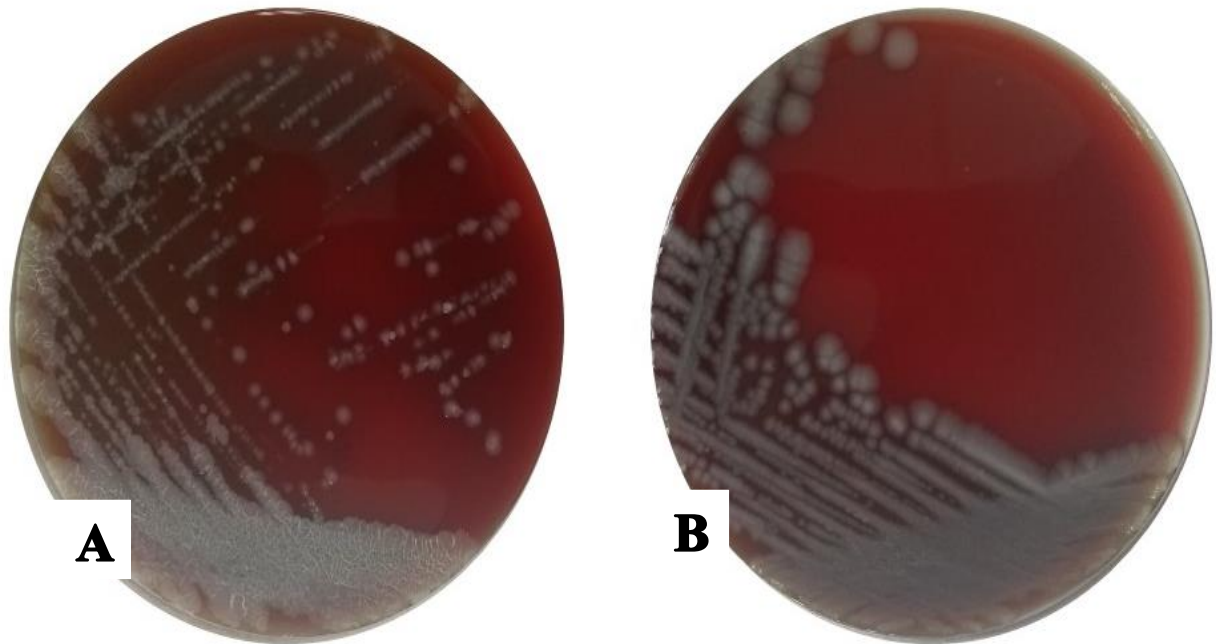
Figura 3 Subcultivo de amostra oriunda de Todd/gentamicina em placa de ágar sangue de carneiro.



Ágar sangue de carneiro com crescimento de *Proteus* sp em toda a superfície da placa. Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Eventualmente, em ambos os caldos de enriquecimento quando subcultivados em ágar sangue, foi observado crescimento de enterobactérias. O crescimento de espécies de enterobactérias, que formam colônias gomosas de tamanho grande, dificulta a visualização das colônias de EGB, especialmente quando estão em pequena quantidade, gerando resultados falso-negativos (**Figura 5**). Quando os mesmos caldos foram subsultivados em ágar cromogênico, o crescimento de gram negativos foi inibido completamente, facilitando a visualização e caracterização das colônias de EGB.

Figura 4 Subcultivo em meio ágar sangue de carneiro oriundo da mesma amostra clínica.

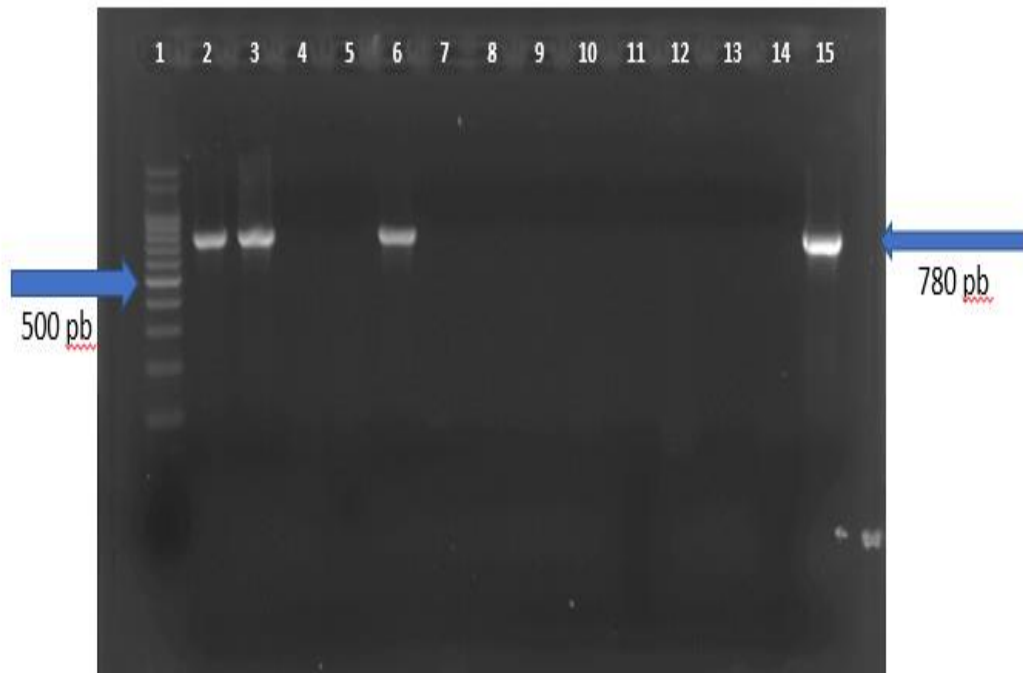


A: Subcultivo em ágar sangue de carneiro a partir do caldo de enriquecimento Todd/colistina; **B:** subcultivo em ágar sangue de carneiro a partir do caldo de enriquecimento Todd/gentamicina. Fonte: Arquivo pessoal (2019).

5.5 Resultados da PCR do gene *atr*

A pesquisa por PCR para gene *atr* detectou 40 pacientes colonizadas (34,4%), sendo que dessas duas amostras não amplificaram o gene *atr*, mas deram positivas na metodologia por cultura. Essas duas amostras foram excluídas da comparação estatística da PCR com as metodologias de cultura pois possuíam algum inibidor, sendo considerado para análise 116 amostras (**Figura 6**).

Figura 5 Gel representativo da amplificação do gene constitutivo *atr*



Produtos de amplificação da PCR simples, após eletroforese em gel de agarose 1,5 % (120 V/25 min), corados por brometo de etídio. **Canaletas 2, 3, 6 e 15:** Exemplos de isolados positivos para o gene *atr*; **Canaletas 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14:** amostras negativas para o gene *atr*; **Canaleta 1:** Padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brasil).

5.6 Comparação entre as metodologias de cultura para pesquisadas de *Streptococcus agalactiae*

Utilizou-se o teste Kappa para avaliar o grau de concordância entre a PCR e as culturas utilizando Todd com colistina e meio cromogênico (**Tabela 4**), Todd com gentamicina e meio cromogênico (**Tabela 5**), Todd com colistina e meio ágar sangue (**Tabela 6**) e Todd com gentamicina e meio ágar sangue (**Tabela 7**). Como também a concordância entre as amostras coletadas no ambulatório do hospital e suas respectivas amostras oriundas da auto coleta (**Tabela 8**). Considerou-se para essa comparação 116 amostras, excluindo-se duas amostras que continham inibidores de PCR.

Tabela 4 Concordância entre PCR e a cultura em Todd/colistina e meio cromogênico

		Biologia Molecular PCR			Concordância*
		Não detectado	Detectado	Total	
AC Todd/Colis.	Não detectado	76 65,5%	5 4,3%	81 69,8%	Excelente
	Detectado	0 0,0%	35 30,2%	35 30,2%	
	Total	76 65,5%	40 34,5%	116 100,0%	

*Kappa 0,902; p < 0,001; IC = 95% (0,000-0,000)

Tabela 5 Concordância entre PCR e a cultura em Todd/gentamicina e meio cromogênico

		Biologia Molecular PCR			Concordância*
		Não detectado	Detectado	Total	
AC Todd/Gent.	Não detectado	76 65,5%	9 7,8%	85 73,3%	Excelente
	Detectado	0 0,0%	31 26,7%	31 26,7%	
	Total	76 65,5%	40 34,5%	116 100,0%	

*Kappa 0,819; p < 0,001; IC = 95% (0,000-0,000)

Tabela 6 Concordância entre PCR e a cultura em Todd/colistina e meio ágar sangue

		Biologia Molecular PCR			Concordância*
		Não detectado	Detectado	Total	
AS Todd/Colis.	Não detectado	76 65,5%	6 5,2%	82 70,7%	Excelente
	Detectado	0 0,0%	34 29,3%	34 29,3%	
	Total	76 65,5%	40 34,5%	116 100,0%	

*Kappa 0,881; p < 0,001; IC = 95% (0,000-0,000)

Tabela 7 Concordância entre PCR e a cultura em Todd/gentamicina e meio ágar sangue

		Biologia Molecular PCR			Concordância*
		Não detectado	Detectado	Total	
AS Todd/Gent.	Não detectado	76 65,5%	12 10,3%	88 75,9%	Boa
	Detectado	0 0,0%	28 24,1%	28 24,1%	
	Total	76 65,5%	40 28,6%	116 100,0%	

*Kappa 0,754; p < 0,001; IC = 95% (0,000-0,000)

A sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para detecção de *S. agalactiae*, foram calculados adotando como padrão ouro a PCR do gene *atr*.

Tabela 1 Sensibilidade, especificidade e VPP e VPN das metodologias de cultura comparadas com a PCR

	A	B	C	D
Sensibilidade	87,5%	77,5%	85,0%	70,0%
Especificidade	100,0%	100,0%	100,0%	100,00%
VPP	100,0%	100,0%	100,0%	100,00%
VPN	93,8%	84,4%	92,6%	86,3%

A: Todd/colistina e meio cromogênico; B: Todd/gentamicina e meio cromogênio; C: Todd/colistina e meio ágar sangue; D: Todd/gentamicina e meio ágar sangue.

6 DISCUSSÃO

EGB é a principal causa de infecções neonatais em todo o mundo. A transmissão de mãe para filho ocorre principalmente durante o período periparto (GIZACHEW et., al 2019), durante o trabalho de parto ou após ruptura das membranas (SZYMAŃSKI et al., 2018). O rastreio no final da gestação é a principal ferramenta para detecção da colonização por EGB, e deve apresentar alta sensibilidade, identificando o maior número de gestantes colonizadas.

Uma metodologia de rastreamento eficiente minimiza resultados falsos negativos, os quais podem gerar risco de infecção neonatal por EGB (TAZI et al., 2008). Com resultados falsos negativos, gestantes colonizadas por EGB não receberão profilaxia intraparto adequada, resultando em alto risco de infecção no neonato (GOINS et al.; VAN DYKE et al., 2009).

Um ponto avaliado neste estudo foi a comparação entre a coleta do *swab* anovaginal pelo profissional de saúde com o *swab* anovaginal realizado pela própria paciente (auto coleta). Alguns estudos mostram que o índice de detecção de EGB são equivalentes quando gestantes recebem instruções e realizam a auto coleta em casa (HICKS et al., 2009; MERCER et al., 1995). Das 28 pacientes que retornaram com o *swab* anovaginal para análise, nove foram positivos para EGB, dos quais sete foram positivos em ambos (auto coleta e coleta pelo profissional), dois foram positivos somente no *swab* da auto coleta, e um foi positivo somente na coleta realizada pelo profissional. Apesar do pequeno número de amostras, observamos dois *swabs* falso negativos na coleta durante a consulta pelo profissional de saúde, assim como um falso negativo na auto coleta. Entre os fatores que podem estar associados a resultados falsos negativos para colonização por EGB, podemos citar: coleta realizada nas regiões externas da vagina e anus, não ultrapassando o esfíncter retal e ou introito vaginal, e gestante com baixa carga do microrganismo colonizante; para a coleta realizada pelo profissional de saúde, podemos citar também a utilização de ducha/banho antes da consulta ginecológica. Além disso, Price e colaboradores (2006), reportaram que na coleta de *swabs* sequenciais, é mais provável que o microrganismo esteja presente no primeiro *swab*, o que pode resultar em uma sensibilidade aparentemente melhor na primeira coleta (auto coleta), do que na coleta subsequente. Mercer e colaboradores (1995) relataram em seu estudo que 98,4% das amostras auto coletadas foram efetivas na recuperação de EGB, contra 94,4% nas coletas realizadas pelo profissional da saúde. Nosso estudo mostrou uma efetividade de 90% para a auto coleta e de 80% para coleta realizada pelo profissional, demonstrando que a auto coleta poderia ser utilizada na rotina de rastreamento de EGB no HU/UFSC/EBSERH. Torok e colaboradores (2000) reportaram que, instruções impressas facilitam a realização da coleta em casa pela paciente, que o armazenamento do *swab* em meio de transporte mantém o microrganismo viável por até 96 horas, e ainda que a auto coleta melhora a privacidade da paciente e não consome tempo durante a consulta clínica na unidade de saúde.

Segundo revisão sistemática e meta-análise realizada com artigos de 85 países, totalizando 299.924 gestantes, a colonização materna mundial estimada é de 18%, com variações regionais de 11% a 35% (RUSSEL et al., 2017). Em nosso estudo observamos uma

taxa de colonização por EGB de 35,6% (42/118) entre as gestantes atendidas no serviço de ginecologia do HU/UFSC/EBSERH no período do estudo, em pelos menos uma das metodologias (cultura e PCR).

A utilização de caldo de enriquecimento recomendada pelo CDC é um passo fundamental para aumentar a sensibilidade do rastreamento. Estudo comparando a semeadura direta com o subcultivo após enriquecimento em caldo, mostrou um aumento na sensibilidade de 40% (semeadura direta em ágar Granada) para 97,5% (com subcultivo em ágar sangue após a etapa de enriquecimento) (OVERMAN et al., 2002). Tazi e colaboradores (2008) observaram um aumento de 94% para 100% de sensibilidade com a adição da etapa de enriquecimento com caldo Todd/colistina, utilizando cultura em ágar sangue de carneiro (TAZI et al., 2008). Fenton e colaboradores (1979), compararam quatro caldos de enriquecimento: Todd com colistina, Todd com gentamicina, Todd com colistina suplementado com 5% de sangue de ovelha e Todd com gentamicina e suplementado com 5% de sangue de ovelha, e relataram um melhor desempenho da colistina na recuperação de EGB. Buchan e colaboradores (2015), utilizando testes moleculares comerciais (Xpert GBS/ Xpert GBS LB, genExpert Cepheid), observaram um aumento na sensibilidade de 96,8% para 99%, com a adição da etapa de enriquecimento com caldo Todd/colistina. Silbert e colaboradores (2016), realizando comparação com teste molecular comercial (BD Max GBS assay), observaram aumento na sensibilidade de 92,7% para 99,1% com a adição da etapa de enriquecimento em caldo Todd/colistina.

No Brasil, são comercializados dois tipos de caldo de enriquecimento para rastreamento de EGB: Todd Hewitt com colistina (Todd/colistina) ou Todd Hewitt com gentamicina (Todd/gentamicina). Em dois estudos sequenciais realizados por nosso grupo de pesquisa, por Feuerschuette e colaboradores (2012 e 2018), observaram diferenças no desempenho da metodologia de cultura quando comparada com PCR *in house* para EGB. No primeiro estudo (2012), que utilizou Todd/Gentamicina para enriquecimento da cultura, observou-se uma sensibilidade de 75,3% do subcultivo em ágar sangue, comparado a 92,4% da PCR. No segundo estudo (2018), que utilizou Todd/colistina na etapa de enriquecimento, observou-se 94,3% de sensibilidade do subcultivo em ágar sangue comparado a 100% de sensibilidade da PCR *in house*. O presente estudo foi desenhado com o objetivo de comparar o desempenho dos dois tipos de caldo, utilizando a mesma amostra. Entre as amostras de 118 gestantes estudadas, 42 apresentaram teste positivo em pelo menos uma metodologia. Quando comparamos a recuperação pós subcultivo em ágar cromogênico, o caldo Todd/colistina

recuperou *S. agalactiae* em 36 amostras e o caldo todd/gentamicina em 32. A comparação utilizando subcultivo em ágar sangue de carneiro também mostrou superioridade do caldo todd/colistina, com recuperação de EGB em 35 amostras versus 28 do caldo Todd/gentamicina.

A utilização de caldo de enriquecimento com posterior subcultivo em ágar sangue, foi a primeira técnica descrita para rastreamento das gestantes colonizadas por EGB, sendo ainda recomendada pelo CDC e utilizada na rotina de muitos laboratórios, incluindo o laboratório de microbiologia do HU/UFSC/EBSERH. No entanto, diversos estudos têm demonstrado que a utilização de meios de cultura mais seletivos para subcultivo após enriquecimento pode melhorar a recuperação do microrganismo, fornecendo maior sensibilidade. Em nosso estudo, observamos que a utilização do ágar cromogênico aumentou a sensibilidade do rastreamento para EGB quando comparado ao ágar sangue com a utilização de ambos os caldos de enriquecimento. Após enriquecimento em caldo Todd/colistina, 36 gestantes apresentaram crescimento de EGB utilizando ágar cromogênico e 35 utilizando subcultivo em ágar sangue. Quando o enriquecimento foi em caldo Todd/gentamicina, a diferença foi maior, EGB foi recuperado de 32 gestantes utilizando ágar cromogênico e somente em 28 utilizando ágar sangue. Morita e colaboradores (2014) descreveram aumento de 94% na sensibilidade do subcultivo após enriquecimento com caldo Todd/colistina para 100% utilizando ágar cromogênico (chromID strepto B). Bou e colaboradores (2005) compararam a utilização do ágar Granada com o ágar GBSDA (ágar diferencial para *Streptococcus* do grupo B), uma modificação do ágar Granada com maior estabilidade e sensibilidade, observando aumento de 10% na recuperação de EGB com a utilização do ágar GBSDA. Perry e colaboradores (2006) compararam a utilização da primeira versão do ágar cromogênico da BioMérieux (Medium B), com ágar Granada e ágar sangue, observando sensibilidade de 100%, 100% e 66,7%, respectivamente. Aila e colaboradores (2010) compararam ágar CNA (ágar sangue base columbia com azida, que inibe o crescimento de bactérias gram negativas), com ágar GBSDA e ágar cromogênico para EGB (chromID Strepto B agar), observando sensibilidade de 77%, 91% e 95% no subcultivo após enriquecimento, respectivamente.

Subcultivos realizados em ágar sangue exigem maior expertise do analista, principalmente em culturas com baixa carga bacteriana em relação a microbiota saprofita, ou em casos de EGB não hemolítico, quando as colônias se confundem principalmente com colônias de *Enterococcus* spp. Os autores citados, assim como o que foi observado em nosso estudo, relataram a maior facilidade na visualização das colônias de EGB nos diferentes

meios cromogênicos quando comparado com o subcultivo em ágar sangue. Outro fator observado em nosso estudo e também relatado por outros autores (DA GLÓRIA et al., 2009) na utilização do meio cromogênico, é a redução da necessidade de se realizar subculturas e de realizar teste de CAMP. Neste estudo entre os 118 *swabs* processados, foi realizado teste de CAMP em um ou mais colônias morfológicamente distintas para confirmar EBG em 101 amostras em ágar sangue/Todd colistina versus 51 amostras em ágar cromogênico Todd/colistina.

Em nosso estudo obtivemos sensibilidade de 85,0% após 24 horas de incubação em ágar sangue após enriquecimento em Todd com colistina, e 70,0% de sensibilidade após 24 horas de incubação em ágar sangue após enriquecimento em Todd com gentamicina.

Segundo Kwatra e colaboradores (2013), existem diferenças nas distribuições de organismos saprófitos e na resistência antimicrobiana entre populações, em nosso estudo observamos que, para as gestantes atendidas no HU/UFSC/EBSERH, o Todd com colistina resultou em uma recuperação melhor de EGB, tanto realizando a subcultura no meio cromogênico, como no meio ágar sangue, mas a combinação Todd com colistina e meio cromogênico foi a que demonstrou melhor recuperação do microrganismo.

A reincubação por 48h das placas de ágar cromogênico após leitura de 24h, em caso de ausência de colônias características, permitiu o isolamento de *S. agalactiae* em uma amostra clínica. A importância da incubação dos meios cromogênicos por 48h para recuperação de EGB também foi descrita por Mortia e colaboradores (2014).

No rastreamento de EGB, geralmente os contaminantes que crescem em meios não seletivos como o ágar sangue, são bactérias gram negativas, que em geral apresentam boa sensibilidade à gentamicina (FENO et al., 1979). Por outro lado, algumas espécies de enterobactérias, como *Proteus* spp. e *Serratia* spp são intrinsecamente resistentes a polimixina. Nosso estudo no entanto, observou crescimento de bactérias gram negativas no subcultivo em ágar sangue, em seis *swabs* após enriquecimento em caldo Todd/gentamicina e em dois *swabs* após enriquecimento no caldo Todd/colistina, sendo que nesses dois últimos casos, o microrganismo gram negativo foi identificado como *P. mirabilis*, fazendo swarming em toda placa de ágar sangue, inviabilizando a visualização de EGB. O meio cromogênico tem a vantagem de inibir o crescimento de bactérias gram negativas, que normalmente apresentam colônias de grande diâmetro, isso facilita a observação das colônias sugestivas de EBG, especialmente nos casos de baixa carga bacteriana. Gray e colaboradores (1979), afirmaram que o caldo Todd/gentamicina não é capaz de inibir o crescimento da maioria das espécies

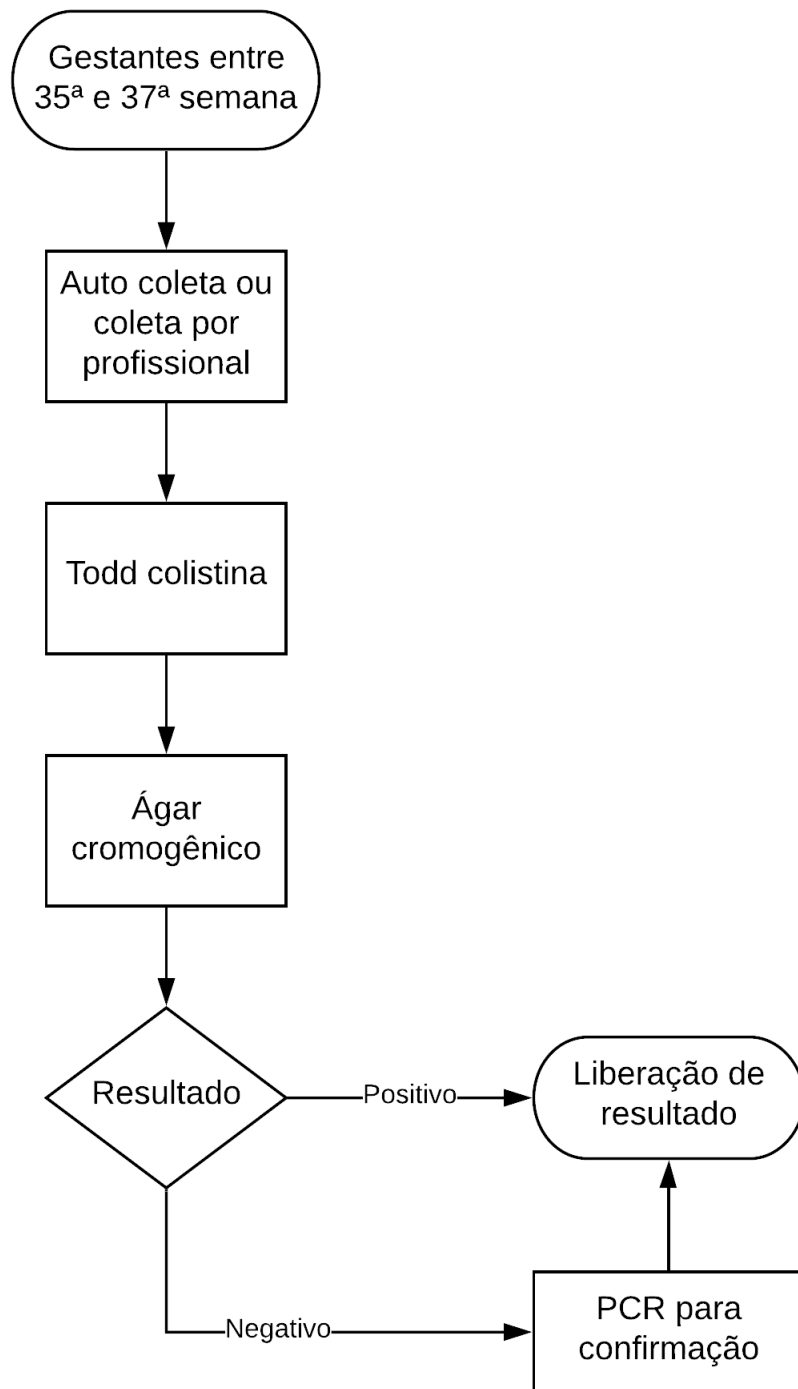
Staphylococcus spp. Em nosso estudo, os resultados falso negativos para combinação caldo gentamicina com subcultivo em ágar sangue foram associados a grande quantidade de *Staphylococcus spp.* na amostra clínica após enriquecimento.

A descrição do fabricante para o ágar cromogênico cita colônias de coloração rosa a vermelhas, como características de EGB. No presente estudo, todas as colônias identificadas em ágar cromogênico como EGB apresentavam a mesma coloração típica. No entanto, em uma amostra, observou-se uma colônia de menor diâmetro apresentando coloração idêntica a observada para EGB, que apresentou teste de CAMP negativo, sendo identificada no VITEK (BioMerieux) como *Streptococcus anginosus*. Todas as colônias que apresentavam coloração próxima ao rosa/vermelho, como roxo, bordô, foram selecionadas para realização do teste de CAMP, mas apresentaram resultados negativos.

Nossos resultados para o ágar cromogênico foram superiores ao observado para o ágar sangue. Além disso, podemos citar algumas vantagens do meio cromogênico sobre o ágar sangue, como: detecção de colônias não hemolíticas de EGB; fácil visualização das colônias características, mesmo com baixa carga bacteriana; e incubação das placas em atmosfera ambiente, sem a necessidade de incubação em CO₂ (MORITA, T. et al., 2014, BINGHUI, L et al., 2014). Algumas desvantagens que podemos sinalizar para o meio cromogênico são, um custo elevado se comparado com o ágar sangue, sendo quase o dobro do preço; sensibilidade à luz, tendo necessariamente que ficar armazenado em um ambiente escuro; e validade mais curta (três meses para meio cromogênico e seis para ágar sangue), sendo necessária uma boa administração de uso por parte do laboratório. (MORITA et al., 2014).

7 CONCLUSÃO

A combinação do caldo de enriquecimento Todd Hewitt com colistina e ágar cromogênico apresentou sensibilidade de 87,5% sendo superior ao protocolo utilizado atualmente no setor de microbiologia do HU/UFSC/EBSERH, caldo Todd Hewitt com gentamicina e ágar sangue que apresentou sensibilidade de 70,0%. Nossos dados sugerem a necessidade de mudança no protocolo para pesquisa de EGB nas gestantes atendidas no serviço de ginecologia do hospital, com diminuição de resultados falsos negativos, conforme fluxograma apresentado na **Figura 7**.

Figura 6. Fluxograma do protocolo proposto

REFERÊNCIAS

- ALTMAN, D. G. Mathematics for kappa. **Practical statistics for medical research**, 1991.
- BAKHTIARI, R. et al. **Evaluation of culture and PCR methods for diagnosis of group B streptococcus carriage in Iranian pregnant women**. Iranian journal of public health, 2012.
- BATTISTIN, F. R. et al. **Antimicrobial susceptibility of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women at a maternity hospital in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil**. Scientia Medica, 2018.
- BERGSENG, Hakon et al. **Real-time PCR targeting the sip gene for detection of group B Streptococcus colonization in pregnant women at delivery**. Journal of medical microbiology, 2007.
- BINGHUI, Lu et al. **Use of MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of group B Streptococcus on chromID Strepto B agar**. International Journal of Infectious Diseases, 2014.
- BISHARAT, Naiel et al. **Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor**. Journal of clinical microbiology, 2004.
- BOYER, K. M.; GOTOFF, S. P. **Strategies for Chemoprophylaxis of GBS Early-Onset Infections**. In: Neonatal group B streptococcal infections. Karger Publishers, 1985.
- BUCHAN, Blake W., et al. **Multicenter clinical evaluation of the Xpert GBS LB assay for detection of group B Streptococcus in prenatal screening specimens**. Journal of clinical microbiology, 2015.
- CRAVEN, Robin R., et al. **Evaluation of a chromogenic agar for detection of group B streptococcus in pregnant women**. Journal of clinical microbiology, 2010.
- CRETI, Roberta et al. **Characteristics of neonatal GBS disease during a multicentre study (2007-2010) and in the year 2012**. Annali dell'Istituto superiore di sanita, 2013.
- DE LA ROSA, Manuel, et al. **New Granada Medium for detection and identification of group B streptococci**. Journal of clinical microbiology, 1992.
- EL AILA, Nabil A. et al. **Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B streptococcus carriage in pregnant women**. BMC infectious diseases, 2010.
- FENTON, Lawrence J.; HARPER, Marilyn H. **Evaluation of colistin and nalidixic acid in Todd-Hewitt broth for selective isolation of group B streptococci**. Journal of clinical microbiology, 1979.
- FEUERSCHUETTE, O. H. M., Silveira, S. K., Cancelier, A. C. L., da Silva, R. M., Trevisol, D. J., & Pereira, J. R. **Diagnostic yield of real-time polymerase chain reaction in the diagnosis of intrapartum maternal rectovaginal colonization by group B Streptococcus: a systematic review with meta-analysis**. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2018
- FEUERSCHUETTE, O. M., Serratine, A. C., Bazzo, M. L., Martins, T. R., Silveira, S. K.,

& da Silva, R. M. **Performance of RT-PCR in the detection of *Streptococcus agalactiae* in the anogenital tract of pregnant women.** *Archives of gynecology and obstetrics*, 2012.

FIOLO, Kateli et al. **Taxa de infecção e sorotipos de *Streptococcus agalactiae* em amostras de recém-nascidos infectados na cidade de Campinas (SP), Brasil.** *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 2012.

GAVINO, Michael; WANG, Eileen. **A comparison of a new rapid real-time polymerase chain reaction system to traditional culture in determining group B streptococcus colonization.** *American journal of obstetrics and gynecology*, 2007.

GIBBS, Ronald S.; SCHRAG, Stephanie; SCHUCHAT, Anne. **Perinatal infections due to group B streptococci.** *Obstetrics & Gynecology*, 2004.

GIZACHEW, Mucheye et al. ***Streptococcus agalactiae* from Ethiopian pregnant women; prevalence, associated factors and antimicrobial resistance: alarming for prophylaxis.** *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 2019.

GOINS, William P., et al. **Adherence to perinatal group B streptococcal prevention guidelines.** *Obstetrics and gynecology*, 2010.

GRAY, B. M.; PASS, M. A.; DILLON, H. C. **Laboratory and field evaluation of selective media for isolation of group B streptococci.** *Journal of clinical microbiology*, 1979.

GRAY, Katherine J., et al. **Invasive group B streptococcal infection in infants, Malawi.** *Emerging infectious diseases*, 2007.

HICKS, Paul; DIAZ-PEREZ, Maria J. **Patient self-collection of group B streptococcal specimens during pregnancy.** *J Am Board Fam Med*, 2009.

KWATRA, Gaurav et al. **Evaluation of Trans-Vag broth, colistin-nalidixic agar, and CHROMagar StrepB for detection of group B *Streptococcus* in vaginal and rectal swabs from pregnant women in South Africa.** *Journal of clinical microbiology*, 2013.

LE DOARE, Kirsty et al. **Uncertainties in screening and prevention of Group B *Streptococcus* disease.** *Clin Infect Dis*, 2018.

LE DOARE, Kirsty; HEATH, Paul T. **An overview of global GBS epidemiology.** *Vaccine*, 2013.

LEBER A.; ISENBERG, H.D. (org.) – **Clinical Microbiology Procedures Handbook.** Vol.1 e 2. 4nd ed., Washington, DC, American Society for Microbiology, 2016.

LEDGER, William J. **Perinatal infections and fetal/neonatal brain injury.** *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 2008.

MATORRAS, R. et al. **Intrapartum chemoprophylaxis of early-onset group B streptococcal disease.** *European Journal of Obstetrics & Gynecology*, 1991.

MCGEE, Lesley; SCHRAG, Stephanie; VERANI, Jennifer R. **Prevention of perinatal Group B streptococcal disease; revised guidelines from CDC**, 2010.

MERCER, B. M., Taylor, M. C., Fricke, J. L., Baselski, V. S., & Sibai, B. M. **The accuracy and patient preference for self-collected group B *Streptococcus* cultures.** *American journal of obstetrics and gynecology*, 1995.

- MORITA, Toyohisa et al. **Evaluation of chromID strepto B as a screening media for Streptococcus agalactiae.** BMC infectious diseases, 2014.
- MUNARI, F. M., De-Paris, F., Salton, G. D., Lora, P. S., Giovanella, P., Machado, A. B. M. P., ... & Laurino, C. C. F. C. **A combined enrichment/polymerase chain reaction based method for the routine screening of Streptococcus agalactiae in pregnant women.** *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012.
- NICKMANS, Silvie, et al. **Possible solution to the problem of nonhemolytic group B streptococcus on Granada medium.** *Journal of clinical microbiology*, 2012.
- OVERMAN, Sue B. et al. **Evaluation of methods to increase the sensitivity and timeliness of detection of Streptococcus agalactiae in pregnant women.** *Journal of clinical microbiology*, 2002.
- PERRY, J. D. et al. **Evaluation of a new chromogenic agar medium for isolation and identification of Group B streptococci.** *Letters in applied microbiology*, 2006.
- PICARD, F. J.; BERGERON, M. G. **Laboratory detection of group B Streptococcus for prevention of perinatal disease.** *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2004.
- PRICE, David et al. **Self-sampling for group B streptococcus in women 35 to 37 weeks pregnant is accurate and acceptable: a randomized cross-over trial.** *Journal of obstetrics and gynaecology Canada*, 2006.
- RUSSELL, N. J. et al. **GBS Maternal Colonization Investigator Group. Maternal colonization with group B Streptococcus and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses.** *Clin Infect Dis*, 2017.
- SCHÖRNER, Marcos A. et al. **Detection of Group B Streptococcus agalactiae from anorectal and vaginal screening tests.** *Clinical Microbiology: Open Access*, 2014.
- SCHRAG, Stephanie et al. **Prevention of perinatal group B streptococcal disease.** *MMWR Recomm Rep*, v. 51, n. 11, p. 1-22, 2002.
- SCHRAG, Stephanie J. at al. **Prevention of perinatal group B streptococcal disease.** Revised guidelines from CDC. 2002.
- SCHUCHAT, Anne. **Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms.** *Clinical microbiology reviews*, 1998.
- SCHUCHAT, Anne; WHITNEY, Cynthia G.; ZANGWILL, Kenneth. **Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective.** 1996.
- SEALE, Anna C. et al. **Estimates of the burden of group B streptococcal disease worldwide for pregnant women, stillbirths, and children.** *Clinical infectious diseases*, 2017.
- SILBERT, S., Rocchetti, T. T., Gostnell, A., Kubasek, C., & Widen, R. **Detection of group B Streptococcus directly from collected ESwab samples by use of the BD Max GBS assay.** *Journal of clinical microbiology*, 2016.
- SZYMAŃSKI, Sławomir et al. **Infections of GBS's etiology and use of perinatal antibiotic prophylaxis.** *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 2018.
- TAZI, Asmaa et al. **Comparative evaluation of Strepto B ID® chromogenic medium and Granada media for the detection of group B streptococcus from vaginal samples**

of pregnant women. Journal of microbiological methods, 2008.

TOROK, Peter G.; DUNN, Jan R. **Self-collection of antepartum anogenital group B streptococcus cultures.** J Am Board Fam Pract, 2000.

TUROW, Judith; SPITZER, Alan R. **Group B streptococcal infection early onset disease controversies in prevention guidelines, and management strategies for the neonate.** Clinical pediatrics, 2000.

VAN DYKE, Melissa K., et al. **Evaluation of universal antenatal screening for group B streptococcus.** New England Journal of Medicine, 2009.

VERANI, Jennifer R. et al. **Prevention of perinatal group B streptococcal disease.** Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), Revised Guidelines from CDC, Recommendations and Reports, 2010.

VERSALOVIC J, editor. **Manual of clinical microbiology.** 10th ed. Washington (DC):ASM, 2011.

WERNECKE, Martina et al. **Evaluation of a novel real-time PCR test based on the *ssrA* gene for the identification of group B streptococci in vaginal swabs.** BMC infectious diseases, 2009.

WINN, W.C. et al. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.** 6th ed. Philadelphia: 2006.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, MICROBIOLOGIA E
SOROLOGIA - LBMMS

Você está sendo convidada a participar como voluntária do estudo “Avaliação de diferentes protocolos para pesquisa de *Streptococcus agalactiae* por cultura, em gestantes atendidas no hospital universitário da Universidade Federal de Santa Catarina”.

Os aspectos éticos e a confidencialidade das informações fornecidas, relativas às pesquisas com seres humanos, serão respeitados de acordo com a Resolução N° 466, de 12 de dezembro de 2012, aprovada pelo Conselho Nacional de Saúde.

Antes de autorizar e concordar em participar desta pesquisa, leia atentamente e compreenda as explicações sobre os procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos da pesquisa. Estamos a disposição para esclarecer todas as suas dúvidas.

Objetivos e Justificativa

Os objetivos deste estudo são: (1) Avaliar diferentes metodologias para pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em gestantes atendidas no HU/UFSC. (2) Comparar a capacidade de recuperação do microrganismo em amostras obtidas por auto coleta, tendo como referência a coleta realizada por profissional de saúde.

Justifica-se a realização do estudo por tratar-se de um tema de interesse no meio acadêmico e profissional, devido a necessidade de identificar com acurácia as gestantes colonizadas por EGB, possibilitando uma redução dos problemas causados pelo microrganismo tanto para a gestante como para o recém-nascido.

Procedimentos

Se você aceitar participar desta pesquisa, receberá informações sobre o exame, que é realizado rotineiramente no pré-natal, receberá ainda um *swab* (tipo de cotonete) com meio de transporte (Amies) e um folheto explicativo com orientações sobre a auto coleta da amostra anovaginal. A amostra coletada por você será utilizada para rastreamento de colonização por

Streptococcus agalactiae. A coleta será realizada pela manhã, ao acordar e antes de tomar banho, no mesmo dia da coleta do mesmo exame pelo profissional de saúde (consulta médica ou agendamento na área C/Ginecologia/HU). Após receber todas as informações você poderá fornecer o seu consentimento ou não para participação, sendo que em caso de aceite solicitaremos sua assinatura, data e local neste TCLE, e caso negativo, isso não afetará de nenhuma forma seu atendimento normal neste centro de saúde.

O presente projeto solicita que você realize a auto coleta de amostra biológica, que será utilizada em paralelo com a amostra coletada pelo profissional de saúde, obtida como fruto do atendimento normal do seu caso. Ambas as amostras biológicas serão processadas no laboratório de microbiologia para realização da pesquisa de *Streptococcus agalactiae*. Esse exame é realizado na rotina pré-natal, entre a 35^a e 37^a semanas, para todas as gestantes acompanhadas no HU/UFSC/EBSERH.

Riscos e Desconfortos

Toda pesquisa com seres humanos tem alguma possibilidade de risco. Os riscos da sua participação no presente estudo referem-se a coleta do *swab* anovaginal, que será realizado por meio da introdução do *swab* na entrada da vagina, girando o *swab* para coletar secreção do introito vaginal com posterior introdução do mesmo *swab* no esfíncter anal, da mesma maneira, girando *swab* para coletar as bactérias que colonizam o local. A coleta segue o mesmo protocolo que será realizado pelo profissional de saúde para obtenção da amostra biológica. A coleta pode ocasionar leve desconforto físico.

Benefícios esperados

Os resultados advindos da análise dos diferentes métodos de coleta e processamento da amostra para pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, farão parte da seleção e validação do novo protocolo a ser adotado no laboratório de microbiologia da Divisão de Análises Clínicas/HU/UFSC/EBSERH. Com a utilização do mesmo, futuramente, pelo serviço do hospital, busca-se melhoria na sensibilidade do exame realizado no laboratório, com consequente melhoria da prática assistencial.

Garantia de esclarecimentos

Estaremos disponíveis para quaisquer esclarecimentos no decorrer do estudo. Você poderá entrar em contato com a pesquisadora Maria Luiza Bazzo, Rua professora Maria Flora

Pausewang, s/n, Campus Universitário Trindade, CEP 88036-800, Florianópolis-SC, Telefone 37218142 ou 48999689822. O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina também poderá ser consultado sobre o projeto, funciona das 7h às 19h de segunda a sexta feira. O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma maneira, pode entrar em contato com o CEPSH da Universidade Federal de Santa Catarina, na Pró-Reitoria de Pesquisa situado a Rua Desembargador Vitor Lima, 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC, CEP 88040-400. Poderão ser ainda contatados pelo telefone: (48) 3721-6094 ou pelo e-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br. Você pode inclusive fazer a reclamação sem se identificar, se preferir.

Garantia de sigilo

As informações relacionadas ao estudo poderão ser divulgadas em relatórios ou publicação, e isso será feito de forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e mantida a confidencialidade. Quando os resultados forem publicados, em dezembro de 2019, não aparecerá seu nome, e sim um código. No entanto, pode haver o risco, ainda que involuntário e não intencional, de quebra de sigilo. Para evitar ao máximo esse risco manteremos os dados da pesquisa em planilhas sem identificação da participante.

Direito de recusa

A recusa ou desistência da participação do estudo não implicará em nenhuma sanção, dano, desconforto ou prejuízo.

Ressarcimento e indenização

Se houver gastos relacionados à pesquisa, no decorrer do estudo, será garantido o ressarcimento, o qual se trata da compensação material, exclusivamente de despesas do participante e seus acompanhantes, quando necessário, tais como transporte e alimentação, conforme constam nos itens II.21 e IV.3.g da Resolução 466/12.

Caso você tenha algum dano, comprovadamente, em decorrência da pesquisa poderá solicitar indenização, que se trata da cobertura material para reparação a dano, causado pela pesquisa ao participante da pesquisa, conforme constam nos itens IV.3.h e IV.4.c da Resolução 466/12.

Consentimento livre e esclarecido

Eu, participante do estudo, declaro, que compreendi os objetivos do estudo, como a pesquisa será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente desse estudo. Declaro ainda, que entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão.

Diante destas informações, se for de sua vontade participar deste estudo, marque a opção sim, abaixo:

Você aceita participar do estudo?

- SIM
- NÃO

IDENTIFICAÇÃO E CONSENTIMENTO DO VOLUNTÁRIO:

Nome completo: _____

Doc. De Identificação: _____

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO:

“Declaro que, em / / , concordei em participar, na qualidade de participante do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de diferentes protocolos para pesquisa de *Streptococcus agalactiae* por cultura, em gestantes atendidas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina”, após estar devidamente informado sobre os objetivos, as finalidades do estudo e os termos de minha participação. Assino o presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias, que serão assinadas também pelo pesquisador responsável pelo projeto, sendo que uma cópia se destinada a mim (participante) e a outra ao grupo de pesquisa pesquisador”.

“As informações fornecidas aos pesquisadores serão utilizadas na exata medida dos objetivos e finalidades do projeto de pesquisa, sendo que minha identificação será mantida em sigilo e sobre a responsabilidade dos proponentes do projeto”.

“Independentemente deste consentimento, fica assegurado meu direito a retirar-me da pesquisa em qualquer momento e por qualquer motivo, sendo que para isso comunicarei minha decisão a um dos proponentes do projeto acima citados.”

Local de Data:

Assinatura da participante

Assinatura da pesquisadora

ANEXO B

IMPORTANTE:

REALIZAR A COLETA PELA MANHÃ, AO ACORDAR, ANTES DE REALIZAR HIGIENE PESSOAL (BANHO), NO MESMO DIA DA PRÓXIMA CONSULTA (COLETA DE EXAME). TRAZER O *SWAB* JUNTO E O TERMO DE CONSENTIMENTO NA CONSULTA.

INSTRUÇÕES AUTO COLETA

Este kit contém:

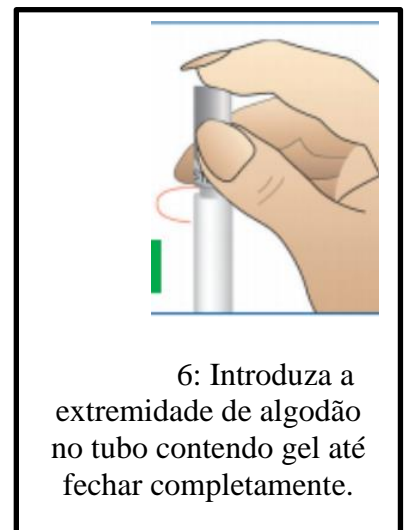
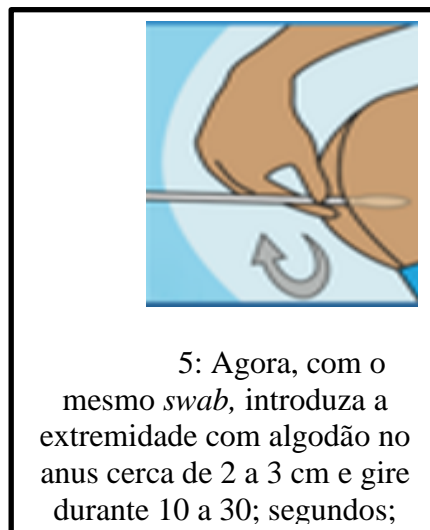
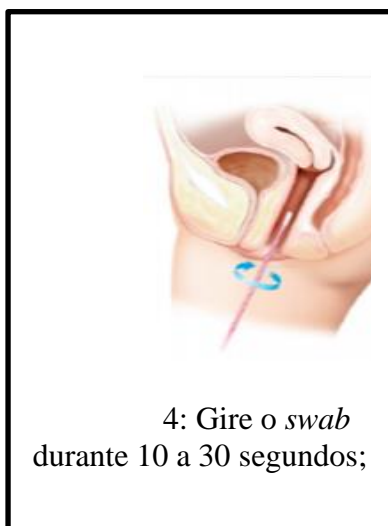
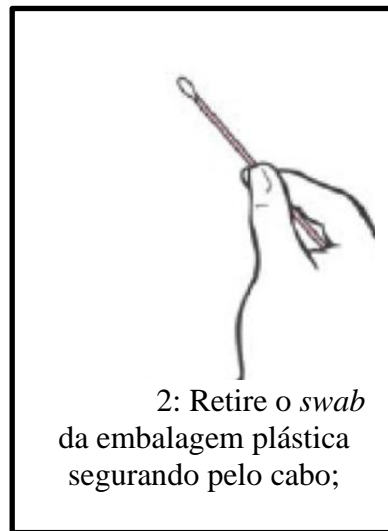
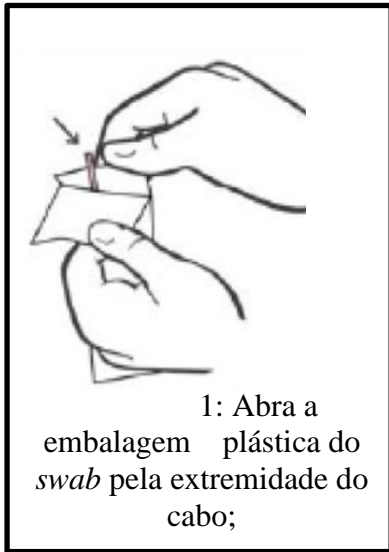


01 *swab*

01 instruções de auto coleta

01 termo de TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Autocoleta *swab* vaginal/anal para Pesquisa de *Streptococcus agalactiae*



IMPORTANTE:

REALIZAR A COLETA PELA MANHÃ, AO ACORDAR, ANTES DE REALIZAR HIGIENE PESSOAL (BANHO), NO MESMO DIA DA PRÓXIMA CONSULTA (COLETA DE EXAME). TRAZER O SWAB JUNTO E O TERMO DE CONSENTIMENTO NA CONSULTA.

ANEXO C

- **Nome do Exame:**
Pesquisa de Streptococcus agalactiae
- **Sinonímia:**
Estreptococco beta-hemolítico do grupo B, pesquisa de GBS
- **Material Biológico:**
Swab anal ou swab introito vaginal
- **Volume:**
Não se aplica
- **Conservante:**
Sem conservante
- **Interferentes:**
Uso de medicamento tópico ou de antimicrobiano.
- **Instruções ao Paciente:**
As pacientes devem informar se estão utilizando antimicrobianos e a idade gestacional (em semanas).
- **Sigla do Exame:**
PSAG
- **Setor:**
Setor de Microbiologia
- **Interpretação**

Clínica:

O estreptococo do grupo B (GBS) pode causar infecção urinária e uterina na gestante e levar ao óbito fetal. É a causa mais comum de infecção com risco de vida para o neonato, com alta morbidade e mortalidade, sendo responsável por casos de sepsis, meningite e pneumonia do recém-nascido. Até 40% das gestantes são colonizadas por GBS no reto ou vagina. A cultura para estreptococo do grupo B, em amostras do introitovaginal e anorretal, é útil na prevenção da infecção perinatal. O teste deve ser solicitado entre a 35^a e a 37^a semana de gestação. (Revised Guidelines from CDC. MMWR Recomm Rep 2002).