



**RELEVÂNCIA MÉDICO-LEGAL DA INFECÇÃO  
CAUSADA POR *Streptococcus agalactiae*  
EM GRÁVIDAS E RECÉM-NASCIDOS**

ÂNGELA FILIPA VALÉRIO FERNANDES

Dissertação de Mestrado em Medicina Legal

2010

ÂNGELA FILIPA VALÉRIO FERNANDES

**RELEVÂNCIA MÉDICO-LEGAL DA INFECÇÃO  
CAUSADA POR *Streptococcus agalactiae*  
EM GRÁVIDAS E RECÉM-NASCIDOS**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professora Doutora Paula Ferreira da Silva

Professora Associada do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

***Dedico esta dissertação à minha irmã, Carla.***

Espero que possa de alguma forma servir de inspiração para a tua vida, e que te ajude a acreditar que com paixão e determinação...os sonhos são possíveis de alcançar.

# Agradecimentos

---

Ao longo de todo o processo que levou à realização deste trabalho tive a sorte e o privilégio de ter conhecido pessoas realmente fantásticas, sem as quais não teria sido possível chegar até aqui, e das quais nunca me vou esquecer. Tive também a sorte de contar com o apoio daqueles que mais uma vez, e em mais uma importante etapa da minha vida estiveram realmente comigo.

Assim, com todas as palavras que aqui dedico sei que não conseguirei de todo descrever o quão privilegiada me sinto.

À minha orientadora, Prof. Paula, gostaria de deixar um agradecimento muito especial. Por me ter dado a oportunidade de integrar o seu extraordinário grupo de trabalho, por me ter sempre recebido com um sorriso contagiante, por estar sempre pronta para ajudar e por ter acreditado nas minhas capacidades. Vai sempre ser uma referência na minha vida profissional e não só. De todo, não poderia ter começado melhor a minha experiência no mundo da investigação.

Ao Pedro, sem dúvida um enorme obrigada por tudo. Foi extraordinária a oportunidade que tive de aprender com o Pedro, melhor impossível, um verdadeiro mestre na “arte” da investigação, é contagiante ouvi-lo falar de ciência, vê-lo “fazer” ciência! Por fim, fica um companheiro de trabalho e um amigo.

À Elva, tenho sem dúvida de agradecer tudo o que me ensinou, o que me ajudou, sempre de maneira simpática! Mais uma excelente investigadora com a qual tive a sorte de aprender e conviver. Sem dúvida uma pessoa imprescindível a dias bem passados no laboratório. Foi um prazer conhecê-la.

À Joana e à Mariana, quero agradecer os ótimos momentos que passamos juntas no laboratório, a partilha de ansiedades, por um lado, e de gargalhadas, por outro. A vossa presença deu muita animação aos dias de trabalho!

Agradeço muito a simpatia e a ajuda de todos os colegas do laboratório, Vanessa, Alex, Filipe, Sandro, Gabriela, Márcia, Luzia. Foi muito bom conviver convosco.

Um agradecimento à Dr.<sup>a</sup> Adília por toda a ajuda, simpatia e boa disposição.

Ao Prof. Manuel Vilanova agradeço a boa disposição.

À Dona Conceição, muito obrigada pela paciência e ajuda na organização de todo o material indispensável ao dia-a-dia no laboratório.

Às meninas da Imunogenética, Cláudia e Bárbara, agradeço todos os almoços animados, “cafezinhos”, risadas e companheirismo. Que bom ter-vos conhecido.

Agradeço à Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Ramos, directora do Departamento de Patologia Laboratorial, e à Dr.<sup>a</sup> Virgínia do Serviço de Microbiologia, pela ajuda e apoio na realização do estudo de prevalência, realizado com dados recolhidos no Hospital de Santo António, Porto.

Aos meus colegas de mestrado, em particular às amizades que ficaram, Marisa e Cristina. O que temos de melhor de cada momento da vida são os amigos que fazemos e mantemos pela vida fora.

Um agradecimento especial à Prof. Mónica. Uma pessoa inesquecível, uma agradável descoberta. Muito obrigada pela ajuda, pela simpatia, pela disponibilidade, pela amabilidade e pela amizade. É um prazer conhecê-la.

Muito obrigada à Prof. Maria José e ao Prof. J. Pinto da Costa, foi uma honra ter a oportunidade de assistir aos seus ensinamentos e contactar com tanta sabedoria.

Agradeço imenso à Raquel, pelo apoio, amizade e fundamental ajuda com o tratamento estatístico do meu trabalho.

À Kate, bem, não são necessárias muitas palavras, a verdadeira amizade não se explica, é assim e pronto. Mais uma etapa...mais um apoio incondicional! Um muito obrigada também pela marca deixada na minha tese de mestrado, a tradução do meu *abstract*.

À Samira e ao Attila, obrigada pela compreensão, apoio e amizade durante todo o processo de escrita da minha dissertação.

A todos os meus grandes amigos, aqueles que como sempre riem comigo e sofrem comigo ... a vocês que sabem quem são ... muito obrigada.

***“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos.”***

(Fernando Pessoa)

Joana, obrigada por existires na minha vida.

João...o que te posso dizer...completas na perfeição a minha felicidade, és o culminar perfeito da minha vida pessoal, sem ti os meus sucessos académicos e profissionais não teriam a mesma emoção, não fariam tanto sentido.

À minha Vó Di...por palavras não será nunca possível descrever a sua importância na minha vida. Obrigada pelos seus 82 anos de vida se fascinarem e tentarem sempre compreender os meus sonhos.

À minha irmã, *Calinho*, obrigada por existires, és o que de mais bonito e perfeito existe na minha vida.

***Aos meus pais. Mais do que isso, o grande apoio na minha vida. As vozes que me tranquilizam o coração, os sorrisos que me alegam a vida, o apoio que me ajuda a percorrer os meus objectivos. Sem vocês nunca teria sido possível sonhar. O meu sorriso...devo a vocês.***

*Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
Abraçar a vida com paixão,  
Perder com classe e vencer com ousadia,  
Porque o mundo pertence a quem se atreve  
E a vida é “muito” para ser insignificante.*

(Charles Chaplin)

# Resumo

---

***Introdução:*** A infecção por *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus* do grupo B (SGB) é um sério factor de morbilidade e mortalidade de recém-nascidos. A principal forma de contaminação do recém-nascido é através da colonização materna, sendo este o principal factor de risco para infecção neonatal. Actualmente a forma mais eficaz que existe de prevenção é o rastreio para a colonização de *S. agalactiae* em todas as grávidas no terceiro trimestre de gestação (entre a 35.<sup>a</sup> e a 37.<sup>a</sup> semana) e consequente quimioprofilaxia a todas as mulheres colonizadas na altura do parto. Estima-se que a taxa de colonização materna varia entre 15 e 35%.

Embora muitos clínicos e investigadores dediquem o seu trabalho às infecções causadas por esta bactéria e à prevenção das mesmas, em Portugal existem ainda escassos estudos apresentando taxas de prevalência da colonização por *S. agalactiae* em grávidas e recém-nascidos. Assim, é de grande relevância efectuarem-se estudos de prevalência em diferentes pontos do nosso país, para que se possa organizar uma base de dados com as taxas de prevalência de colonização por esta bactéria em Portugal.

É também de grande preocupação e urgência para clínicos e investigadores, o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes, mais concretamente o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra o *S. agalactiae*.

***Objectivos:*** O objectivo principal do presente estudo foi avaliar a importância médico-legal da infecção provocada pelo *S. agalactiae* em grávidas assistidas no Hospital de Santo António (HSA), bem como o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o SGB. Para tal procedeu-se ao levantamento da prevalência de colonização por *S. agalactiae* em grávidas, entre a semana 35 e 37 de gestação, assistidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital de Santo António, no período de 2005 a 2008; e elaboraram-se ensaios experimentais de imunoprotecção contra a infecção por *S. agalactiae* usando como antigénio alvo a Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase recombinante (rGAPDH).

***Resultados:*** A prevalência de colonização (recto-vaginal) materna por *S. agalactiae* detectada no estudo foi de 12, 28% (IC 95%). Nenhuma diferença



( $p > 0,05$ ) foi encontrada entre grávidas colonizadas e não colonizadas relativamente à sua idade.

Os ensaios de imunoprotecção mostram que a imunização de fêmeas com rGAPDH é capaz de conferir protecção contra a infecção por uma estirpe de *S. agalactiae* de elevada virulência (NEM2060). Os trabalhos que têm vindo a ser desenvolvidos neste laboratório têm sido um forte suporte na investigação de uma vacina eficaz contra as infecções causadas pelo *S. agalactiae*. No protocolo de vacinação aqui desenvolvido, o alvo é desviado da bactéria para o seu factor de virulência (GAPDH, proteína imunomoduladora). Vimos ainda que a imunização passiva com anticorpos anti-rGAPDH protege os recém-nascidos da infecção por SGB NEM2060. Assim, vimos que quer a imunização activa com rGAPDH quer a imunização passiva com anticorpos anti-rGAPDH são eficazes na protecção de recém-nascidos contra o SGB.

**Conclusão:** Em conjunto, estas observações reforçam a relevância do *S. agalactiae* como uma preocupação de Saúde Pública para grávidas e recém-nascidos, e a necessidade de prevenção adicional e estratégias terapêuticas mais eficazes contra as infecções causadas por esta bactéria.

# Abstract

---

***Introduction:*** Infection by *Streptococcus agalactiae* or *Group B Streptococcus* (GBS) is a serious factor of newborn morbidity and mortality.

The main contamination form of the newborn is through maternal colonization, which is the major risk cause for neonatal infection.

Nowadays, the most effective prevention is the screening of all pregnant women on their third gestation month (between 35th and 37th week) for the colonization by *S. agalactiae* and the consequential chemoprophylaxis to all women who are colonized at the time of giving birth. It is estimated that the percentage of maternal colonization varies between 15 and 35%.

Although many medical researchers dedicate their work to infections caused by this microorganism and its prevention, in Portugal there are very few studies that present the rates of prevalence of the colonization by *S. agalactiae* in pregnant women and newborns. Therefore, it is of great importance to conduct studies of the occurrence in different parts of our country, so that a database can be organized with the information of this bacteria's colonization rates in Portugal.

A major and urgent concern of medical researchers is also the development of more effective therapy, particularly a safe and successful vaccine against GBS

***Main Goals:*** The main goal of this study was to assess the forensic relevance of the infection caused by *S. Agalactiae* in pregnant women who were attended the Santo António Hospital - Hospital de Santo António (HSA) - as well as the development of an efficient vaccine against SGB.

In order to do that, information was gathered on the prevalence of the colonization by *S. agalactiae* in pregnant women, between 35th and 37th gestation week, who were attended in the Obstetric department of the Santo António Hospital, between 2005 and 2008. Furthermore, experimental tests on immunoprotection against the infection *S. agalactiae* were conducted, using as target antigen the recombinant Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (rGAPDH).

**Results:** The occurrence of the (rectovaginal) maternal colonization by GBS identified on this study was of 12,28%. No difference ( $p>0,05$ ) was found between colonized and not colonized pregnant women in different age groups. The immunoprotection experiments showed that the immunization of females with rGAPDH protects against the infection by a strain of *S. agalactiae* of high virulence (NEM2060). The work that has been developed in this laboratory has been a strong support to the investigation of an effective vaccine against infections caused by *S. agalactiae*. In the vaccination protocol that has been developed, the target does not focus on the bacteria, but on its virulence factor (GAPDH, an immunomodulatory protein). Another finding was that the passive immunization with anti-rGAPDH antibodies protects the newborns from the infection by SGB NEM2060. Thus, both the active immunization with rGAPDH and the passive immunization with anti-rGAPDH antibodies are effective in protecting newborns against SGB.

**Conclusion:** All in all, these observations highlight the importance of considering *S. agalactiae* a public health concern for pregnant women and newborns and show the need of additional prevention and more efficient therapeutic strategies against the infection caused by this microorganism.

# Índice

Abreviaturas .....	4
CAPÍTULO I.....	5
1. Introdução.....	6
1.1. <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	6
1.2. Infecção e Transmissão.....	7
1.3. Doenças causadas por SGB.....	8
1.3.1. Morbilidade perinatal:.....	8
1.3.2. Infecção materna:.....	8
1.3.3. Doença neonatal:.....	8
1.3.4. Infecção em adultos:.....	10
1.4. Factores de risco maternos para a doença neonatal.....	11
1.5. Prevenção e tratamento da doença neonatal .....	12
1.5.1. Profilaxia <i>intrapartum</i> :.....	12
1.5.2. Vacinas contra o <i>S. agalactiae</i> :.....	14
1.6. Epidemiologia.....	16
1.6.1. Estados Unidos:.....	16
1.6.2. Europa:.....	16
1.6.3. Portugal:.....	17
CAPÍTULO II.....	19
2. Relevância médico-legal.....	20
CAPÍTULO III.....	22
3. Objectivos .....	23
3.1. Geral:.....	23
3.2. Específicos:.....	24
CAPÍTULO IV.....	25

<b>4. Material e Metodologia</b> .....	26
4.1. Estudo de Prevalência.....	26
4.1.1. População e amostra:.....	26
4.1.2. Recolha de dados:.....	26
4.2. Desenvolvimento Experimental de uma Vacina.....	27
4.2.1. Animais.....	27
4.2.2. Bactéria.....	27
4.2.3. Obtenção de GAPDH recombinante de <i>S. agalatae</i> (rGAPDH).....	28
4.2.3.1. Produção da rGAPDH:.....	28
4.2.3.2. Expressão da rGAPDH:.....	28
4.2.4. Purificação da rGAPDH:.....	29
4.2.5. Regeneração da Coluna de Níquel (Ni <sup>2+</sup> ):.....	29
4.2.6. Doseamento de Proteínas.....	30
4.2.6.1. Método de Lowry:.....	30
4.2.7. Análise qualitativa de Proteínas.....	30
4.2.7.1. Electroforese em Gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE) e em Gel Nativo:.....	30
4.2.7.2. Coloração:.....	31
4.2.8. Obtenção de Imunoglobulinas.....	31
4.2.8.1. Imunizações:.....	31
4.2.8.2. Purificação de anticorpos:.....	32
4.2.8.3. ELISA (do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> ).....	32
4.2.9. Ensaio <i>in vivo</i> com rGAPDH.....	33
4.2.9.1. Imunizações:.....	33
4.2.9.2. Infecção:.....	34
4.3. Análise Estatística.....	34
<b>CAPÍTULO V</b> .....	36
<b>5. Resultados</b> .....	37
5.1. Estudo de Prevalência.....	37

5.1.1.	Caracterização da amostra:.....	37
5.1.2.	Prevalência da colonização por SGB: .....	40
5.2.	Desenvolvimento Experimental de uma Vacina .....	46
<b>CAPÍTULO VI.....</b>		<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>Discussão dos Resultados .....</b>	<b>53</b>
6.1.	Estudo de Prevalência .....	53
6.2.	Desenvolvimento Experimental de uma Vacina .....	55
<b>CAPÍTULO VII.....</b>		<b>59</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO VIII.....</b>		<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO .....</b>		<b>71</b>

# Abreviaturas

Abreviaturas	Significado
AAP	do inglês “American Academy of Pediatrics”
Abs	Absorvância
ACOG	do inglês “American College of Obstetricians and Gynecologists”
Alum	Sais de Hidróxido de Alumínio
BSA	Albumina sérica bovina
CDC	do inglês “Centers for Diseases Control”
CPS	do inglês “Capsule Polysaccharide”
CRL	do inglês “Cephalorachidian liquid”
CSF	do inglês “Cerebro-spinal fluid”
EDTA	do inglês “Ethylenediaminetetracetic acid”
ELISA	do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
EOD	do inglês “Early-Onset Disease”
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitonal
IPTG	Isopropil b-D-Tiogalacto-Piranosídeo
LOD	do inglês “Late-Onset Disease”
MLST	do inglês “Multilocus Sequence Type”
NCS	do inglês “ <i>Neospora caninum</i> Sonicate”
PBS	do inglês “Phosphate-Buffered Saline”
rGAPDH	GAPDH na forma recombinante
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SGB	<i>Streptococcus</i> do Grupo B
TBST	do inglês “Tris-Buffered Saline Tween”
VIP	do inglês “Virulence-associated Immunomodulatory Protein”

# **CAPÍTULO I.**



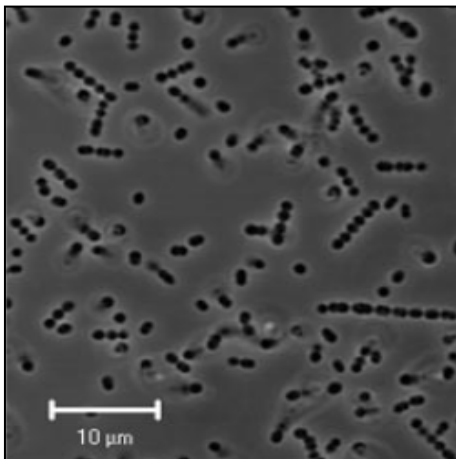
# 1. Introdução

## 1.1. *Streptococcus agalactiae*

As infecções bacterianas invasivas e a subsequente resposta inflamatória severa são uma importante causa de morbidade e mortalidade em recém-nascidos e adultos humanos<sup>1,2</sup>.

O *Streptococcus agalactiae*, ou *Streptococcus* do grupo B (SGB), causa pneumonia, septicemia e meningite em recém-nascidos. É ainda responsável por uma significativa morbidade em mulheres grávidas e em pessoas idosas, e causa de morte em adultos imuno-comprometidos. É uma bactéria diplococo (Figura 1) Gram-positiva,  $\beta$ -hemolítica, oportunista que coloniza o tracto gastrointestinal e genitourinário de mais de 40% da população feminina e 30% da população masculina<sup>3-6,10,48</sup>. Estima-se que 20 a 30% de todas as mulheres grávidas são colonizadas por *S. agalactiae*, podendo ser uma colonização permanente, intermitente ou transitória<sup>7-9</sup>.

Os isolados humanos de *S. agalactiae* expressam diferentes polissacarídeos capsulares (CPS - “Capsular Polysaccharide”), considerados o principal factor de virulência de que o microrganismo se serve para evadir os mecanismos de defesa do hospedeiro<sup>10,21,22</sup>. Os isolados de SGB podem ser divididos em dez serotipos CPS - Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e, o mais recentemente descoberto, IX, cada um estruturalmente e antigenicamente único<sup>11-21</sup>.

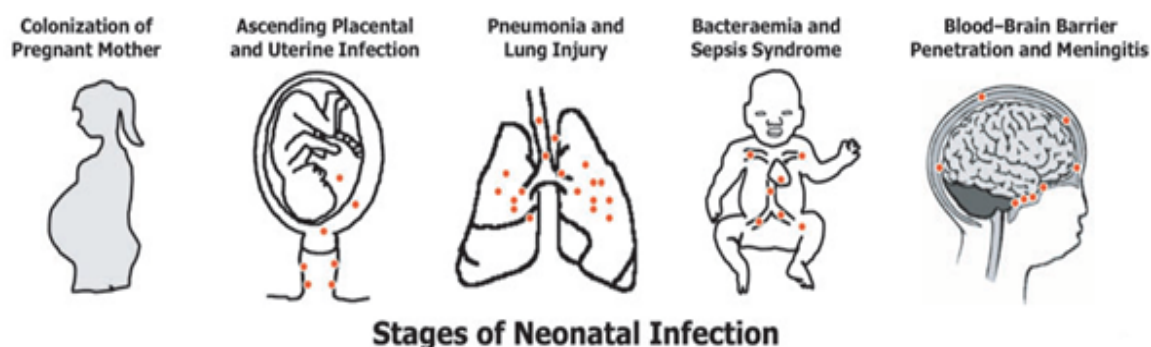


**Figura 1.** Imagem de Microscopia de Contraste de Fase de *S. agalactiae*, NEM 316 (Fonte: Lila Lalioui *et al.*, 2005)<sup>98</sup>.

## 1.2. Infecção e Transmissão

Durante as décadas de 1970 e 1980, o *S. agalactiae* foi reconhecido como um importante agente patogénico nos EUA e na Europa Ocidental<sup>101-104</sup>. É causador de significativa morbidade em mulheres, crianças recém-nascidas, idosos e uma causa importante de mortalidade em crianças recém-nascidas e, mais recentemente, em adultos imuno-comprometidos. Assim, desde os anos 70 que o SGB é considerado um dos principais agentes causadores de infecções e mortalidade em recém-nascidos, mas nas últimas duas décadas têm-se registado aumentos de duas a quatro vezes na incidência de infecções invasivas causadas por este agente em homens e mulheres, que não se encontram grávidas<sup>22-24</sup>.

A contaminação do recém-nascido ocorre principalmente de modo vertical e, portanto, caracteriza-se por transmissão *in utero* ou *intrapartum*<sup>25</sup>. No caso de a infecção ocorrer *in utero*, a bactéria presente no tracto genital materno ascende e contacta com o fluido amniótico<sup>25</sup> (Figura 2). Aqui, o *S. agalactiae* multiplica-se e, quando o feto aspira o fluido amniótico contaminado, a bactéria atinge o seu tracto respiratório. Como consequência, danifica as células epiteliais pulmonares, podendo desenvolver-se um quadro de pneumonia e a bactéria pode disseminar-se através da corrente sanguínea, causando septicemia, durante as primeiras horas de vida. A disseminação da bactéria na corrente sanguínea permite que esta tenha acesso a múltiplos locais do organismo do hospedeiro, onde penetra nos tecidos, podendo causar doenças como meningite e osteomielite<sup>20,23,27-29</sup>. Alternativamente, a contaminação do recém-nascido surge na passagem pelo canal de parto, quando este aspira fluido vaginal/amniótico contaminado com SGB<sup>26,29,30</sup>.



**Figura 2.** Progressão e estadios da infecção neonatal por *S. agalactiae* (Fonte: Kelly Doran e Victor Nizet, 2004)<sup>99</sup>.

Foi também referido que a transmissão pode ocorrer de forma horizontal, embora menos comum, e surge por contacto com o microrganismo através de outras crianças infectadas ou de pessoas que estiveram expostas à bactéria (i.e. enfermeiras) e que contactam com a criança<sup>23</sup>.

### **1.3. Doenças causadas por SGB**

#### **1.3.1. Morbilidade perinatal:**

A colonização genital por *Streptococcus* do grupo B tem sido considerada como uma possível causa de ruptura prematura de membranas e partos prematuros. Muitos estudos prospectivos sugerem também que a colonização por SGB pode ser uma causa para a ocorrência de morte intra-uterina, abortos tardios e recém-nascidos de baixo peso<sup>46,47</sup>.

#### **1.3.2. Infecção materna:**

Durante a gravidez, a colonização da mulher é geralmente assintomática, no entanto a bactéria pode causar problemas como infecção do tracto urinário, corioamnionite, endometrite e septicemia<sup>7,31</sup>. A colonização da mulher grávida aumenta a probabilidade de complicações graves como aborto, trabalho de parto prolongado, parto prematuro, ruptura prematura das membranas e transmissão perinatal do microrganismo<sup>20,32,33</sup>.

#### **1.3.3. Doença neonatal:**

Antes de 1960, a doença provocada por *Streptococcus* do grupo B em recém-nascidos era pouco conhecida. Entre os anos de 1960 e 1970, muitos investigadores reconheceram a importância desta doença<sup>39,40</sup> e o seu enorme impacto na morbilidade e mortalidade neonatal, tendo ultrapassado (mas

nunca substituído) outros agentes patogénicos, tais como a *Escherichia coli*, como causa de sepsis e meningite neonatal<sup>41</sup>.

Tradicionalmente, a doença de SGB em recém-nascidos é classificada em dois tipos, doença do tipo precoce (EOD – “Early-onset Disease”) e doença do tipo tardia (LOD – “Late-onset Disease”), dependendo da idade da criança na altura das manifestações da doença<sup>32</sup>.

Na doença do tipo precoce, a infecção surge no recém-nascido nas primeiras horas ou dias de vida (≤ 7 dias de vida) e, na maioria dos casos as evidências da doença ocorrem nas primeiras 24 horas após o nascimento. A colonização materna é um pré-requisito para o desenvolvimento da doença precoce no recém-nascido, pois geralmente este é infectado pelo *S. agalactiae* antes ou durante o processo de nascimento (parto), é assim designada por transmissão vertical. Alguns tipos de EOD podem surgir devido à exposição do recém-nascido ao SGB durante a passagem pelo canal de parto, mas a maioria das infecções precoces surgem devido ao movimento de ascensão da bactéria pelo canal genital até ao líquido amniótico<sup>33,34</sup>.

O primeiro sintoma da doença precoce é, em mais de 80% dos casos, falha respiratória, devido à colonização do tracto respiratório pelo SGB. A manifestação mais comum da doença é pneumonia, que rapidamente pode progredir para bacteriemia e choque séptico. Cerca de 10% dos recém-nascidos têm também meningite<sup>34,44</sup>. A incidência da EOD é aproximadamente 10 vezes superior em recém-nascidos prematuros do que em recém-nascidos termo<sup>44</sup>.

Dos isolados clínicos de recém-nascidos com EOD, os serotipos de SGB mais frequentemente encontrados são, por ordem descendente de prevalência: Ia, III e V<sup>23</sup>.

A doença do tipo tardia pode surgir na criança até alguns meses de idade (7-90 dias de vida), mas a idade média em que esta surge é por volta de 1 mês de idade. A forma como a criança é infectada pelo *S. agalactiae* para adquirir a LOD ainda não é completamente compreendida, no entanto, são reconhecidos como factores de risco: transmissão vertical ou horizontal, aquisição nosocomial e prematuridade<sup>29,35-38</sup>.

A LOD é caracterizada pela infecção na corrente sanguínea. As manifestações clínicas mais comuns são a meningite e a bacteriemia<sup>28</sup>. Os primeiros sinais da doença são normalmente febre, letargia, irritabilidade, desnutrição e taquipneia<sup>23</sup>.

A doença do tipo tardia é menos frequente do que a precoce, contudo, a sua incidência não diminuiu com a implementação dos procedimentos profiláticos. A taxa de mortalidade para a LOD é de 2-6%, a qual é significativamente inferior à taxa de aproximadamente 5-10% na EOD<sup>4,36</sup>.

Muito preocupante e de grande importância é a morbidade causada pela doença tardia, que tem uma taxa elevada. Aproximadamente 50% dos recém-nascidos que sobrevivem à meningite sofrem complicações, incluindo sequelas neurológicas, cegueira cortical, surdez e atraso na linguagem e discurso<sup>20,45</sup>.

Os serotipos de SGB mais frequentemente encontrados nos isolados clínicos de pacientes com LOD são, por ordem descendentes de prevalência: III, Ia e V<sup>23</sup>.

Antes da introdução da profilaxia antibiótica *intrapartum* na década de 1990, as taxas de incidência descritas eram de 1-3/1000 nados vivos na doença do tipo precoce e 0,7/1000 nados vivos na doença do tipo tardia<sup>42</sup>. Desde que as recomendações para a profilaxia *intrapartum* foram implementadas, a taxa de incidência da EOD diminuiu para menos de 1/1000 nascimentos, contudo a taxa da LOD não diminuiu substancialmente<sup>36</sup>.

Avanços recentes na percepção, diagnóstico e tratamento da sepsis neonatal têm resultado numa significativa diminuição da mortalidade associada com a doença de SGB, de valores aproximadamente de 50% em 1970 para 5% em anos mais recentes<sup>4,10</sup>. No entanto, e apesar do sucesso da implementação da profilaxia antibiótica *intrapartum* na prevenção da transmissão do SGB mãe-filho, as taxas de aborto, partos prematuros e doença tardia não diminuíram. Morbidade severa nos sobreviventes da infecção por SGB varia entre 20 e 60% e incluem sequelas neurológicas, como as referidas anteriormente e, também, vários tipos de atraso mental, paralisia cerebral e epilepsia<sup>7,43</sup>.

#### **1.3.4. Infecção em adultos:**

Infecções invasivas do *Streptococcus* do grupo B causam uma significativa morbidade e mortalidade em adultos, homens e mulheres, não grávidas<sup>49</sup>. Estão particularmente em risco, os idosos, adultos imuno-comprometidos e adultos com doenças graves, como cancro e diabetes<sup>48,49</sup>.

As manifestações clínicas mais comuns da infecção por SGB em adultos são: infecções da pele, tecido mole e tracto urinário, bacteriemia, urosepsis, pneumonia, artrites, osteomielites, peritonites e endocardites<sup>48,49</sup>. O serotipo V do *S. agalactiae* está presente em 30-45% das infecções invasivas na população de adultos, homens e mulheres, não grávidas<sup>50</sup>.

A recente descoberta de estirpes de SGB resistentes à penicilina, clindamicina e eritromicina, representam uma significativa preocupação no tratamento das infecções<sup>30</sup>.

#### **1.4. Factores de risco maternos para a doença neonatal**

O maior factor de risco para a doença neonatal é a colonização materna do tracto genitourinário e gastrointestinal<sup>51</sup>. Aproximadamente metade das crianças que nascem de mães colonizadas por SGB ficam colonizadas durante o nascimento e, destas 1-2% irá desenvolver doença clínica<sup>41,51</sup>. Alternativamente à infecção durante o processo de nascimento, estima-se que aproximadamente 6% das crianças colonizadas adquira o SGB por transmissão horizontal, ou seja, por contacto com pessoas expostas à bactéria, nomeadamente técnicos de saúde que tratam da criança nas primeiras horas/dias após o nascimento<sup>52</sup>.

Na maioria dos casos de doença neonatal do tipo precoce não se consegue identificar um factor de risco associado, no entanto a probabilidade de o recém-nascido contrair a doença aumenta nas seguintes condições: parto prematuro (< 37 semanas de gestação), febre ou outras evidências de corioamnionite materna, ruptura prolongada de membranas (18 horas), infecção urinária materna por SGB em qualquer altura da gravidez, gravidez anterior com doença neonatal precoce<sup>53</sup>. Outros factores descritos incluem, inóculo vaginal elevado, deficiência de anticorpos maternos específicos, idade materna inferior a 20 anos e mães de raça negra<sup>54,55</sup>.

As taxas de colonização materna têm sido descritas com uma variação entre 5 e 40%, devendo-se esta variabilidade a factores demográficos e populacionais<sup>41</sup>. Factores demográficos associados com as elevadas taxas de colonização incluem mulheres afro-americanas e com *Diabetes mellitus*<sup>41</sup>. As taxas mais reduzidas de colonização verificam-se em mulheres sexualmente inexperientes, asiático-americanas e méxico-americanas, e mulheres idosas<sup>41</sup>. A

metodologia utilizada para detectar o SGB tem também influência na variabilidade observada nos diversos estudos. O uso do meio de cultura selectivo, culturas recolhidas de múltiplos locais, incluindo a área vaginal inferior, puerperal e recto, e colecções de amostras recolhidas em diferentes pontos de tempo, todos estes factores em conjunto levam a uma taxa de detecção óptima<sup>41</sup>.

## **1.5. Prevenção e tratamento da doença neonatal**

### **1.5.1. Profilaxia *intrapartum*:**

Nos anos 70, o *Streptococcus* do grupo B surgiu como o principal agente infeccioso causador de morbidade e mortalidade neonatal nos Estados Unidos<sup>101-103</sup>. Os primeiros casos descritos indicaram uma taxa de mortalidade superior a 50%. Nessa altura, iniciaram-se muitos estudos para se determinarem os factores de risco associados à infecção por *S. agalactiae* em recém-nascidos e a susceptibilidade da bactéria a antibióticos<sup>10</sup>.

No início dos anos 80, ensaios clínicos demonstraram que a administração de antibióticos durante o parto, a mulheres com risco de transmitir o *S. agalactiae* aos seus recém-nascidos, podia prevenir a doença invasiva na primeira semana de vida, isto é, a doença do tipo precoce<sup>56</sup>. Os antibióticos seleccionados para estes ensaios clínicos foram a ampicilina e a penicilina, devido à já comprovada susceptibilidade do SGB a ambos. Estes antibióticos demonstraram semelhante eficácia, contudo a taxa de mortalidade neonatal associada às doenças por SGB não baixou de valores entre 10-15%<sup>10</sup>.

Como resultado de estudos colaborativos entre clínicos, investigadores, organizações profissionais e comunidade de saúde pública, em 1996 foram publicados pelas organizações de saúde americanas, ACOG (*American College of Obstetricians and Gynecologists*) e CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*)<sup>57</sup>, os protocolos com as recomendações para profilaxia *intrapartum* como prevenção para a doença perinatal por SGB, e em 1997 pela AAP (*American Academy of Pediatrics*)<sup>58</sup>.

As recomendações do protocolo basearam-se em dois métodos de prevenção, um associado aos factores de risco e o outro baseado no rastreio para colonização vaginal e rectal por SGB de todas as mulheres grávidas, entre

a 35.<sup>a</sup> e a 37.<sup>a</sup> semana de gestação. As grávidas colonizadas recebem antibióticos *intrapartum* no momento do parto. Em ambas as estratégias, mulheres com bacteriemia devida a SGB durante a sua gravidez, ou que em gravidez prévia tiveram um recém-nascido com doença precoce de SGB, são candidatas para a profilaxia antibiótica *intrapartum*<sup>59</sup>.

Anteriormente à implementação activa dos protocolos de prevenção, a ocorrência estimada de casos de doença neonatal causada por SGB era de 7500 por ano<sup>60</sup>. Apesar do declínio da incidência da doença coincidir com o aumento dos procedimentos de prevenção dos anos 90, a doença de SGB permanece como a principal causa infecciosa de morbidade e mortalidade de recém-nascidos nos Estados Unidos<sup>36,61</sup>. Além disto, desde a implementação do protocolo de 1996, novos dados ficaram disponíveis para avaliar a eficácia do procedimento de rastreio relativamente ao procedimento baseado em factores de risco e para resolver os desafios clínicos da implementação dos procedimentos de prevenção<sup>59</sup>.

Com base nos novos dados, em Novembro de 2001, o CDC reuniu-se com diversos parceiros para ser feita uma revisão das recomendações de 1996, para a prevenção da doença perinatal do *Streptococcus* do grupo B. Em 2002, foi publicada a revisão do prévio protocolo de prevenção, baseado numa única estratégia de prevenção, no rastreio universal para colonização vaginal e rectal por SGB de todas as mulheres grávidas, entre a 35.<sup>a</sup> e a 37.<sup>a</sup> semana de gestação. As grávidas colonizadas recebem antibióticos *intrapartum* no momento do parto<sup>59</sup>.

A aplicação do protocolo alargou-se a vários países, incluindo Portugal<sup>62</sup>, e fez baixar a taxa de mortalidade neonatal associada às doenças por SGB para cerca de 5%<sup>10</sup>. O uso profiláctico de antibióticos *intrapartum* diminuiu significativamente a doença do tipo precoce, mas não demonstrou igual eficácia na prevenção da doença do tipo tardia, e foi acompanhado por um aumento de infecções perinatais graves causadas por organismos resistentes a antibióticos, especialmente *E.coli*<sup>10,20,63,64</sup>. Existem assim muitos benefícios, mas também muitas limitações nestes procedimentos de prevenção e novas estratégias, tais como o desenvolvimento de vacinas contra o SGB, serão a maior promessa para a prevenção das doenças causadas por este agente patogénico<sup>65,66</sup>.



### 1.5.2. Vacinas contra o *S. agalactiae*:

Como já referido anteriormente, a estratégia mais comum para a prevenção da doença causada por *S. agalactiae* é a administração de antibióticos no momento do parto. Embora este método tenha diminuído bastante a incidência de algumas doenças de SGB, não é completamente eficaz na prevenção<sup>65,66</sup>.

A vacinação como meio de prevenção apresenta inúmeras vantagens. Se, por um lado, pode prevenir a patologia causada por SGB, pode também prevenir os nascimentos prematuros ou a morte fetal causadas pela infecção provocada pelo SGB. Além disso, poderá ser uma forma de evitar reacções alérgicas à penicilina (antibiótico administrado em primeiro lugar na profilaxia *intrapartum*) e previne o aparecimento de bactérias resistentes a estes antibióticos.

Nos esquemas de classificação de Lancefield para os *Streptococcus*, faziam parte estudos em animais e estabeleceu-se que se poderia obter protecção contra infecções por SGB em ratinhos, usando soro policlonal de coelho específico para os polissacarídeos da cápsula (CPS)<sup>67</sup>. Estudos posteriores mostraram que a transferência de anticorpos específicos para os CPS da mãe para o feto é importante para proteger contra infecções por SGB<sup>70</sup> e evidenciaram uma associação inequívoca entre o baixo nível de anticorpos contra os CPS e a maior susceptibilidade dos recém-nascidos às infecções por SGB<sup>10,54</sup>.

Em 1978, a primeira vacina com base nos CPS do serotipo III foi testada em ensaios de fase I e posteriormente em mulheres grávidas<sup>69,70</sup>. Apesar destes estudos terem demonstrado uma relação directa entre os níveis de IgG específicos para os CPS maternos e os presentes no cordão umbilical, a imunogenicidade deste polissacarídeo teria de ser aumentada, pois apenas 60% dos indivíduos vacinados apresentam uma resposta com produção de IgG. Para ultrapassar esta limitação, o CPS foi directamente ligado a uma proteína transportadora imunogénica, originando as chamadas “vacinas conjugadas”. As primeiras vacinas contra SGB foram preparadas com o CPS do serotipo III acoplado com o toxóide do tétano. Estas vacinas originaram títulos mais

elevados de IgG para o CPS do que os obtidos com a vacina baseada no CPS do serotipo III que não possuíam uma proteína ligada<sup>71,72</sup>.

Foram realizados ensaios clínicos com as vacinas conjugadas, contra cada um dos serotipos Ia, Ib, II-VIII (o serotipo IX foi recentemente descoberto), que demonstraram que eram seguros e imunogênicos, induzindo IgG específicas contra os CPS. Contudo, e como era esperado, estas vacinas são específicas para cada serotipo e não oferecem protecção contra outros serotipos<sup>20</sup>.

Muitos autores defendem que uma vacina multivalente, contendo os CPS dos serotipos mais prevalentes, poderia debelar a maioria dos isolados<sup>73,74</sup>. No entanto, uma vacina global e efectiva baseada nos CPS não alcançará total eficácia, devido à variação serotípica com as regiões geográficas e origem étnica do hospedeiro<sup>27</sup>, e ainda devido à existência de isolados não serotipáveis<sup>75</sup>.

Surgiu posteriormente a ideia de utilizar proteínas da superfície do SGB para a construção de uma vacina, como os antigénios  $\alpha^{73}$  e  $\beta^{77}$  do complexo proteína C, Rib<sup>79</sup>, Sip<sup>78</sup> ou C5a peptidase<sup>76</sup>, ou usando essas proteínas como transportadores dos CPS em vacinas conjugadas, substituindo o toxóide do tétano<sup>73</sup>. Porém, alguns dos antigénios proteicos investigados são específicos para um grupo restrito de estirpes<sup>75</sup>, não sendo candidatos a uma vacina universal<sup>20</sup>.

Seguindo o que já tinha sido feito para outros agentes patogénicos<sup>80,81</sup> e após se ter identificado a GAPDH (Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase) como uma proteína imunomodulatória associada com a virulência (VIP) do *S. agalactiae*<sup>82</sup>, o nosso grupo de investigação mostrou que a imunização com GAPDH recombinante (rGAPDH) levava a um aumento de anticorpos específicos contra a proteína e conferindo protecção contra a infecção pela estirpe NEM 316 de SGB em ratinhos BALB/c adultos. Foi ainda observado que a imunização das mães com a rGAPDH conferia protecção às crias recém-nascidas e que essa protecção se devia aos anticorpos anti-rGAPDH (resultados ainda não publicados).

## **1.6. Epidemiologia**

### **1.6.1. Estados Unidos:**

Estudos epidemiológicos realizados na era pré-prevenção revelaram uma incidência de 1 a 3 casos de doença precoce neonatal devida a SGB por cada 1000 nados-vivos, com uma taxa de mortalidade de 20 a 50%<sup>36,83</sup>.

Com a publicação do primeiro protocolo de prevenção da doença do SGB, em 1996, foi descrito um decréscimo de 68% na incidência da doença precoce neonatal, de 1,7/1000 nados-vivos em 1993 para 0,6/1000 nados-vivos em 1998<sup>36,59</sup>. A publicação do protocolo de 2002, que nasceu da revisão do primeiro protocolo e que recomenda rastreio universal para o SGB, foi prevista para reduzir a incidência para 0,32 por 1000 nados-vivos<sup>84</sup>.

Nos Estados Unidos, a prevalência de colonização materna com SGB oscila entre 10 e 30%<sup>88</sup>. Um estudo realizado por Christina Phares e colaboradores, entre 1995 e 2005 nos Estados Unidos, mostrou que a incidência da EOD nos anos que se seguiram à implementação do protocolo de prevenção diminuiu para 0,34 por 1000 nados-vivos. No caso da LOD, não se verificou diminuição da incidência, estando estes dados em concordância com outros estudos que sugerem que a quimioprofilaxia intrapartum não previne a doença do tipo tardia<sup>85</sup>.

Contrariamente à doença neonatal precoce, a incidência das doenças de SGB em adultos, homens e mulheres, não grávidas, aumentou 32% entre 1999 e 2005, atingindo valores de 7,9 por 100 000 indivíduos, em 2005<sup>85</sup>. A taxa de mortalidade directamente atribuída às infecções por SGB nestes indivíduos, varia entre 9 e 26%, tendo mesmo aumentado nos últimos anos<sup>86,87</sup>.

### **1.6.2. Europa:**

As taxas de colonização maternas e neonatais por *S. agalactiae* têm demonstrado alguma variabilidade entre diferentes países, ou diferentes

grupos étnicos dentro do mesmo país, e parece estar correlacionado com as taxas de infecção invasiva nos recém-nascidos<sup>90,91</sup>.

Em 2008, Egle Barcaite e colaboradores<sup>89</sup>, publicaram um trabalho com a prevalência da colonização materna por SGB em países da Europa, entre 1996 e 2006. Neste artigo de revisão foram consideradas publicações referentes a estudos na Europa de Leste (Polónia e República Checa), Europa Ocidental (França, Alemanha, Reino Unido, Irlanda e Holanda), Escandinávia (Islândia, Dinamarca e Suécia) e Europa do Sul (Itália, Turquia e Grécia). As taxas de colonização vaginal por SGB variam entre 6,5 e 36% na Europa. Esta variabilidade verificou-se também entre regiões, sendo que na Europa de Leste as taxas são de 19,7-29,3%, na Europa Ocidental de 11-21%, na Escandinávia de 24,3-36%, e na Europa do Sul de 6,5-32%<sup>89</sup>. Existem evidências acerca da significativa variação geográfica na proporção de mulheres colonizadas com SGB<sup>90,91</sup>. A incidência da EOD de *S. agalactiae* nos países da Europa varia entre 0,4-2,0 por 1000 nados-vivos, sendo a percentagem de casos fatais de 7,5 a 14%<sup>92,93,94</sup>. As diferenças encontradas nas taxas de prevalência nos países europeus, podem ser em parte explicadas não só pelos diferentes métodos de detecção utilizados, mas também diferenças no ambiente do estudo (hospitalar, regional, nacional) e/ou características da população alvo do estudo.

As taxas de colonização materna por SGB em diferentes países da Europa, surgem semelhantes com as taxas de outros países industrializados, tais como Estados Unidos (10-30%)<sup>59</sup>, Canadá (11-19,5%)<sup>95</sup> e Nova Zelândia (20%)<sup>96</sup>.

### **1.6.3. Portugal:**

É importante referir que no nosso país existe somente um estudo publicado acerca da prevalência da doença por SGB, em crianças. Este trabalho, publicado em 2008, mostrou também alguma variação de acordo com as áreas geográficas: 0,9/1000 nados-vivos no Norte, 0,4/1000 nados-vivos no Centro, Lisboa e Vale do Tejo, 0,1-0,2/1000 nados-vivos no Algarve e Ilhas<sup>62</sup>. Em 2002, 2003 e 2004 a incidência estimada da doença foi, respectivamente: 0,60; 0,58 e 0,38 por 1000 nados-vivos. O que demonstra um decréscimo significativo

entre 2002 e 2004. A incidência global da doença é de 0,54 por 1000 nados-vivos. A taxa de mortalidade descrita neste estudo foi de 6,6%, sendo semelhante tanto para a doença do tipo precoce (6,7%) como para a doença do tipo tardia (6,3%), mas superior nos nascimentos pré-termo (15,2%) e recém-nascidos com muito baixo peso (18%), quando comparada com os nascimentos termo (4,6%). A taxa de mulheres grávidas com cultura positiva para SGB varia entre 35% no Norte e 13% no Sul do país. Ao longo dos três anos do referido estudo, a mortalidade, devido a infecção de SGB em recém-nascidos, diminuiu de 8,7% em 2002, para 6,1% em 2003 e para 2,3% em 2004<sup>62</sup>.

A incidência da doença varia em termos geográficos, mesmo num país pequeno como Portugal, reflectindo provavelmente a variação geográfica da colonização por SGB durante a gravidez.

A mortalidade de 6,6% encontrada neste estudo, em Portugal, é semelhante à descrita por outros estudos realizados noutros países da Europa: 9,7% no Reino Unido<sup>93</sup> e 4,3% na Alemanha<sup>97</sup>.

É com base nos valores de prevalência da infecção pelo *S. agalactiae* apresentados nesta introdução que incide a importância deste trabalho, e a urgência dos vários profissionais (clínicos, investigadores) unirem esforços para se encontrarem formas eficazes de prevenir e combater as doenças provocadas por este agente, tanto em recém-nascidos, como em mulheres grávidas e homens.

## **CAPÍTULO II.**

## 2. Relevância médico-legal

---

Mais de 40 anos se passaram desde que o *S. agalactiae* surgiu como um dos mais importantes patógenos em humanos, particularmente em mulheres grávidas e recém-nascidos<sup>100</sup>.

Há aproximadamente 15 anos atrás, surgiram as primeiras estratégias preventivas para controlar a sepsis neonatal do tipo precoce causada por SGB. Os primeiros protocolos de prevenção formulados pelo CDC (*Centers for Diseases Control*), ACOG (*American College of Obstetricians and Gynecologists*) e APP (*American Academy of Pediatrics*) surgiram em 1996, e com estas recomendações surgiram duas estratégias de prevenção que se baseavam em factores de risco e rastreio para a colonização de SGB<sup>37</sup>. Em 2002, foi publicada a revisão do protocolo de prevenção inicial, que focou uma única estratégia de rastreio universal para a colonização de *S. agalactiae* em mulheres grávidas, entre a 35.<sup>a</sup> e a 37.<sup>a</sup> semana de gestação, com administração de profilaxia antibiótica *intrapartum* para todas as mulheres colonizadas<sup>59</sup>.

Com o desenvolvimento das referidas estratégias preventivas, tem-se evidenciado um significativo decréscimo da incidência de doenças perinatais relacionadas com o *S. agalactiae*. No entanto, permanecem ainda muitas questões relativamente a procedimentos óptimos para a prevenção da doença do tipo precoce (EOD) e não existem ainda estratégias efectivas para prevenir a doença neonatal do tipo tardia (LOD), bem como a incidência de prematuridade e abortos espontâneos devidos ao *S. agalactiae*<sup>100</sup>.

Em Portugal existem poucos estudos publicados acerca da prevalência da doença por *S. agalactiae*. Um estudo realizado no nosso país, por M. T. Neto<sup>62</sup>, em crianças com idade inferior a 90 dias de vida que desenvolveram infecção por SGB, apresenta uma taxa de mortalidade de 6,6%. A taxa de mulheres grávidas com cultura positiva para SGB varia entre 35% no Norte e 13% no Sul do país, no mesmo estudo<sup>62</sup>.

Como referido anteriormente, o facto de não existir uma base de dados, com os valores de prevalência da infecção por *S. agalactiae* em grávidas e

recém-nascidos em Portugal, e existirem poucos estudos realizados reportando esta problemática, motivou o desenvolvimento do tema e objectivos deste trabalho no âmbito médico-legal.

O alvo terapêutico mais investigado nos últimos anos e onde têm incidido os maiores esforços, pois acredita-se ser este o caminho certo para uma prevenção efectiva das doenças provocadas pelo SGB, é o desenvolvimento de uma vacina. A imunização de todas as adolescentes não grávidas ou de mulheres durante o terceiro trimestre de gravidez poderá prevenir a transmissão vertical de *S. agalactiae* durante o parto. A vacina fornecerá transferência transplacentária de anticorpos IgG da mãe para o feto. O desenvolvimento de uma vacina efectiva contra o SGB irá também eliminar a necessidade de rastreio pré-natal de SGB, bem com o uso da profilaxia antibiótica *intrapartum* e os seus possíveis efeitos adversos. Assim, os custos dos cuidados com as mulheres grávidas e recém-nascidos diminuirão muito<sup>10,20,59</sup>.

Em conjunto, estes dados reforçam a relevância do *S. agalactiae* como uma preocupação de Saúde Pública para grávidas e recém-nascidos, e a necessidade de prevenção adicional e estratégias terapêuticas mais eficazes contra as infecções causadas por esta bactéria.



## **CAPÍTULO III.**

## 3. Objectivos

---

A infecção por *Streptococcus agalactiae* é causa de morbilidade e mortalidade em recém-nascidos. A principal forma de contaminação do recém-nascido é através da colonização materna, sendo este o principal factor de risco para infecção neonatal. Actualmente a forma mais eficaz que existe de prevenção é o rastreio para a colonização de *S. agalactiae* em todas as grávidas no terceiro trimestre de gestação (entre a 35.<sup>a</sup> e a 37.<sup>a</sup> semana) e consequente quimioprofilaxia a todas as mulheres colonizadas. Estima-se que em Portugal a taxa de colonização materna varia entre 15 e 35%<sup>62</sup>.

Embora muitos clínicos e investigadores dediquem o seu trabalho às infecções causadas por esta bactéria e à prevenção das mesmas, em Portugal existem ainda escassos estudos apresentando taxas de prevalência da colonização por *S. agalactiae* em grávidas e recém-nascidos. Assim, é de grande relevância efectuarem-se estudos de prevalência em diferentes pontos do nosso país, para que se possa organizar uma base de dados com as taxas de prevalência de colonização por esta bactéria em Portugal.

É também de grande preocupação e urgência de clínicos (obstetras, ginecologistas, pediatras, microbiologistas) e investigadores, o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes, mais concretamente o desenvolvimento de vacina eficaz contra todas as estirpes de *S. agalactiae*.

Tendo em conta esta realidade e o enquadramento do trabalho, foram formulados os objectivos para o estudo aqui apresentado.

### 3.1. Geral:

Este trabalho teve dois objectivos principais:

- i. Avaliar a importância médico-legal da infecção provocada pelo *S. agalactiae* em grávidas assistidas no Hospital de Santo António (HSA);
- ii. Ensaios experimentais para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o SGB.

### 3.2. Específicos:

#### Estudo de Prevalência

Levantamento da prevalência de colonização por *S. agalactiae* em grávidas, entre a semana 35 e 37 de gestação, assistidas no Serviço de Obstetrícia do HSA, no período de 2005 a 2008, onde foi avaliada:

- A relação entre a taxa de colonização materna e a faixa etária materna;
- A relação entre a taxa de colonização materna e a sua variação ao longo dos anos de estudo.

#### Desenvolvimento Experimental de uma Vacina

- Imunização activa: vacinação materna com a Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase recombinante (rGAPDH) e avaliação da protecção da descendência à infecção por SGB;
- Imunização passiva: administração de anticorpos anti-rGAPDH a recém-nascidos, 12 horas antes da infecção por SGB.

## **CAPÍTULO IV.**

## **4. Material e Metodologia**

---

### **4.1. Estudo de Prevalência**

Numa fase inicial deste trabalho foi redigido um ofício dirigido a vários hospitais portugueses, com um pedido de autorização para aceder aos dados relativos a infecções e taxas de prevalência de colonização por *S. agalactiae* em grávidas e recém-nascidos (Anexo I.A.). Este pedido foi feito numa tentativa de se proceder a uma pesquisa alargada e reunir dados de diversos pontos do nosso país. Por diversas razões, nomeadamente, demora no processo de autorização, ausência de resposta, recusa do pedido e tempo limitado para a realização deste trabalho, foi somente possível realizar o levantamento de dados de grávidas assistidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital de Santo António (HSA), no período de 1 de Janeiro de 2005 a 31 de Dezembro de 2008.

#### **4.1.1. População e amostra:**

A população em estudo foram mulheres grávidas, assistidas no Serviço de Obstetrícia, que realizaram rastreio para a pesquisa de *S. agalactiae*.

A amostra foi representada por 2786 mulheres grávidas, que realizaram o rastreio para a pesquisa de *S. agalactiae* entre a 35.<sup>a</sup> e a 37.<sup>a</sup> semana de gestação, com idades compreendidas entre os 12 e os 47 anos, no período compreendido entre 1 de Janeiro de 2005 e 31 de Dezembro de 2008.

#### **4.1.2. Recolha de dados:**

Foram recolhidos dados relativos à análise dos resultados respectivos ao rastreio de *S. agalactiae* em grávidas no terceiro trimestre de gestação, a partir de amostras de exsudado recto-vaginal recolhidas (Anexo I.B.) no Serviço de Obstetrícia e destinados ao Serviço de Microbiologia Médica, entre 2005 e 2008.

A recolha dos dados foi efectuada com recurso ao *software* do Laboratório de Microbiologia Médica, *Modulab* e *Vigiact*<sup>TM</sup>, que utilizam um sistema de base de dados da Izasa e Biomérieux, respectivamente.

## **4.2. Desenvolvimento Experimental de uma Vacina**

Devido à pertinência do desenvolvimento de uma vacina eficaz contra as doenças provocadas por *S. agalactiae*, foram realizados ensaios de imunoprotecção contra a infecção por *S. agalactiae*, usando como antigénio alvo a rGAPDH. Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Imunologia Mário Arala-Chaves, do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS).

### **4.2.1. Animais**

Para este trabalho experimental foram usados murganhos, fêmeas BALB/c e C57BL/6, com 6 e 8 semanas de idade, e coelhos New Zealand criados no *Charles River Laboratories* (Barcelona, Espanha). Os animais foram mantidos no Biotério do ICBAS sob condições padrão de temperatura e humidade. As experiências com animais foram realizadas de acordo com a Convenção Europeia sobre a Protecção dos Animais Vertebrados utilizados para fins experimentais e/ou outros fins científicos (ETS 123) e com a Directiva 86/609/EEC e Normas Portuguesas (DL 129/92).

### **4.2.2. Bactéria**

O isolado clínico de *S. agalactiae* NEM2060 usado neste estudo, foi gentilmente cedido pelo Doutor Patrick Trieu-Cout, do Instituto Pasteur de Paris. O isolado clínico foi cultivado em meio líquido (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, Mi) e em agar (Brain Heart Infusion, Difco 0418), a 37°C. Posteriormente, a bactéria foi cultivada em meio Todd Hewitt Bacto (Difco) suplementado com 0,001 mg/mL de sulfato de colistina e 0,5 mg/mL de ácido oxalínico (*Streptococcus Selective Supplement*, Oxoid, Hampshire, Inglaterra) até uma concentração de aproximadamente 10<sup>9</sup> células/mL, sendo alíquotada

e guardada em ampolas a -70°C em Todd Hewitt Bacto (Difco) com 25% (v/v) de glicerol.

#### 4.2.3. Obtenção de GAPDH recombinante de *S. agalactiae* (rGAPDH)

*Os passos de produção e expressão da rGAPDH foram efectuados no Instituto Pasteur.*

##### 4.2.3.1. Produção da rGAPDH:

O gene *gapdh* foi amplificado por PCR do DNA cromossomal de *S. agalactiae* com *primers* que introduziam um *NcoI* e um local *XhoI* no final do fragmento amplificado. O fragmento de PCR que contém o local de iniciação (ATG), mas não o codão STOP (TAA) foi clonado em *NcoI/XhoI*-cut pET28a na “frame” com a cauda de histidinas no C-terminal. As células BL21 (DE3) de *E.coli* foram transformadas com o resultante plasmídeo recombinante (pET28\_ *gapdh*).

##### 4.2.3.2. Expressão da rGAPDH:

A proteína recombinante foi produzida em *E. coli* BL21. Colocou-se a crescer a estirpe de *E. coli* transformada em meio Todd, com Kanamicina 50 mg/mL (Sigma, K-1377), durante 4 horas, a 37°C com agitação contínua (80 rpm), até se atingir a densidade óptica de 0,7-0,9 ( $\lambda=600\text{nm}$ ).

Induziu-se a expressão da rGAPDH adicionando Isopropil  $\beta$ -D-Tiogalacto-Piransídeo (IPTG) (Sigma, I-5502), para uma concentração final de 1 mM. Incubou-se novamente a cultura, *overnight* nas mesmas condições.

As células foram separadas por centrifugação (Sorvall, RC5), a 12000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e ressuspendeu-se o *pellet* em 1:10 do volume total em Start Buffer (Anexo II).

A amostra foi incubada com lizosima 100  $\mu\text{g/mL}$  (Sigma) e Triton X-100 10% (Sigma) em gelo, durante 90 minutos. Após sonicar (MSE) 10 vezes

durante 30 segundos cada, a amostra foi centrifugada a 12 000 rpm (Sorvall, RC5), 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi filtrado sob vácuo, com filtro de 0,2 µm (Schleider & Schuell).

#### **4.2.4. Purificação da rGAPDH:**

A rGAPDH foi purificada recorrendo a uma coluna de Níquel (Ni<sup>2+</sup>), com afinidade para as caudas de histidina (HisTrap™ Chelating HP - Amersham Biosciences).

Antes de aplicar a amostra foi necessário equilibrar a coluna com 50 mL de Start Buffer, usando uma bomba peristáltica (Miniplus 2, Gilson) com fluxo de 3 mL/min. De seguida, passou-se a amostra 2x (com fluxo de 2 mL/min), tendo o cuidado de limitar o volume da amostra a 10x a capacidade da coluna. No passo seguinte, eluiu-se a coluna com concentrações crescentes de Imidazole, com um fluxo de 3 mL/min. As proteínas foram eluídas, sequencialmente, com 60 mL de soluções de Imidazole 60 mM e 100 mM (Anexo II). Recolheram-se fracções de 30 mL. Depois, aplicou-se na coluna 45 mL de uma solução de Imidazole 300 mM. Recolheu-se, em gelo, duas fracções de 30 e 15 mL. Seguidamente aplicou-se 50 mL de uma solução de Imidazole 500 mM, recolhendo-se os primeiros 30 mL.

Por fim, a coluna foi novamente equilibrada com 50 mL de Start Buffer.

A fracção contendo a rGAPDH (primeiros 30 mL do eluato com a solução de Imidazole 300 mM) foi concentrada e dialisada contra tampão fosfato (PBS - "Phosphate-buffered saline") (Anexo II), num sistema de filtro centrífugo Amicon Ultra-15 (Milipore) com "cut off" de 10 KDa, conforme as instruções do fabricante.

Verificou-se a eficácia do processo de purificação através da análise das fracções recolhidas num gel de SDS-PAGE.

#### **4.2.5. Regeneração da Coluna de Níquel (Ni<sup>2+</sup>):**

Para aumentar o rendimento da purificação e o tempo de vida da coluna, esta foi regenerada após cada dois procedimentos de purificação. Cada solução foi passada pela coluna com um fluxo de 3 mL/min, usando uma



bomba peristáltica (Miniplus 2, Gilson). Aplicaram-se 25 mL de EDTA 50 mM em Start Buffer, para remover o Níquel. De seguida, removeu-se o EDTA com 50 mL de água apirogénica (Braun) e aplicaram-se 10 mL de Sulfato de Níquel ( $\text{NiSO}_4$ ) 0,1 M. O excesso de  $\text{Ni}^{2+}$  foi removido com 50 mL de água apirogénica. Para finalizar a regeneração, equilibrou-se a coluna com 50 mL de Start Buffer.

A coluna foi guardada em Etanol 20%, a 4°C.

#### **4.2.6. Doseamento de Proteínas**

##### **4.2.6.1. Método de Lowry:**

Todos os doseamentos proteicos foram realizados pelo método de Lowry<sup>82</sup>.

O método de Lowry apresenta uma boa sensibilidade, detectando concentrações proteicas da ordem dos 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

#### **4.2.7. Análise qualitativa de Proteínas**

##### **4.2.7.1. Electroforese em Gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE) e em Gel Nativo:**

A electroforese em gel de SDS-PAGE é um método bioquímico por excelência, utilizado para análise de amostras proteicas, permitindo assim controlar o seu grau de pureza.

A poliactilamida é um polímero utilizado para dar consistência. Os géis de poliactilamida são definidos de acordo com a percentagem total de actilamida que possuem. As mobilidades das proteínas podem ser modificadas variando o poro do gel, que está directamente relacionado com a percentagem de actilamida e bis-actilamida.

A técnica de SDS-PAGE permite que as proteínas se separem de acordo com o seu peso molecular, independente da sua forma nativa e carga.

Para eliminar a interferência que a forma das proteínas possa ter na sua mobilidade, estas são diluídas num tampão contendo  $\beta$ -mercaptoetanol que promove a desnaturação das proteínas, destruindo as pontes dissulfureto. Adicionalmente as amostras são ainda fervidas e tratadas com dodecilssulfato de sódio (SDS), um detergente aniónico, que se vai ligar à proteína desnaturada e conferir-lhe uma carga geral negativa. Desta forma, a migração das proteínas em SDS-PAGE é independente da sua carga.

Em contraste com SDS-PAGE, o método de electroforese em gel nativo permite que as proteínas sejam separadas de acordo com a sua forma, carga e tamanho. Em gel nativo, as proteínas não sofrem qualquer tratamento desnaturante ou que lhes confira uma carga geral diferente daquela que possuem.

#### **4.2.7.2. Coloração:**

Para a detecção das bandas proteicas, após a corrida dos géis, foi utilizado o método de Coloração de Prata (Nitrato de Prata). Este tipo de coloração, apesar de ser mais moroso, oferece uma sensibilidade bastante melhor, permitindo detectar cerca de 0,1 ng de proteína.

#### **4.2.8. Obtenção de Imunoglobulinas**

Os anticorpos utilizados nos ensaios de imunoprotecção foram produzidos e purificados por colegas do laboratório de Imunologia Mário Arala-Chaves, através da metodologia que se segue.

##### **4.2.8.1. Imunizações:**

Para obtenção de anticorpos de ratinho anti-rGAPDH - imunizaram-se ratinhos BALB/c duas vezes, com um intervalo de três semanas. Cada dose, administrada por via intraperitoneal (i.p.), consistiu em 200  $\mu$ L de uma preparação contendo 25  $\mu$ g de rGAPDH numa suspensão de 1:1 de PBS/ALUM (Brenntag, Frederickssund, Dinamarca).

Para obtenção de anticorpos de coelho anti-rGAPDH - imunizaram-se coelhos New Zealand com rGAPDH pelo menos duas vezes, com um intervalo de três semanas. Cada dose, administrada por via cutânea, consistiu em 2 mL de uma preparação contendo 500 µg de rGAPDH.

#### **4.2.8.2. Purificação de anticorpos:**

Os soros dos animais imunizados com rGAPDH foram recolhidos e aplicados numa coluna de Proteína G, com afinidade para as IgG (HiTrap™ NHS-activated HP, Amersham Biosciences), conforme as instruções do fabricante. O eluato, contendo as IgG, foi aplicado numa coluna de Sepharose (HiTrap™ NHS-activated HP, Amersham Biosciences), à qual fora conjugada rGAPDH, para purificar as IgG anti-rGAPDH. A conjugação da rGAPDH à coluna e a purificação dos anticorpos foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

Os soros dos animais não imunizados (controlo) ou imunizados com NCS e rGAPDH desnaturada pelo calor, foram aplicadas apenas na coluna de Proteína G. Os eluatos foram dialisados contra PBS e guardados em alíquotas a -70°C para uso posterior.

A eficácia do processo de purificação foi verificada através da análise das fracções recolhidas pela técnica de ELISA.

#### **4.2.8.3. ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)**

A técnica de ELISA é baseada na visualização da reacção antigénio-anticorpo, através de uma reacção colorimétrica. O anticorpo é conjugado com uma enzima, formando um complexo proteico, em que a parte do anticorpo se liga ao antigénio e a parte da enzima possibilita a transformação de um substrato em cor mensurável por espectrometria<sup>105</sup>.

Dez dias após cada imunização foi recolhido soro dos ratinhos, para avaliar os níveis de imunoglobulinas séricas específicas para a GAPDH, usando a técnica de ELISA.

Placas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas com 5µg/mL de rGAPDH (50µL por poço), *overnight* a 4 °C. Depois de lavadas as placas, 3 vezes com TBST, os poços foram saturados com 2% de BSA em TBST, durante 1 hora à temperatura ambiente. Lavou-se as placas 5 vezes com TBST. Diluições seriadas das amostras em 1% de BSA em TBST foram plaqueadas e incubadas 2 horas á temperatura ambiente. Após a lavagem das placas 5 vezes com TBST, os anticorpos que se ligaram a proteína foram detectados pela adição de anticorpo anti-Ig de coelho ou ratinho marcado com fosfatase alcalina (*Goat anti-rabbit IgG-AP* e *Goat anti-mouse IgG-AP*, respectivamente) (Southern Biotechnology), em 1% de BSA em TBST numa diluição 1:1000, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período de incubação e lavagem das placas 5 vezes com TBST, a reacção enzimática foi desenvolvida pela adição do substrato p-nitrophenil phosphate (Sigma) e terminada pela adição de 0,1 M de EDTA pH 8. Os valores da absorvância foram medidos a um comprimento de onda de 450nm (Multiskan EX, Thermo).

#### **4.2.9. Ensaio *in vivo* com rGAPDH**

##### **4.2.9.1. Imunizações:**

###### Imunização activa

Fêmeas BALB/c (estirpe susceptível à infecção com SGB) foram imunizadas três vezes, com um intervalo de três semanas entre as imunizações. Cada dose, administrada por via i.p., consistiu em 200 µL de uma preparação contendo 25 µg de rGAPDH, numa suspensão 1:1 de PBS/ALUM (Brenntag).

Fêmeas controlo foram injectadas, pela mesma via, com 200 µL de uma suspensão de PBS/ALUM 1:1. As fêmeas foram colocadas em cruzamento logo após a última dose.

### Imunização passiva

As crias de BALB/c foram imunizadas passivamente, por via i.p., 12 horas antes da infecção com SGB, com 100 µL de uma preparação contendo 100 µg de IgG anti-rGAPDH produzida em coelho.

Crias controlo foram injectadas, pela mesma via, com 100 µL de uma preparação contendo 100 µg de IgGs purificadas de soro de coelho não imunizado numa suspensão 1:1 de PBS/ALUM.

#### **4.2.9.2. Infecção:**

Todas as crias de ratinho foram infectadas por via i.p. com 40 µL de uma suspensão bacteriana. Os inóculos variaram nas imunizações, da seguinte forma: na imunização activa foram injectadas  $1 \times 10^6$  células de *S. agalactiae* NEM2060, 48 horas após o nascimento; e no ensaio da imunização passiva foram injectadas  $5 \times 10^5$  células de *S. agalactiae* NEM2060, 48 horas após o nascimento.

### **4.3. Análise Estatística**

#### **Estudo de Prevalência:**

A análise dos dados foi efectuada com recurso ao *software* SPSS (do inglês *Statistical Pack for the Social Sciences*) Statistics 17.0 Release 17.0.0.

Na análise estatística dos dados, recorreu-se às seguintes ferramentas: Estatística descritiva - distribuição de frequências, média, mediana, moda, desvio padrão, variância;

Inferência estatística - significância, distribuição *t* de *Student*, normalização, valor *p*, teste de Lavene.

O nível de significância considerado foi de 5%.

## **Desenvolvimento Experimental de uma Vacina:**

A análise dos dados da segunda parte do estudo foi feita com utilização do *software GraphPad Prism 5*. O nível de significância para as curvas de sobrevivência foi determinado recorrendo a:

Análise de sobrevivência – método de Kaplan-Meier.

## **CAPÍTULO V.**

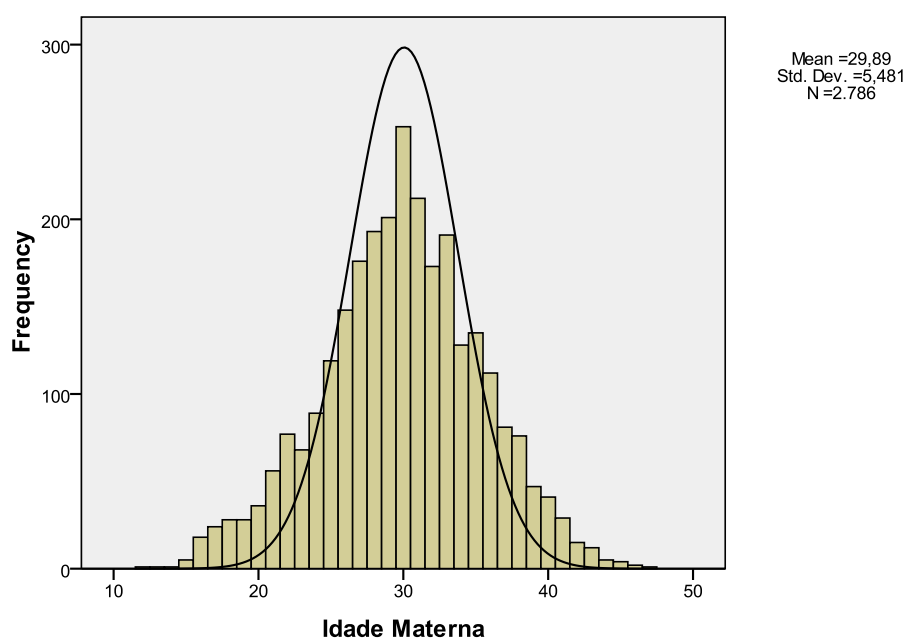
# 5. Resultados

## 5.1. Estudo de Prevalência

### 5.1.1. Caracterização da amostra:

A amostra do estudo inclui 2786 (N) mulheres grávidas assistidas no Serviço de Obstetrícia do HSA do Porto, entre Janeiro de 2005 e Dezembro de 2008. As grávidas tinham idades compreendidas entre os 12 e os 47 anos (M = 29,89; SD=4,48).

### Distribuição de Frequência da amostra por idade

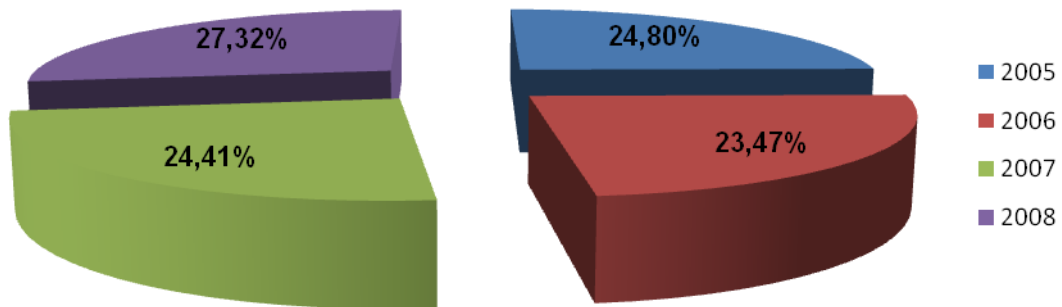


**Gráfico 1.** Histograma representando a distribuição de frequência de mulheres grávidas atendidas no HSA segundo a variação de idades (anos). Com uma amostra total (N) de 2786, média (M-do inglês *Mean*) de 29,89 e um desvio padrão (SD-do inglês *Standart Deviation*) de 5,481.

A distribuição por ano foi a seguinte: 691 (24,80%) em 2005, 654 (23,47%) em 2006, 680 (24,41%) em 2007 e 761 (27,32) grávidas em 2008.



## Percentagem de grávidas assistidas no HSA por cada ano de estudo



**Gráfico 2.** Valor dado em percentagem de grávidas assistidas ao longo dos quatro anos de estudo (2005 a 2008).

Como está evidenciado no gráfico 2, a distribuição de grávidas assistidas ao longo dos anos de estudo foi muito semelhante, não se evidenciando nenhum ano em que o número de grávidas fosse significativamente superior ou inferior a outro.

Relativamente à idade materna, a amostra em estudo foi recodificada em três grupos, com base nos seguintes intervalos etários:

- G1:  $\leq 19$  anos;
- G2: 20-34 anos;
- G3:  $\geq 35$  anos.

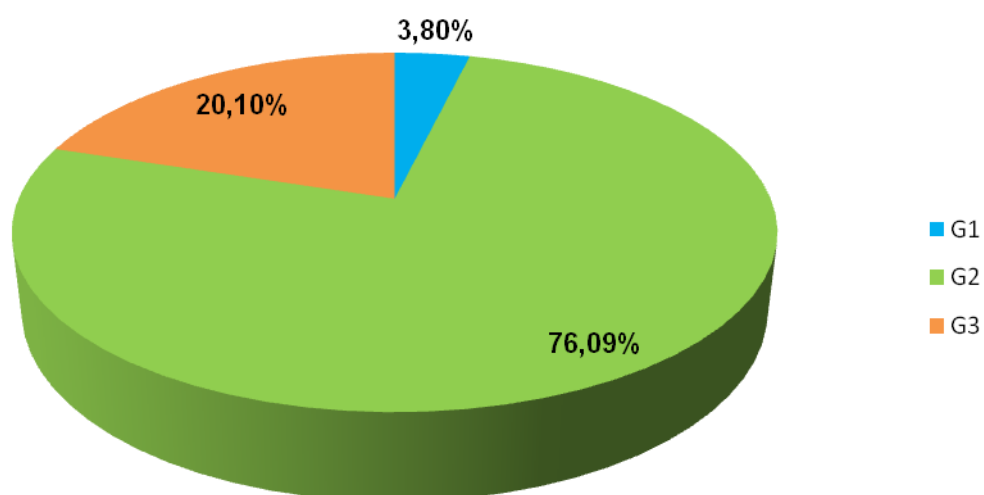
A divisão foi efectuada nestes intervalos etários tendo por base a idade fértil da mulher, por aconselhamento de um especialista em obstetrícia.

**Tabela 1.** Distribuição da amostra em estudo por grupos etários ( $\leq 19$ ; 20-34 e  $\geq 35$  anos) no respectivo ano de estudo (2005-2008).

		Anos de estudo							
		2005		2006		2007		2008	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Grupo etário (anos)	G1 $\leq 19$	25	3,62	21	3,21	28	4,12	32	4,20
	20 $\leq$ G2 $\leq$ 34	519	75,12	498	76,15	516	75,88	587	77,14
	G3 $\geq 35$	147	21,27	135	20,64	136	20,00	142	18,66

Como apresentado na tabela 1, fazendo uma avaliação por grupo etário verificou-se que do número total de grávidas ( $N=2786$ ), 106 pertencem ao grupo G1, 2120 pertencem ao grupo G2 e 560 ao grupo G3, como se mostra também no seguinte gráfico.

**Distribuição de grávidas por grupo etário**



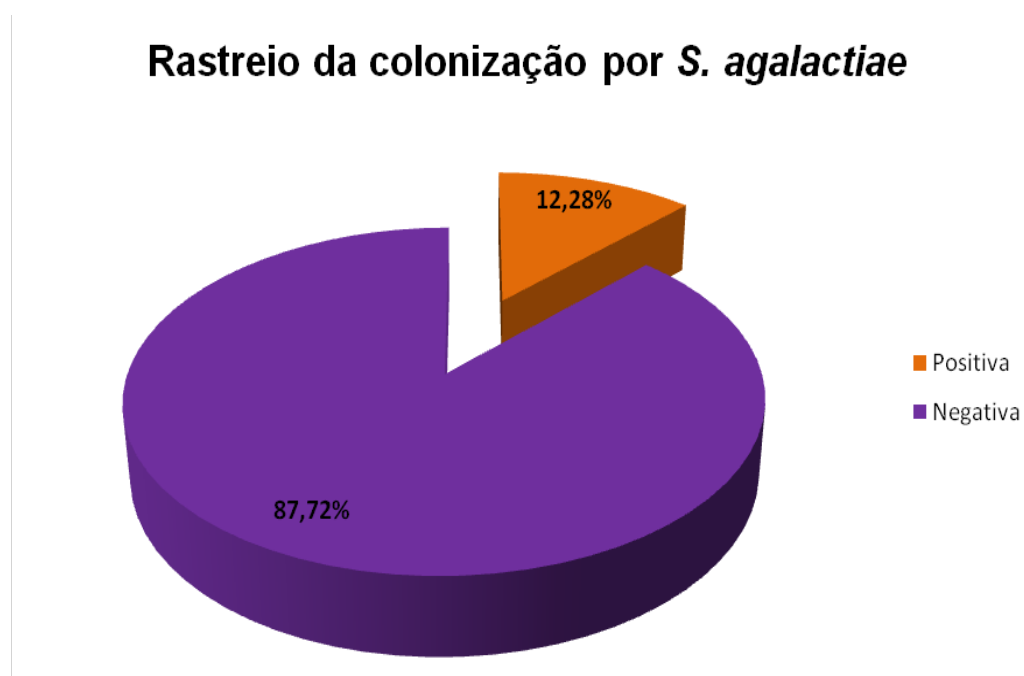
**Gráfico 3.** Distribuição da percentagem de grávidas por cada grupo etário:  $\leq 19$  anos (G1), 20-34 anos (G2) e  $\geq 35$  anos (G3).

Pela análise do gráfico 3, torna-se evidente que o maior número de grávidas, assistidas no HSA entre 2005 e 2008, se encontrava no grupo etário entre os 20 e os 34 anos (G2), com uma taxa de 76,09%, seguindo-se o grupo etário G3, correspondente a grávidas com idade igual ou superior a 35 anos, com uma taxa de 20,10% e por fim, o grupo etário menos representativo ao longo dos quatro anos de estudo foi o correspondente a grávidas com idade igual ou inferior a 19 anos (G1), apresentando uma taxa de 3,80%.

### 5.1.2. Prevalência da colonização por SGB:

Como referido anteriormente, o objectivo específico desta etapa do trabalho foi a elaboração de um estudo de prevalência de colonização por *S. agalactiae* em grávidas assistidas no Serviço de Obstetrícia do HSA, no período de 2005 a 2008.

Das 2786 grávidas em estudo, 2444 não estavam colonizadas por *S. agalactiae*, mas em 342 foi isolada a bactéria. A prevalência de colonização por SGB está representada no gráfico 4.



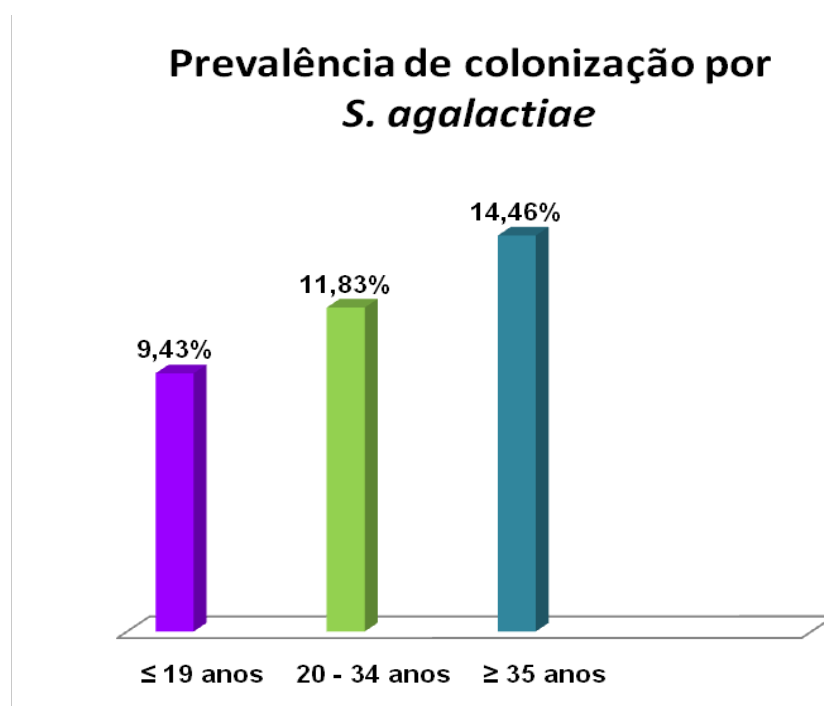
**Gráfico 4.** A taxa (%) de prevalência de colonização por *S. agalactiae* em mulheres grávidas, com idades compreendidas entre os 12 e os 47 anos, assistidas no HSA ao longo de quatro anos de estudo (2005 a 2008).

Como se verifica no gráfico 4, a taxa de prevalência da colonização por *S. agalactiae* em grávidas assistidas no Serviço de Obstetrícia do HSA, entre os anos de 2005 e 2008, foi de 12,28%.

**Tabela 2.** Prevalência de colonização por *S. agalactiae* segundo o grupo etário materno.

Grupo etário (anos)	N	SGB (+) n	Prevalência %
G1 ≤ 19	106	10	9,43
20 ≤ G2 ≤ 34	2120	251	11,83
G3 ≥ 35	560	81	14,46
<b>Total</b>	<b>2786</b>	<b>342</b>	<b>12,28</b>

Na tabela 2, apresentam-se os resultados relativos ao número de grávidas onde foi isolado o *S. agalactiae*, e respectiva taxa de prevalência, segundo a idade materna. A taxa de prevalência de colonização por SGB em função da variável idade materna, está também representado no gráfico 5.



**Gráfico 5.** Prevalência de colonização por *S. agalactiae* segundo o grupo etário materno.

Pela análise dos valores apresentados na tabela 2 e no gráfico 5, pode-se verificar que uma avaliação feita segundo a idade materna não mostra grandes variações entre os três grupos em estudo. No entanto, o grupo etário onde se verificou uma maior prevalência de colonização por *S. agalactiae* foi o G3, respectivo a grávidas com 35 anos ou mais de idade, com uma taxa de colonização de 14,46%. De seguida, o grupo etário com maior prevalência foi o G2 (20 a 34 anos), com 11,83%. E com a menor taxa de colonização (9,43%) ficou o grupo etário G1, relativo às mães mais jovens ( $\leq 19$  anos).

**Tabela 3.** Prevalência de colonização por *Streptococcus agalactiae* ao longo dos quatro anos de estudo (2005 a 2008).

<b>Ano de estudo</b>	<b>N</b>	<b>SGB (+)</b>	<b>Prevalência</b>
		<b>n</b>	<b>%</b>
<b>2005</b>	691	91	13,17
<b>2006</b>	654	65	9,94
<b>2007</b>	680	114	16,76
<b>2008</b>	761	72	9,46
<b>Total</b>	<b>2786</b>	<b>342</b>	<b>12,28</b>

A tabela 3 representa o número de mulheres grávidas que se encontravam colonizadas por *S. agalactiae*, assistidas no HSA entre os anos de 2005 a 2008.

A taxa de prevalência de mulheres grávidas colonizadas por SGB, entre 2005 e 2008, está também representada no gráfico 6.

### Prevalência de *S. agalactiae* em grávidas assistidas no HSA entre 2005 e 2008

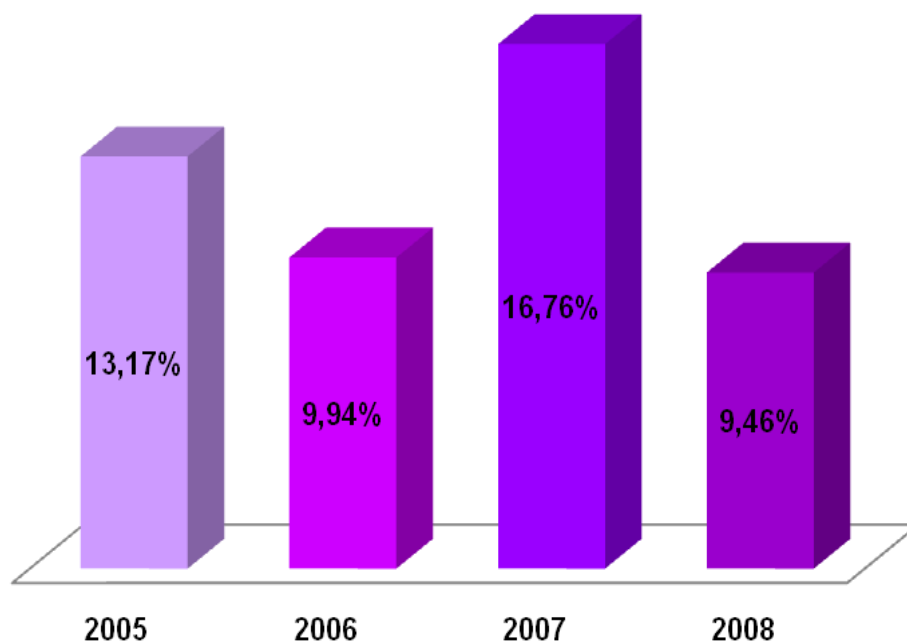


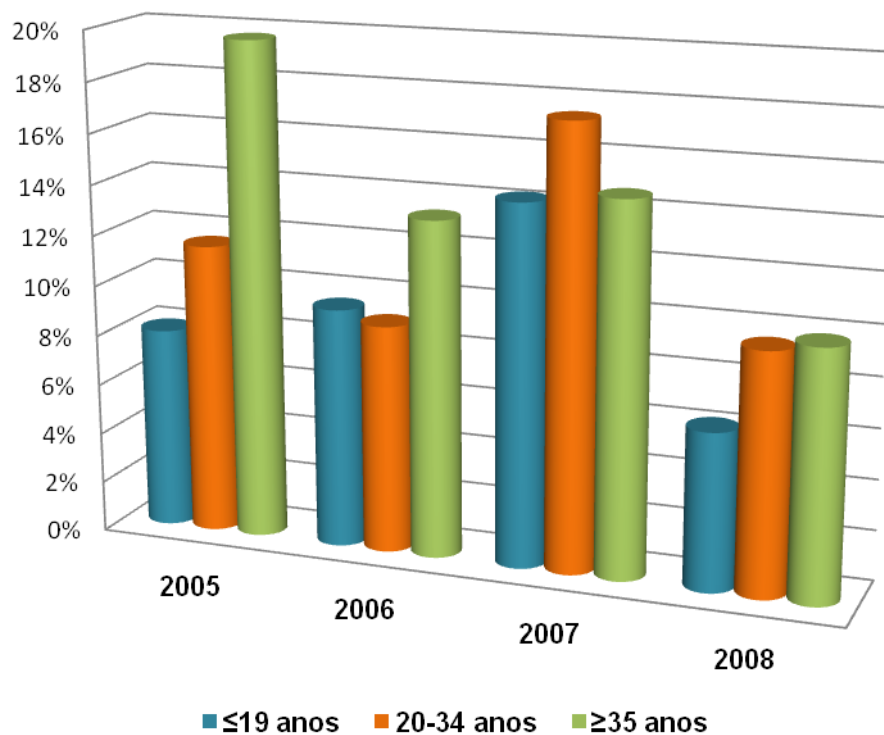
Gráfico 6. Prevalência de colonização por *S. agalactiae* em grávidas assistidas no HSA no período de 2005 a 2008.

Analisando os resultados apresentados na tabela 3 e no gráfico 6, relativos à taxa de prevalência de SGB em mulheres grávidas assistidas no HSA entre o período de 2005 a 2008, verifica-se que o ano onde houve uma maior taxa de colonização por *S. agalactiae* foi 2007 (16,76%), seguindo-se 2005 (13,17%), e com as menores taxas de prevalência de colonização por SGB estão os anos 2006 (9,94%) e 2008 (9,46%).

**Tabela 4.** Prevalência de colonização por *S. agalactiae* em grávidas assistidas no HSA, tendo em conta o seu grupo etário ( $\leq 19$ , 20-34 e  $\geq 35$  anos) e o ano de estudo (2005, 2006, 2007 e 2008).

		Anos de estudo			
		2005	2006	2007	2008
		Prevalência (%)	Prevalência (%)	Prevalência (%)	Prevalência (%)
Grupo etário (anos)	G1 $\leq 19$	8	9,52	14,28	6,25
	20 $\leq$ G2 $\leq$ 34	11,56	9,04	17,44	9,54
	G2 $\geq$ 35	19,7	13,33	14,70	9,86

**Prevalência de colonização por *S. agalactiae***



**Gráfico 7.** Prevalência de *S. agalactiae* em grávidas assistidas no HSA em função do grupo etário materno (G1  $\leq 19$ , 20 $\leq$ G2 $\leq$ 34 e G3 $\geq$ 35 anos) e dos anos de estudo (2005 a 2008).

Na tabela 4 e no gráfico 7 estão representados os resultados do cruzamento de dados da prevalência de colonização por *S. agalactiae*, em mulheres grávidas assistidas no HSA, segundo o seu grupo etário e o ano de estudo. Pela análise dos mesmos, pode-se verificar que:

- no primeiro ano de estudo (2005), o grupo etário onde se verificou uma maior taxa de colonização por SGB foi o grupo de grávidas com idade  $\geq 35$  anos (19,70%), seguindo-se o grupo etário materno com idades compreendidas entre 20 e 34 anos (11,56%) e por último com uma menor taxa de colonização surge o grupo de grávidas com idades  $\leq 19$  anos (8%);
- no ano 2006, o grupo etário que apresentou uma maior prevalência de colonização por SGB foi novamente o grupo com idade  $\geq 35$  anos (13,33%), seguindo-se o grupo com idade  $\leq 19$  anos (9,52%) e com a menor taxa de colonização neste ano vem o grupo com idades compreendidas entre os 20 e os 34 anos (9,04%);
- o ano 2007, como já se tinha verificado anteriormente, foi o ano de estudo em que as taxas de colonização por *S. agalactiae* foram mais elevadas (16,76%). Quando comparando com os diferentes grupos etários maternos, verifica-se que as grávidas pertencentes ao grupo com idades entre os 20 e os 34 anos foram as tiveram uma maior prevalência de SGB neste ano (17,44%), seguindo-se o grupo com idade  $\geq 35$  anos (14,70%) e por último o grupo com idade igual ou inferior a 19 anos (14,28%);
- em 2008, foi o ano de estudo com uma menor taxa de colonização (9,46%). Em termos de idade materna, o grupo que teve maior taxa de colonização foi o respectivo a grávidas com idade  $\geq 35$  anos (9,86%), de seguida o grupo com idades entre os 20 e os 34 anos (9,54%) e com menor prevalência teve o grupo com idades  $\leq 19$  anos (6,25%).

Em conclusão, embora existam diferenças de colonização por SGB através dos diferentes grupos etários maternos ao longo dos anos de estudo, estas diferenças não se revelaram estatisticamente significativas.



## 5.2. Desenvolvimento Experimental de uma Vacina

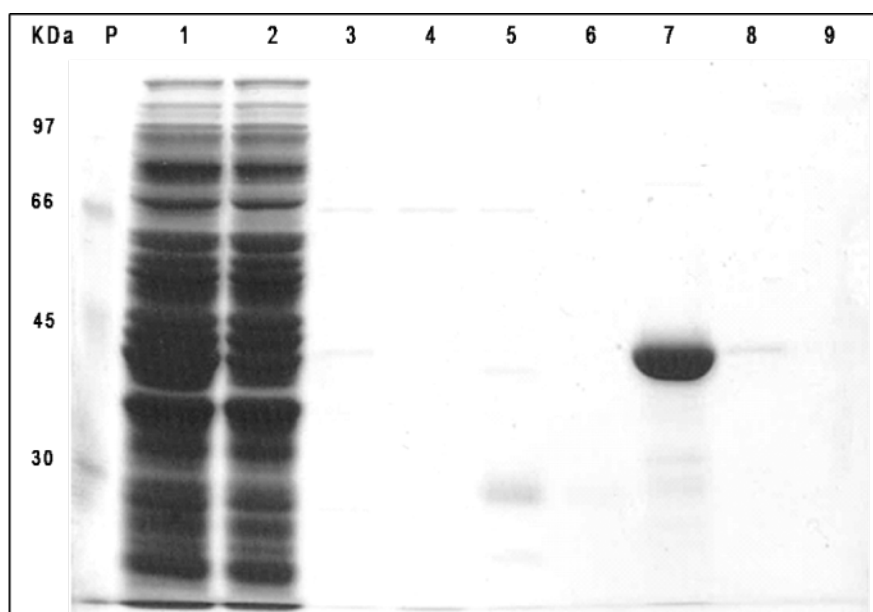
### ENSAIOS DE VACINAÇÃO CONTRA O *S. agalactiae*

O estudo experimental realizado nesta etapa do trabalho teve como objectivo a realização de ensaios de imunoprotecção contra a infecção por *S. agalactiae*, usando como antigénio alvo a Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase recombinante (rGAPDH).

Fomos investigar o papel protector da imunização de fêmeas BALB/c com a rGAPDH na infecção dos respectivos recém-nascidos com uma estirpe de SGB de elevada virulência (NEM2060).

#### Purificação da proteína recombinante – rGAPDH:

Como primeiro passo, procedeu-se à purificação da rGAPDH. A figura 3 representa o gel SDS-PAGE com as diferentes fracções do processo de purificação da proteína recombinante.



**Figura 3. Purificação de rGAPDH expressa em *E. coli*.** SDS-PAGE das diferentes fracções da purificação de rGAPDH expressa em *E. coli*: (P) padrões de peso molecular, (1-2) extracto inicial antes e depois de passar pela Coluna de Níquel e (3-9) eluições com quantidades crescentes de imidazole. A coloração do gel foi feita pelo método de prata.

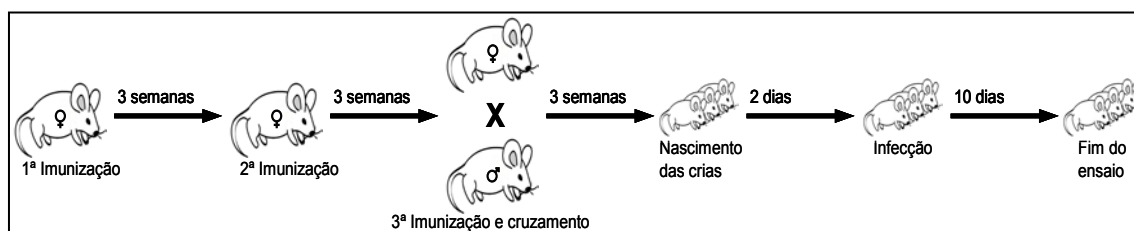
Com a análise do gel apresentado, pode-se observar que a proteína recombinante (linha 7) tem um peso molecular de aproximadamente 45KDa. Verifica-se também a pureza da proteína, podendo, assim, ser usada nos ensaios de imunoprotecção.

Como foi referido na introdução, o nosso grupo de investigação já tinha efectuado ensaios de imunoprotecção contra a estirpe NEM316, em ratinhos BALB/c (ratinhos susceptíveis à infecção por *S. agalactiae*) adultos. Nesses ensaios de imunoprotecção verificou-se que quando se imunizavam, por via i.p., ratinhos BALB/c com a rGAPDH, estes apresentavam elevados níveis séricos de anticorpos IgG anti-rGAPDH e quando infectados com *S. agalactiae* NEM316 estavam protegidos, contrariamente aos ratinhos controlo, que apresentavam colonização bacteriana no fígado. Foi também demonstrado que essa protecção podia ser transferida para as crias, imunizando activamente as mães com rGAPDH ou imunizando passivamente as crias com anticorpos IgG anti-rGAPDH.

#### **Crias de fêmeas BALB/c imunizadas com rGAPDH estão protegidas contra a infecção sistémica causada pela estirpe de SGB NEM2060:**

Nesta etapa do trabalho fomos investigar se a imunização de fêmeas com rGAPDH conferia protecção às crias contra a infecção por uma estirpe de *S. agalactiae* de elevada virulência (NEM2060)

Num primeiro ensaio de imunoprotecção, procedeu-se a um esquema de imunização materna e infecção de crias, como está representado na figura 4.



**Figura 4. Esquema de imunização activa materna e infecção de crias.** Imunização das mães com um intervalo de 3 semanas entre cada dose e infecção das crias ao segundo dia de vida.

**Tabela 5.** Título de anticorpos IgG1 específicos para a GAPDH no soro dos ratinhos imunizados e controlo

Título dos Anticorpos das fêmeas	
Controlo	112,9
Imunizadas	31568

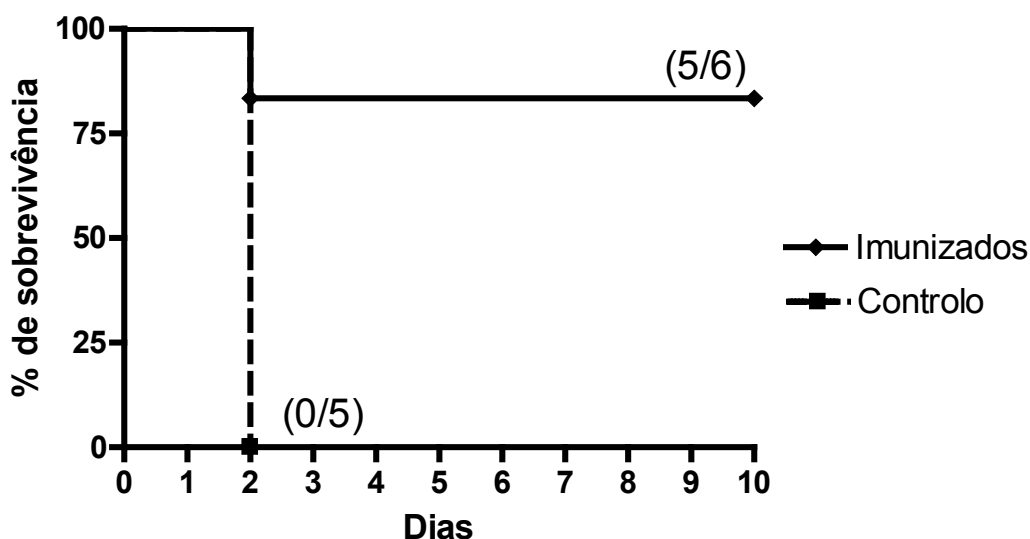
Foi realizada a técnica de ELISA para se proceder ao doseamento dos anticorpos anti-rGAPDH no soro de fêmeas imunizadas.

Como podemos verificar na tabela 5, a protecção foi acompanhada por um aumento do título de anticorpos IgG1 específicos para a rGAPDH no soro dos animais imunizados.

Nos 10 dias que se seguiram à infecção avaliou-se a percentagem de recém-nascidos que sobreviveram à infecção por SGB.

Os resultados obtidos estão representados na figura 5 e mostrou que as crias nascidas de mães imunizadas i.p. com rGAPDH estão protegidas contra a infecção sistémica pela estirpe NEM2060 de *S. agalactiae*. De facto, de 6 recém-nascidos apenas 1 morreu. Ao contrário, nenhuma das crias provenientes de mães controlo (não imunizadas) sobreviveu.

Esta experiência foi repetida três vezes tendo-se sempre obtido o mesmo resultado, a transferência de imunidade de mães vacinadas para a sua descendência.

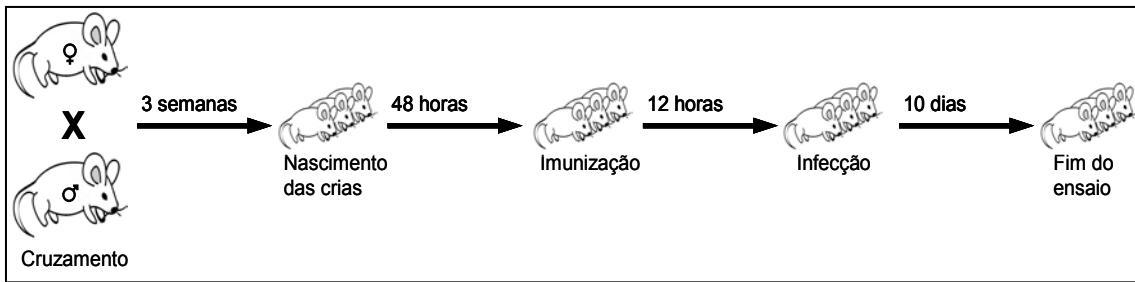


**Figura 5. Ensaio de sobrevivência.** Taxa de sobrevivência de crias cujas mães foram imunizadas i.p. com 25 µg de rGAPDH ou PBS (controlo) e infectadas i.p. com  $1 \times 10^6$  células de *S. agalactiae* (NEM2060), 48 horas após o nascimento ( $p < 0,01$  pelo método de Kaplan-Meier). Entre parênteses está representado o número de crias sobreviventes por número total de crias nascidas em cada grupo. Experiência repetida 3 vezes.

### A transferência passiva de anticorpos IgG anti-rGAPDH confere protecção às crias contra a infecção sistémica por SGB NEM2060:

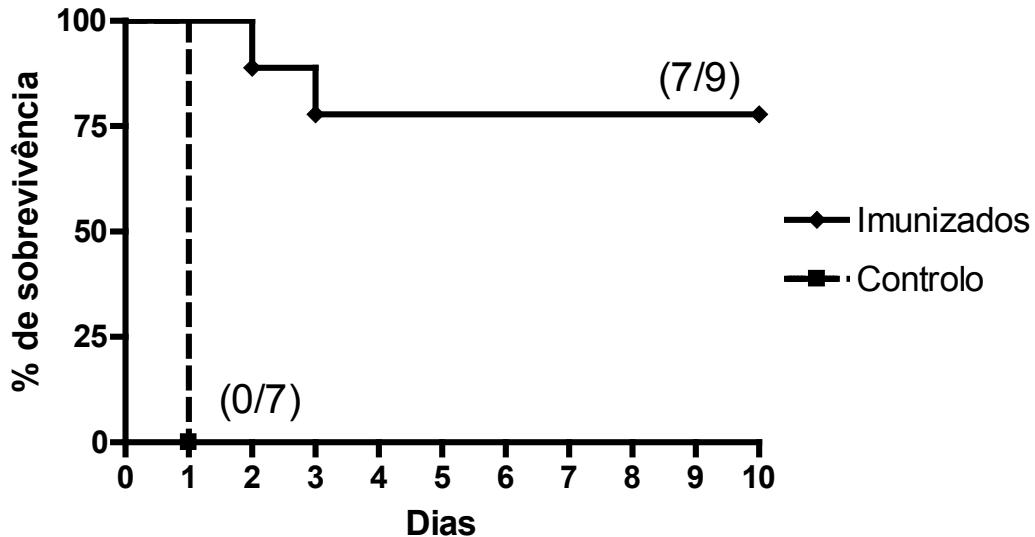
Para se investigar qual o papel dos anticorpos anti-GAPDH na protecção das crias contra a infecção por *S. agalactiae* NEM2060, procedeu-se a uma imunização passiva.

Neste segundo ensaio de imunoprotecção, esquematizado na figura 6, a percentagem de sobrevivência foi avaliada nos 10 dias que se seguiram à infecção.



**Figura 6. Esquema de imunização passiva.** As crias foram imunizadas passivamente ao segundo dia e infectadas 12 horas após a imunização.

Como se pode ver na figura 7, a transferência passiva de anticorpos IgG anti-rGAPDH resultou na protecção das crias contra a infecção sistémica por *S. agalactiae* NEM2060. Assim, de 9 crias imunizadas apenas 2 morreram. Contrariamente, no grupo controlo de 7 crias, nenhuma cria sobreviveu.



**Figura 7. Ensaio de sobrevivência.** Taxa de sobrevivência de crias imunizadas passivamente, 48 horas após o nascimento, através da injeção i.p. com 100 µg de IgG anti-rGAPDH ou PBS (controlo) e infectadas com  $5 \times 10^5$  células de *S. agalactiae* (NEM 2060) 12 horas após imunização ( $p=0,0001$ ). Em parênteses está representado o número de crias sobreviventes por número total de crias nascidas em cada grupo. Esta experiência foi repetida por mais 2 vezes.

Estes resultados demonstram que a imunização passiva confere protecção contra a infecção pela estirpe NEM2060 (“altamente virulenta”) de *S. agalactiae*, sugerindo que a protecção observada pelas crias nascidas de mães imunizadas se deve aos anticorpos anti-rGAPDH transferidos da mãe para o feto através da placenta.

Estes ensaios de imunoprotecção demonstram que a imunização com a rGAPDH tem a capacidade de conferir protecção contra a infecção por uma estirpe de *S. agalactiae* de elevada virulência.

## **CAPÍTULO VI.**

# **6. Discussão dos Resultados**

## **6.1. Estudo de Prevalência**

Durante a gravidez, a colonização da mulher é geralmente assintomática, no entanto a bactéria pode causar problemas como infecção do tracto urinário, corioamnionite, endometrite e septicemia<sup>7,31</sup>. A colonização da mulher grávida aumenta a probabilidade de complicações graves como aborto, trabalho de parto prolongado, parto prematuro, ruptura prematura das membranas e transmissão perinatal do microrganismo<sup>20,32,33</sup>.

Desde os anos 70 que o *S. agalactiae* é considerado a principal causa de infecções e mortalidade em recém-nascidos<sup>24</sup>. A contaminação do recém-nascido ocorre principalmente de modo vertical e, portanto, caracteriza-se por transmissão *in utero* ou *intrapartum*<sup>25</sup>.

Estima-se que as taxas de colonização materna por SGB em diferentes países industrializados são de valores entre os 10 e os 30%. No entanto, diversas variáveis podem influenciar estes valores, como variáveis demográficas (idade materna, raça, região geográfica, escolaridade, número de parceiros) e clínicas (número de partos, historial de infecções bacterianas, forma como a colheita da amostra para rastreio é feita, meios de cultura utilizados, metodologias adoptadas)<sup>89,90,91</sup>.

Por estar já tão bem estudada e documentada a relação entre a presença de *S. agalactiae* na flora vaginal da grávida e a possibilidade de colonização do recém-nascido, é necessário como primeiro passo para o estudo e compreensão do problema, determinar a prevalência de grávidas colonizadas por esta bactéria no nosso país, conforme se descreveu nos objectivos deste trabalho.

A amostra em estudo foi constituída por 2786 grávidas, assistidas no Serviço de Obstetrícia do HSA, no período entre 1 de Janeiro de 2005 e 31 de Dezembro de 2008. Todas as mulheres grávidas que foram incluídas na amostra do estudo fizeram o rastreio para a colonização por *S. agalactiae*



entre a 35.<sup>a</sup> e a 37.<sup>a</sup> semana de gestação, no Serviço de Obstetrícia do HSA, como está recomendado no protocolo de prevenção do CDC.

O número de grávidas consideradas na amostra por ano de estudo foi muito semelhante (691, 654, 680 e 761, em 2005, 2006, 2007 e 2008, respectivamente).

A prevalência de colonização (recto-vaginal) materna por *S. agalactiae* detectada no estudo foi de 12, 28% (342 grávidas) (IC 95%). Esta taxa de colonização materna encontra-se em concordância com as taxas apresentadas noutros estudos<sup>89,90,91</sup>.

No que respeita à comparação da prevalência de colonização por SGB na idade materna, foi efectuado um teste de diferenças de médias, que não demonstrou diferenças estatisticamente significativas ( $Z = -1.679$ ,  $p = 0.93$ ). O grupo de grávidas com colonização positiva para SGB, apresentam uma idade média de 29,82 (SD=5,46), e as grávidas não colonizadas, uma idade média de 30,45 (SD=5,58).

Durante o período de tempo considerado para o presente estudo (de 2005 a 2008) foi evidente que a maioria das grávidas assistidas no Serviço de Obstetrícia do HSA tinha idades compreendidas entre os 20 e os 34 anos (76,09%), seguindo-se o grupo etário materno com idade igual ou superior a 35 anos (20,10%) e por último, o grupo menos representativo na nossa amostra foi o das grávidas com idade até 19 anos (3,80%). O grupo etário de mães mais jovens não pode ser considerado como uma amostragem significativa, o que pode justificar alguns dos resultados apresentados.

Existem estudos publicados referindo que idade materna inferior a 20 anos é um factor epidemiológico favorável à colonização por *S.agalactiae*<sup>55</sup>. O nosso estudo não comprovou esses dados, mas como já referido anteriormente, a nossa amostra relativa a mães com idades até aos 19 anos é muito pequena, não sendo por isso possível tirar conclusões.

Ao longo dos quatro anos de estudo verificou-se que a faixa etária com maior prevalência de colonização por SGB foi a de grávidas com 35 ou mais anos de idade, com uma taxa de 14,46%.

A análise feita da taxa de colonização em cada ano de estudo revelou que os anos de estudo em que se verificou maior prevalência de colonização foram 2005 (13,17%) e 2008 (16,76%). Para avaliar a dependência entre as variáveis “resultado da pesquisa de *S. agalactiae* (grávida colonizada/não

colonizada) ” e “ano de maternidade”, foi efectuado um teste do Qui-quadrado da independência, tendo-se concluído, com um  $p=0,000$ , que existe uma relação de dependência entre as variáveis (com coeficiente de contingência 0,89).

## 6.2. Desenvolvimento Experimental de uma Vacina

Esta parte do trabalho teve como objectivo principal a avaliação da rGAPDH como potencial antigénio a ser utilizado no desenvolvimento de uma vacina contra as infecções por *S. agalactiae*, usando a estirpe NEM2060, pertencente à linhagem de elevada virulência ST-17<sup>108</sup> e responsável pela maioria das infecções neonatais invasivas.

Um protocolo de vacinação tem de satisfazer vários requisitos, protegendo a pessoa vacina contra a doença em causa e, ao mesmo tempo, causando poucos ou, preferencialmente, nenhuns efeitos colaterais indesejáveis. Para que uma vacina possa ser uma candidata para a imunização contra as infecções por *S. agalactiae*, esta deve ser universal, isto é, revelar-se eficaz contra todos os serotipos e também contra estirpes não serotipáveis, e ser segura, não causando qualquer tipo de efeito colateral<sup>41</sup>.

Uma das principais dificuldades encontrados no desenvolvimento de uma vacina global efectiva contra as infecções por *S. agalactiae* é a existência de muitos serotipos com distribuições geográficas diferentes e reactividade cruzada heterogénea entre os diferentes serotipos - assim, uma vacina adequada para populações europeias ou asiáticas pode não ser adequada para populações africanas. Assim, um dos maiores obstáculos que se encontra é que a maioria dos antigénios, nos quais as vacinas contra SGB se baseiam, são específicos para um grupo restrito de estirpes, não oferecendo protecção efectiva contra todas as estirpes obtidas de isolados clínicos<sup>106,107</sup>.

Como já foi referido anteriormente, o nosso grupo e investigação tem vindo a desenvolver estudos para verificar o papel protector da GAPDH de *S. agalactiae* em ensaios de vacinação contra as infecções causadas por esta

bactéria. A GAPDH foi inicialmente isolada do sobrenadante de culturas da estirpe de SGB NEM316<sup>82</sup>.

Foi também verificado no nosso laboratório que, apesar de em quantidades diferentes, os isolados clínicos analisados (pertencentes a serotipos e linhagens MLST, do inglês *Multilocus Sequence Type*, diferentes) excretavam todos GAPDH. Mesmo com um número limitado de isolados clínicos analisados, estes resultados foram encorajadores e suportaram a possibilidade do uso desta proteína como antigénio alvo na imunização universal contra as infecções causadas pelo SGB.

O nosso grupo de investigação, seguindo uma linha de pesquisa semelhante ao que já tinha sido feito para outros agentes patogénicos<sup>80,81</sup> e, após se ter identificado a GAPDH (Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase) como uma proteína imunomodulatória associada com a virulência (VIP) do *S. agalactiae*<sup>82</sup>, demonstrou que a imunização com GAPDH recombinante (rGAPDH) levava a um aumento de anticorpos específicos contra a proteína e consequente protecção contra a infecção pela estirpe NEM316 de SGB em ratinhos BALB/c adultos. Foi ainda observado que a imunização das mães conferia protecção às crias recém-nascidas e que essa protecção se devia aos anticorpos anti-rGAPDH (dados ainda não publicados).

Surgiu assim a questão se era possível conferir protecção contra os restantes isolados clínicos, através da imunização com rGAPDH. Para responder a esta questão, vem o objectivo desta segunda parte do presente trabalho, em que fomos avaliar a protecção conferida pela vacinação de fêmeas às crias, usando uma estirpe de SGB altamente virulenta, a NEM2060. Esta opção foi baseada no facto desta estirpe pertencer à linhagem ST-17, descrita como altamente virulenta e responsável pela maioria das infecções neonatais invasivas<sup>108</sup>.

Os resultados obtidos mostraram que as crias nascidas de mães imunizadas com rGAPDH estão protegidas contra a infecção sistémica pela estirpe NEM2060 de *S. agalactiae*, com uma taxa de sobrevivência de 83%.

A transferência passiva dos anticorpos IgG anti-rGAPDH resultou na protecção das crias contra a infecção sistémica por *S. agalactiae*, com uma taxa de sobrevivência à infecção de 78%. Mostrando-se assim, que a imunização passiva confere protecção contra a infecção pela estirpe NEM2060

de *S. agalactiae*, sugerindo que a protecção observada pelas crias nascidas de mães imunizadas se deve aos anticorpos anti-rGAPDH transferidos pela mãe através da placenta.

Estes ensaios de imunoprotecção mostram que a imunização com rGAPDH é capaz de transferir protecção contra a infecção por uma estirpe de *S. agalactiae* de elevada virulência.

Em estudos realizados previamente no nosso laboratório, já se tinha mostrado que a imunização com fragmentos F(ab)<sub>2</sub> anti-rGAPDH é suficiente para conferir protecção às crias infectadas com *S. agalactiae* NEM316, o que significa que é a imunoneutralização da GAPDH excretada (anulando o seu efeito imunobiológico) pela bactéria que confere protecção contra a infecção pelo *S. agalactiae*, e não a opsonização da bactéria.

A experiência tem mostrado que nem todas as vacinas experimentais candidatas que obtiveram sucesso nos estudos laboratoriais, ou em animais, são adequadas para administração em seres humanos. Algumas potenciais vacinas causam efeitos colaterais inaceitáveis, e outras podem até mesmo piorar a doença que tem intuito de prevenir. Desta forma, deve-se realizar, ainda nas fases iniciais de desenvolvimento de uma vacina experimental, um estudo de segurança do protocolo de vacinação em causa, focando não só os efeitos da vacina, mas também os efeitos dos anticorpos induzidos por esta.

A GAPDH é uma proteína expressa constitutivamente em quase todos os seres vivos, e está descrita como estando presente na superfície dos macrófagos<sup>110</sup> e células epiteliais orais<sup>111</sup> dos seres humanos. Desta forma, era importante verificar se a imunização com rGAPDH produzia anticorpos capazes de reconhecer GAPDH de outras origens, principalmente a humana. Estudos de reacção cruzada foram previamente realizados no nosso laboratório, mostrando que os anticorpos contra a GAPDH do *S. agalactiae*, produzidos em coelho e em ratinho imunizados com rGAPDH, não reconheciam a GAPDH humana, nem de coelho e nem de ratinho, reconhecendo apenas a GAPDH de SGB. O que mostrou existirem diferenças antigénicas suficientes entre as GAPDH de origem bacteriana e as enzimas de mamíferos, para não ocorrer reacção cruzada.

Ao se utilizar GAPDH na forma nativa restringe-se a apresentação aos epítomos da superfície da proteína. O uso da forma desnaturada expõe todos

os epítomos da rGAPDH, mesmo os que na forma nativa não estão acessíveis. Assim sendo, o nosso grupo mostrou ainda, em ensaios com a rGAPDH desnaturada (pela acção do calor), que os anticorpos contra a rGAPDH desnaturada são também específicos apenas para a GAPDH do *S. agalactiae*, não reconhecendo a GAPDH humana, a de coelho e a de ratinho. Estes resultados indicaram que a imunização com rGAPDH poderá ser uma estratégia de vacinação segura para ser implementada em seres humanos.

Os trabalhos que têm vindo a ser desenvolvidos no nosso laboratório têm sido um forte suporte na investigação de uma vacina eficaz contra as infecções causadas pelo *S. agalactiae*. Enquanto outros protocolos de vacinação contra o SGB são dirigidos contra epítomos estruturais, esta nova estratégia visa a neutralização do efeito imunomodulador associado à GAPDH excretada pela bactéria. O SGB tem vários mecanismos que impedem a opsonização ou interferem com os mecanismos efectores recrutados pelos anticorpos. Está descrito que o *S. agalactiae* consegue sobreviver e persistir no interior dos macrófagos<sup>109</sup>, sendo este um dos mecanismos que permite à bactéria evadir-se dos outros processos efectores do sistema imunitário. Assim, uma vacinação contra epítomos estruturais poderá não só não ser eficaz na neutralização da infecção, como poderá ainda ajudar a bactéria a escapar ao sistema imunitário, permitindo que esta se instale no organismo do hospedeiro.

No protocolo de vacinação aqui desenvolvido, o alvo é desviado da bactéria para o seu factor de virulência (GAPDH, proteína imunomoduladora). A imunossupressão induzida pela produção precoce de IL-10 (Interleucina-10) parece ser essencial à patologia causada pelo *S. agalactiae*, já que ratinhos IL-10 “knock-out” conseguem controlar a infecção pela bactéria<sup>82</sup>.

Assim, pode-se concluir que a imunoneutralização do efeito imunossupressor da GAPDH é fundamental para o controlo da infecção por SGB.

## **CAPÍTULO VII.**

## 7. Conclusões

---

A realização deste trabalho levou às seguintes conclusões originais:

Os resultados obtidos com a concretização dos objectivos propostos para este trabalho enaltecem a importância médico-legal da colonização e infecções causadas pelo *S. agalactiae*.

No estudo realizado encontramos uma taxa de prevalência de colonização (recto-vaginal) materna por *S. agalactiae* de 12, 28%. Esta taxa de colonização materna encontra-se em concordância com as taxas apresentadas noutros estudos<sup>62,89,90,91</sup>.

Em Portugal existem poucos estudos publicados acerca da prevalência da doença por *S. agalactiae*, em crianças<sup>62</sup>. A mortalidade de 6,6% encontrada no estudo realizado por M.T. Neto<sup>62</sup>, no nosso país, é semelhante à descrita por outros estudos realizados noutros países da Europa: 9,7% no Reino Unido<sup>93</sup> e 4,3% na Alemanha<sup>97</sup>. A taxa de mulheres grávidas com cultura positiva para SGB varia entre 35% no Norte e 13% no Sul do país<sup>62</sup>.

Foi com base no facto de não existir ainda uma base de dados, com os valores de prevalência da infecção em grávidas e recém-nascidos em Portugal, e por existirem poucos estudos realizados reportando esta problemática, que os objectivos deste trabalho foram delineados.

Os resultados obtidos no Laboratório de Imunologia Mário Arala-Chaves revelam-se muito encorajadores. O protocolo de vacinação estabelecido parece superar um dos principais obstáculos encontrados por outros grupos de investigação, que é o facto dos antigénios usados serem específicos para um grupo limitado de estirpes. A imunização com rGAPDH ao ser dirigida a uma proteína, que é um importante factor de virulência da bactéria ao induzir a imunossupressão do hospedeiro, neutraliza os efeitos imunológicos da proteína permitindo o desenvolvimento, por parte do hospedeiro, de uma

resposta imunitária eficaz contra o *S. agalactiae*. Por outro lado, o facto de o antigénio poder ser produzido como uma proteína recombinante solúvel em *E. coli* é um aspecto muito positivo desta metodologia e é uma propriedade que é considerada vantajosa para a produção comercial da vacina<sup>112,113</sup>.

Desta forma, este trabalho contribuiu para mais um esclarecimento e avanço no caminho da resolução deste problema de Saúde Pública, causador de taxas de morbilidade e mortalidade elevadas, tanto em recém-nascidos e grávidas, como em adultos, homens e mulheres, que não se encontram grávidas.



## **CAPÍTULO VIII.**

## 8. Bibliografia

---

1. **Berner, R.** (2004). Significance, management and prevention of *Streptococcus agalactiae* infection during the perinatal period. *Expert Review of Anti-Infect Therapy*; **2**: 427-437.
2. **Van der Poll, T. and Opal, S.M.** (2008). Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*; **8**:32-43.
3. **Campbell, J.R., Hillier, S.H., Krohn, M.A., Ferrieri, P., Zaleznik, D.F. and Baker, C.J.** (2000). Group B Streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. *Obstet Gynecol*; **96**:498-503.
4. **Schuchat, A.** (1998). Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clinical Microbiology Review*; **11**:497-513.
5. **Hansen, S.M., Uldbjerg, N., Kilian, M. and Sorensen, B.S.** (2004). Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *Journal Clin Microbiol*; **42**:83-89.
6. **Bliss, S.J., Manning, S.D., Tallman, P., Baker, C.J., Pearlman, M.D., Marrs, C.F. et al.** (2002). Group B *Streptococcus* colonization in male and nonpregnant female university students. *Clinical Infections Diseases*; **34**:184-190.
7. **Gibbs, R.S., Schrag, S. and Schuchat, A.** (2004). Perinatal infections due to group B streptococci. *Obstet Gynecol*; **104**: 1062-1076.
8. **Law, M.R., Palomaki, G., Alfirevic, Z., Gilbert, R., Health, P., McCartney et al.** (2005). The prevention of neonatal group B streptococcal disease: a report by a working group of the Medical Screening Society. *J Med Screen*; **12**:60-68.
9. **Puopolo, K.M., Madoff, L.C. and Eichenwald, E.C.** (2005). Early-onset group B streptococcal disease in the era of maternal screening. *Pediatrics*; **115**:1240-1246.
10. **Dermer, P.C., Lee, C., Eggert, J. and Few, B.** (2004). A history of neonatal group B *Streptococcus* with its related morbidity and mortality rates in the United States. *J Pediat Nurs*; **19**:356-363.
11. **Jennings, H.J., Katzenellenbogen, E., Lugowski, C. and Kasper, D.L.** (1983). Structure of native polysaccharide antigens of type Ia and type Ib group B *Streptococcus*. *Biochemistry*; **22**:1258-1264.
12. **Wessels, M.R., Benedí, W.J., jennings, H.J., DiFabio, J.L. and Kasper, D.L.** (1987). Isolation and characterization of type IV group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *Infect Immun*; **57**:1089-1094.
13. **von Hunolstein, C., Parisi, L., Tissi, L., Recchia, S., Alfarone, G., Nicolini, L. et al.** (1999). Virulence properties of type VII *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) and immunochemical analysis of capsular type polysaccharide. *J Med Microbiol*; **48**:983-990.

14. Wessels, M.R., Pozsgay, V., Kasper, D.L. and Jennings, H.J. (1987). Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B *Streptococcus*. A revised structure for the type III group B streptococcal polysaccharide antigen. *J Biol Chem*; **262**:8262-8267.
15. Jennings, H.J., Rosell, K.G., Katzenellenbogen, E. and Kasper, D.L. (1983). Structural determination of the capsular polysaccharide antigen of type II group B *Streptococcus*. *J Biol Chem*; **258**:1793-1798.
16. Kogan, G. *et al.* (1995). Structural elucidation of the novel type VII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide by high resolution NMR spectroscopy. *Carbohydr Res*; **277**:1-9.
17. Kogan, G., Brisson, J.R., Kasper, D.L., von Hunolstein, C., Orefici, G. and Jennings, H.J. (1996). Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *J Biol Chem*; **271**:8786-8790.
18. Slotved, H.C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S. and Gilbert, G.L. (2007). Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J Clin Microbiol*; **45**:2929-2936.
19. Wessels, M.R., DiFabio, J.L., Benedí, V.J., Kasper, D.L., Michon, F., Brisson, J.R. *et al.* (1991). Structure and immunochemical characterization of the type V group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *J Biol Chem*; **266**:6714-6719.
20. Johri, A.K., Paoletti, L.C., Glaser, P., Dua, M., Sharma, P.K., Grandi, G. *et al.* (2006). Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. *Nat Rev Microbiol*; **4**:932-942.
21. Maisey, H.C., Doran, K.S. and Nizet, V. (2008). Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Exp Rev Molec Med*; **10**:1-16.
22. Clay, L.S. (1996). Group B *Streptococcus* in the perinatal period. A review. *J Nurse Midwifery*; **41**:355-363.
23. Shet, A. and Ferrieri, P. (2004). Neonatal & maternal group B streptococcal infections: a comprehensive review. *Indian J Med Res*; **120**:141-150.
24. Farley, M.M. (2001). Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin Infect Dis*; **33**:556-561.
25. Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, C., Chevalier, F., Frangeul, L., Msadek, T. *et al.* (2002). Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol Microbiol*; **45**:1499-1513.
26. Law, M.R., Palomaki, G., Alfirevic, Z., Gilbert, R., Heath, P., McCartney, C. *et al.* (2005). The prevention of neonatal group B streptococcal disease: a report by a working group of the Medical screening Society. *J Med Screen*; **12**:60-68.
27. Spellerberg, B. (2000). Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes Infect*; **2**:1733-1742.
28. Rubens, C.E., Raff, H.V., Jackson, J.C., Chi, E.Y., Bielitzki, J.T. and Hillier, S.L. (1991). Pathophysiology and histopathology of group B

- streptococcal sepsis in *Macaca nemestrina* primates induced after intraamniotic inoculation: evidence for bacterial cellular invasion. *J Infect Dis*; **164**:320-330.
29. **Mullaney, D.M.** (2001). Group B streptococcal infections in newborns. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*; **30**:649-658.
  30. **Rajagopal, L.** (2009). Understanding the regulation of Group B streptococcal virulence factors. *Future Microbiol*; **4**:201-221.
  31. **Pettersson, K.** (2007). Perinatal infection with group B streptococci. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine. Elsevier*; **12**:193-197.
  32. **Ferrieri, P., Cleary, P.P. and Seeds, A.E.** (1977). Epidemiology of group B streptococcal carriage in pregnant women and newborn infants. *J Med Microbiol*; **10**:103-114.
  33. **Galask, R.P., Warner, M.W., Petzold, C.R. and Wilbur, S.L.** (1984). Bacterial attachment to the chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol*; **148**:915-928.
  34. **Cowgill, K., Taylor, T.H., Schuchat, A. and Schrag, S.** (2003). Report from the CDC. Awareness of perinatal group B streptococcal infection among women of childbearing age in the United States, 1999 and 2002. *J Womens Health (Larchmt)*; **12**:527-532.
  35. **Lin, F.Y., Weisman, L.E., Troendle, J. and Adams, K.** (2003). Prematurity is the major risk factor for late-onset Group B *Streptococcus* disease. *J Infect Dis*; **188**:267-271.
  36. **Schrag, S.J., Phil, D., Zywicki, S., Farley, M.M., Reingold, A.L., Harrison, L.H. et al.** (2000). Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med*; **342**:15-20.
  37. **Tumbaga, P.F. and Philip, A.G.S.** (2003). Perinatal Group B Streptococcal infections: past, present and future. *NeoReviews*; **4**:65-72.
  38. **Pettersson, K.** (2007). Perinatal infection with group B Streptococci. *Semin Fetal Neonatal Med*; **12**:193-197.
  39. **Eickhoff, T.C., Klein, J.O., Ingall, D. and Finland, M.** (1964). Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic streptococci. *N Engl J Med*; **271**:1221-1228.
  40. **Hood, M., Janney, A. and Dameron, G.** (1961). Beta hemolytic *Streptococcus* group B associated with problems of the perinatal period. *Am J Obstet Gynecol*; **82**:809-818.
  41. **Paoletti, L.C. and Madoff, L.C.** (2002). Vaccines to prevent neonatal GBS infection. *Semin Neonatol*; **7**:315-323.
  42. **Centers for Diseases Control and Prevention (CDC).** (1997). Decreasing incidence of perinatal Group B streptococcal disease – United States, 1993-1995. *MMWR*; **46**:473-477.
  43. **Lukacs, S.L., Schoendorf, K.C. and Schuchat, A.** (2004). Trends in sepsis-related neonatal mortality in the United States, 1985-1998. *Pediatr Infect Dis J*; **23**:599-603.
  44. **Yagupsky, P., Menegus, M.A. and Powell, K.R.** (1991). The changing spectrum of group B streptococcal disease in infants: na eleven-year experience in a tertiary care hospital. *Pediatr Infect Dis J*; **10**:801-808.

45. Edwards, M.S., Rench, M.A., Haffar, A.A.M., Murphy, M.A., Desmond, M.M. and Baker, C.J. (1985). Long-term sequelae of group B streptococcal meningitis in infants. *J Pediatr*; **106**:717-722.
46. Regan, J.A., Chao, S. and James, L.S. (1981). Premature rupture of membranes, preterm delivery, and group B streptococcal colonization of mothers. *Am J Obstet Gynecol*; **141**:184-186.
47. Dillon, H.C., Khare, S. and Gray, B.M. (1987). Group B streptococcal carriage and disease: a 6-year prospective study. *J Pediatr*; **110**:31-36.
48. Edwards, M.C. and Baker, C.J. (2005). Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis*; **41**:839-847.
49. Farley, M.M. (2001). Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin Infect Dis*; **33**:556-561.
50. Harrison, L.H. *et al.* (1998). Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. Maryland Emerging Infections Program. *J Infect Dis*; **177**:998-1002.
51. Baker, C.J. and Barrett, F.F. (1973). Transmission of group B streptococci among parturient women and their neonates. *J Pediatrics*; **83**:919-925.
52. Easmon, C.S., Hastings, M.J., Clare, A.J., Bloxham, B., Marwood, R., Rivers, R.P. *et al.* (1981). Nosocomial transmission of group B streptococci. *Br Med J (Clin Res Ed)*; **283**:459-461.
53. Shuchat, A., Deaver-Robinson, K., Plikaytis, K.M., Mohle-Boetani, J. and Wenger, J.D. (1994). Multistate case-control study of maternal risk factors for neonatal group B streptococcal disease. *Pediatr Infect Dis J*; **13**:623-629.
54. Baker, C.J. and Kasper, D.L. (1976). Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N Engl J Med*; **294**:753-756.
55. Shuchat, A., Oxtoby, M., Cochi, S., Sikes, R.K., Hightower, A., Plikaytis, B. *et al.* (1990). Population-based risk factors for neonatal group B streptococcal disease: results of a cohort study in metropolitan Atlanta. *J Infect Dis*; **162**:672-677.
56. Boyer, K.M. and Gotoff, S.P. (1986). Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. *N Engl J Med*; **314**:1665-1669.
57. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). (1996). Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. *MMWR*; **45**:1-24.
58. American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases/Committee on Fetus and Newborn. (1997). Revised guidelines for prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) disease. *Pediatrics*; **99**:489-496.
59. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). (2002). Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR*; **51**:1-22.

60. Zangwill, K.M., Schuchat, A. and Wenger, J.D. (1992). Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. *MMWR*; **41**:25-32.
61. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). (2000). Early-onset group B streptococcal disease, United States, 1998-1999. *MMWR*; **49**:793-796.
62. Neto, M.T. (2008). Group B streptococcal disease in portuguese infants younger than 90 days. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*; **93**:90-93.
63. Schuchat, A., Zywicki, S.S., Dinsmoor, M.J., Mercer, B., Romaguera, J., O'Sullivan, M.J. *et al.* (2000). Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: a multicenter case-control study. *Pediatrics*; **105**:21-26.
64. Daley, A.J. and Garland, S.M. (2004). Prevention of neonatal group B streptococcal disease: progress, challenges and dilemmas. *J Pediatric Child Health*; **40**:664-668.
65. Baker, C.J. and Edwards, M.S. (2003). Group B streptococcal conjugate vaccines. *Arch Dis Child*; **88**:375-378.
66. Van Dyke, M.K., Phares, C.R., Lynfield, R., Thomas, A.R., Arnold, K.E., Craig, A.S. *et al.* (2009). Evaluation of universal antenatal screening for group B *Streptococcus*. *N Engl J Med*; **360**:2626-2636.
67. Lancefield, R.C. and Hare, R. (1935). The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. *J Exp Med*; **61**:335-349.
68. Paoletti, L.C., Pinel, J., Kennedy, R.C. and Kasper, D.L. (2000). Maternal antibody transfer in baboons and mice vaccinated with a group streptococcal polysaccharide conjugate. *J Infect Dis*; **181**:653-658.
69. Baker, C.J. (1980). Group B streptococcal infections. *Adv Intern Med*; **25**:475-501.
70. Baker, C.J., Rench, M.A., Edwards, M.S., Carpenter, R.J., Hays, B.M. and Kasper, D.L. (1988). Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B *Streptococcus*. *N Engl J Med*; **319**:1180-1185.
71. Lagergard, T., Shiloach, J., Robbins, J.B. and Schneerson, R. (1990). Synthesis and immunological properties of conjugates composed of group B *Streptococcus* type III capsular polysaccharide covalently bound to tetanus toxoid. *Infect Immun*; **58**:687-694.
72. Wessels, M.R., Paoletti, L.C., kasper, D.L., DiFabio, J.L., Michon, F., Holme, K. *et al.* (1990). Immunogenicity in animals of a polysaccharide-protein conjugate vaccine against type III group B *Streptococcus*. *J Clin Invest*; **86**:1428-1433.
73. Gravekamp, C., Kasper, D.L., Paoletti, L.C. and Madoff, L.C. (1999). Alpha C protein as a carrier for type III capsular polysaccharide and as a protective protein in group B streptococcal vaccines. *Infect Immun*; **67**:2491-2496.
74. Paoletti, L.C., Wessels, M.R., Rodewald, A.K., Shroff, A.A., Jennings, H.J. and Kasper, D.L. (1994). Neonatal mouse protection against infection with multiple group B streptococcal (GBS) serotypes by maternal

- immunization with a tetravalent GBS polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *Infect Immun*; **62**:3236-3243.
75. **Ramaswamy, S.V. et al.** (2006). Molecular characterization of nontypeable group B *Streptococcus*. *J Clin Microbiol*; **44**:2398-2403.
76. **Cheng, Q.B., Carlson, B., Pillai, S., Eby, R., Edwards, L., Olmsted, S.B. et al.** (2001). Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophages killing of group B streptococci. *Infect Immun*; **69**:2302-2308.
77. **Madoff, L.C., Michel, J.L., Gong, E.W., Rodewald, A.K. and Kasper, D.L.** (1992). Protection of neonatal mice from group B streptococcal infection by maternal immunization with beta C protein. *Infect Immun*; **60**:4989-4994.
78. **Martin, D., Rioux, S., Gagnon, E., Boyer, M., Hamel, J., Charland, N. et al.** (2002). Protection from group B streptococcal infection in neonatal mice by maternal immunization with recombinant Sip protein. *Infect Immun*; **70**:4897-4901.
79. **Stalhammar-Carlemalm, M., Stenberg, L. and Lindahl, G.** (1993). Protein rib: a novel group streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *J Exp Med*; **177**:1593-1603.
80. **Soares, R., Ferreira, P., Santarem, M.M., Teixeira da Silva, M. and Arala-Chaves, M.** (1990). Low T- and B-cell reactivity is an apparently paradoxical request for murine immunoprotection against a B-cell mitogen produced by these bacteria. *Scand J Immunol*; **31**:361-366.
81. **Tavares, D., ferreira, P., Vilanova, M., Videira, A. and Arala-Chaves, M.** (1995). Immunoprotection against systemic candidiasis in mice. *Int Immunol*; **7**:785-796.
82. **Madureira, P., Baptista, M., Vieira, M., Magalhães, V., Camelo, A., Oliveira, L. et al.** (2007). *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *J Immunol*; **178**:1379-1387.
83. **Zangwill, K.M., Schuchat, A. and Wenger, J.D.** (1992). Group B streptococcal disease in the United States, 1990:report from a multistate active surveillance system. *MMWR CDC Surveill Summ*; **41**:25-32.
84. **Schrag, S.J., Phil, D., Zell, E.R., Stat, M., Lynfield, R., Roome, A. et al.** (2002). A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. *N Engl J Med*; **347**:233-239.
85. **Phares, C.R., Lynfield, R., Farley, M.M., Mohle-Boetani, J., Harrison, L.H., Petit, S. et al.** (2008). Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA*; **299**:2056-2064.
86. **Wang, T.K., Fung, A., Woo, P., Yuen, K. and Wong, S.** (2002). *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) bacteraemia in nonpregnant adults. *J Clin Microbiol Infect Dis*; **21**:140-142.
87. **Ho, C.M., Chi, C.Y., Ho, M.W., Chen, C.M., Liao, W.C., Liu, P.C. et al.** (2006). Clinical characteristics of group B *Streptococcus* bacteremia in non-pregnant adults. *J Microbiol Immunol Infect*; **39**:396-401.

88. **Trijbels-Smeulders, M.A., Kollée, L.A., Adriaanse, A.H., Kimpen, J.L., Gerards, L.J.** (2004). Neonatal group B streptococcal infection: incidence and strategies for prevention in Europe. *Pediatr Infect Dis J*; **23**:172-173.
89. **Barcaite, E., Bartusevicius, A., Tameliene, R., Kliucinskas, M., Maleckiene, L. and Nadisauskiene, R.** (2008). Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstetr Gynecol Scand*; **87**:260-271.
90. **Whitney, C.G., Daly, S., Limpongsanurak, S., Festin, M.R., Thinn, K.K., Chipato, T. et al.** (2004). The international infections in pregnancy study: group B streptococcal colonization in pregnant women. *J Matern Fetal Neonatal Med*; **15**:267-274.
91. **Stoll, B.J. and Schuchat, A.** (1998). Maternal carriage of group streptococci in developing countries. *Pediatr Infect Dis J*; **17**:499-503.
92. **Belgian Health Council.** (2003). Prevention of perinatal group B streptococcal infections. Available online at: <https://portal.health.fgov.be>.
93. **Heath, P.T., Balfour, G., Weisner, A., Efstratiou, A., Lamagni, T., Tighe, H. et al.** (2004). Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days. *Lancet*; **363**:292-294.
94. **Hakansson, S. and Kallen, K.** (2006) Impact and risk factors for early-onset group B streptococcal morbidity: analysis of a national, population-based cohort in Sweden 1997-2001. *BJOG*; **113**:1452-1458.
95. **Money, D.M. and Donbson, S.** (2004) The prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease. *J Obstet Gynaecol Can*; **26**:826-840.
96. **Grimwood, K., Stone, P.R., Gosling, I.A., Green, R., Darlow, B.A., Lennon, D.R. et al.** (2002) Late antenatal carriage of Group B Streptococcus by New Zealand women. *Aust NZ J Obstet Gynaecol*; **42**:182-186.
97. **Fluegge, K., Siedler, A., Heinrich, B., Schulte-Moenting, J., Moennig, M.J., Bartels, D.B. et al.** (2006) Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany. *Pediatrics*; **117**:1139-1145.
98. **Lalioui, L., Pellegrini, E., Dramsi, S., Baptista, M., Bourgeois, N., Doucet-Populaire, F. et al.** (2005) The srtA Sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif, for adhesion to epithelial cells, and for colonization of the mouse intestine. *Infec Immun*; **73**:3342-3350.
99. **Doran, K.S. and Nizet, V.** (2004). Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Mol Microbiol*; **54**:23-31.
100. **Larsen, J.W. and Sever, J.L.** (2008). Group B *Streptococcus* and pregnancy: a review. *Am J Obstet Gynecol*; **198**:440-449.
101. **Reid, T.M.S.** (1975). Emergence of group B streptococci in obstetric and perinatal infections. *British Med J*; **2**:533-536.
102. **Patterson, M.J. and Hafeez, A.B.** (1976). Group B streptococci in Human Disease. *Bacteriol Reviews*; **40**:774-792.



103. **Knox, J.N.** (1979). Group B streptococcal infection. *British J of Venereal Dis*; **55**:118-120.
104. **Baltimore, R.S.** (1982). Pathogenesis of neonatal group B streptococcal infections. *The Yale J of Biol and Med*; **55**:291-295.
105. **Engvall, E. and Perlmann, P.** (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*; **8**:871-874.
106. **WHO.** (2005). State of the art of vaccine research and development: Initiative for Vaccine Research [online] [http://www.who.int/vaccine\\_research/documents/en/stateofart\\_excler.pdf](http://www.who.int/vaccine_research/documents/en/stateofart_excler.pdf)
107. **Brigsten, A.K., Kasper, D.L., Baker, C.J., Jennings, H.J. and Guttormsen, H.K.** (2002). Induction of cross reactive antibodies by immunization of healthy adults with type Ia and Ib group B streptococcal polysaccharide tetanus toxoid conjugate vaccines. *J Infect Dis*; **185**:1277-1284.
108. **Jones, N., Bohnsack, J.F., Takahashi, S., Oliver, K.A., Chan, M.S., Glaser, P. et al.** (2003). Multilocus sequencing typing system for group B Streptococcus. *J Clin Microbiol*; **41**:2530-2536.
109. **Cornacchione, P., Scaringi, L., Fettucciari, K, Rosati, E., Sabatini, R., Orefici, G. et al.** (1998). Group B streptococci persist inside macrophages. *Immunobiology*; **93**:86-95.
110. **Rage, C.I., Kumar, S., Harle, A., Nanda, J.S. and Raje, M.** (2007). The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. *J Biol Chem*; **282**:3252-3261.
111. **Sojar, A. and Genco, R.J.** (2005). Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of epithelial cells as a second molecule that binds to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol*; **45**:25-30.
112. **Serruto, D. and Rappuoli, R.** (2006). Post-genomic vaccine development. *FEBS Letters*; **580**:2985-2992.
113. **Dormitzer, P., Ulmer, J. and Rappuoli, R.** (2008). Structure-based antigen design: a strategy for next generation vaccines. *Trends in Biotechnology*; **26**:659-667.

# **ANEXO**

# Anexo I – Estudo de Prevalência

---

## A. Ofício enviado a diversos hospitais de Portugal:

Exmo.(a). Senhor(a) Director(a) Clínico,  
Dr.(a).,

Sou aluna do mestrado em Medicina Legal, do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) e no âmbito da minha pesquisa estou a desenvolver um estudo cujo objectivo é avaliar a pertinência da infecção por *Streptococcus agalactiae* na morte de recém-nascidos em Portugal. O estudo está a ser realizado no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, sob a orientação da Professora Paula Ferreira.

Com este trabalho pretende-se avaliar a incidência em Portugal desta infecção nos recém-nascidos, estando este estudo inserido num trabalho de investigação científico mais alargado cujo objectivo final é desenvolver uma vacina contra a infecção por este agente.

Para tal, pretendo nesta fase do meu estudo recolher o máximo de informação possível da realidade dos hospitais portugueses no que se refere a doenças provocadas por esta bactéria, do número de vítimas mortais e, dos casos de sobrevivência após infecção, que tipos de sequelas apresentam, para que consiga documentar a importância desta infecção.

É de grande importância enaltecer que o que pretendo com este trabalho é ter dados que me permitam estudar e registar a prevalência, o número de casos para estudo epidemiológico, e não casos em particular, a identidade das pessoas e crianças com infecção não é neste estudo necessária, nem relevante.

Em Portugal, até à data existem muito poucos estudos epidemiológicos publicados acerca da infecção pela bactéria em recém-nascidos. Um estudo desta natureza será de grande importância e utilidade tanto para clínicos, como para investigadores.

É neste sentido que solicito a cooperação e auxílio dos serviços de **Obstetrícia e Ginecologia, Pediatria e Neonatologia** dos principais hospitais portugueses,

para que possa assim reunir os dados necessários à elaboração deste estudo epidemiológico.

Peço assim **autorização para a consulta do registo** de casos que têm passado pelo vosso serviço de infecções provocadas por *Streptococcus agalactiae*, tanto em mulheres grávidas, como em recém-nascidos.

Se tiverem quaisquer dúvidas agradeço que me contactem via e-mail: **ange.fernandes@hotmail.com**; ou através do meu número pessoal: **96 86 48 609**.

Desde já os meus sinceros agradecimentos pelo tempo dispensado e pela imprescindível ajuda para a progressão do meu trabalho e por consequência obtenção do grau de mestre.

Com os melhores cumprimentos,

Ângela Fernandes.

Porto, 7 de Julho de 2009

## **B. Colheita e processamento das amostras para rastreio de *S. agalactiae*:**

As amostras de exsudado recto-vaginal foram colhidas com zaragatoa e enviadas em meio de transporte adequado. As zaragatoas foram introduzidas em meio líquido selectivo de Todd-Hewitt, que foi seguidamente incubado 24 horas a 37°C. Posteriormente é realizada a sementeira em gelose de sangue e é colocado um disco de antibiótico SXT (Trimetoprim-Sulfametoxazol) no 1.º quadrante do meio de cultura, sendo, de seguida, novamente incubado durante 24 horas a 37°C.

O disco de antibiótico vai permitir que o *S. agalactiae* cresça neste meio, pois a bactéria é resistente ao antibiótico, e simultaneamente vai impedir o crescimento de outras bactérias susceptíveis.

Quando foi observado o crescimento sugestivo de colónias de *S. agalactiae*, estas foram repicadas para a realização de identificação e antibiograma.

# **Anexo II – Estudo Experimental**

---

## **SOLUÇÕES**

- **Soluções para o crescimento e obtenção da proteína recombinante:**

### Meio Todd

15 g Bacto Todd-Hewitt

Prefazer com água até um volume de 500 mL.

### Kanamicina 10 mg/mL

0,3 g de Kanamicina

H<sub>2</sub>O até prefazer 30 mL

### IPTG 1 M

7,14 g IPTG

H<sub>2</sub>O até perfazer 30 mL

### Lisozima 10 mg/mL

0,3 g de Lisozima

H<sub>2</sub>O até perfazer 30 mL

### Triton X-100 10%

10 mL Triton X-100

H<sub>2</sub>O até perfazer 100 mL

#### EDTA 50 mM em Start Buffer

3,72 g EDTA

Start Buffer até perfazer 200 mL

#### ▪ **Soluções para a purificação da rGAPDH na Coluna de Ni<sup>2+</sup>:**

#### Tampão Fosfato (8x)

14,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

11,1 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

233,8 g NaCl

Acertar pH para 7,4 e perfazer até um volume de 1L com água desionizada.

#### Start Buffer

125 mL de Tampão fosfato (8x)

5 mL de Imidazole 2M

Acertar pH para 7,4 e perfazer até um volume de 1L com água desionizada.

#### Imidazole 2M

68,75 g de Imidazole 99% (Sigma, I-0125)

Perfazer com água desionizada até um volume de 500 mL.

#### Imidazole 60 mM

62,5 mL de Tampão fosfato (8x)

15 mL de Imidazole 2 M

Acertar pH para 7,4 e perfazer até um volume de 500 mL com água desionizada.

#### Imidazole 100 mM

62,5 mL de Tampão fosfato (8x)

25 mL de Imidazole 2 M

Acertar pH para 7,4 e perfazer até um volume de 500 mL com água desionizada.

#### Imidazole 300 mM

62,5 mL de Tampão fosfato (8x)

75 mL de Imidazole 2 M

Acertar pH para 7,4 e perfazer até um volume de 500 mL com água desionizada.

#### Imidazole 500 mM

62,5 mL de Tampão fosfato (8x)

125 mL de Imidazole 2 M

Acertar pH para 7,4 e perfazer até um volume de 500 mL com água desionizada.

#### **Tampão PBS (26x)**

216 g NaCl

7 g KCl

32,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Perfazer com água desionizada até um volume de 1 L.

#### ▪ **Soluções para o Método de Lowry:**

#### **Reagente Cupro-Alcalino**

##### Solução A

4 g de Carbonato de sódio anidro



0,004 g de Tartarato duplo de sódio e Potássio tetrahidratado

#### Solução B

0,5 g de Sulfato de cobre anidro

1 gota de Ácido sulfúrico

Perfazer com água desionizada até um volume de 100 mL.

Nota: No momento da utilização juntar 5 mL da solução A + 100 µL da solução B.

#### **Reagente Folin-Ciocalteu**

Diluir o reagente 1:2 em água desionizada

Nota: A solução diluída é extemporânea, motivo pelo qual deve ser preparada apenas no momento de utilização e ser mantida no escuro.

#### **BSA**

0,5 mg/mL para os padrões

#### ▪ **Soluções para Electroforese SDS-PAGE (10%):**

##### Gel de Separação

3,33 mL de Solução stock de monómero (30% T; 2,7% Bis)

2,50 mL de Tampão resolvente (4x)

0,10 mL de SDS 10%

4,00 mL de dH<sub>2</sub>O

100 µL de APS 10%

10,0 µL de TEMED

### Gel de Empacotamento

0,67 mL de Solução stock de monómero (30% T; 2,7% Bis)

1,25 mL de Tampão de empacotamento (4x)

0,05 mL de SDS 10%

3,00 mL de dH<sub>2</sub>O

50,0 µL de APS 10%

4,00 µL de TEMED

### Solução stock de monómero (30% T; 2,7% Bis)

60,0 g de Acrilamida

1,6 g de Bisacrilamida

Perfazer com água desionizada até um volume de 200 mL.

### Tampão Resolvente (4x)

36,3 g de Tris

Acertar pH para 8,8 com HCl

Perfazer até um volume de 200 mL com água desionizada.

### Tampão de Empacotamento (4x)

3,0 g de Tris

Acertar pH para 6,8 com HCl

Perfazer até um volume de 50 mL com água desionizada.

### Tampão de Electroforese

12,1 g de Tris

57,6 g de Glicina

4,0 g de SDS

Perfazer até um volume de 4 L com água desionizada.

### Tampão de Amostra

2,5 mL de solução Tris 0,5 M, pH 6,8

4,0 mL de SDS 10%

2,0 mL de Glicerol

0,2 mL 2-mercaptoetanol

0,2 mg Azul Bromofenol

Perfazer até um volume de 10 mL com água desionizada.

### **Soluções para a Coloração de Prata:**

#### Solução de Nitrato de Prata

2,5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  25%

0,375 mL de  $\text{NaOH}$  10M

$\text{dH}_2\text{O}$  até perfazer 40 mL

A esta solução, adicionar lentamente e com agitação, a solução de nitrato de prata:

1,5 g  $\text{AgNO}_3$

Perfazer até um volume de 7,5 mL com água desionizada.

#### Solução de desenvolvimento da imagem

0,05 g de Ácido cítrico

0,5 mL de Formaldeído

Perfazer até um volume de 500 mL com água desionizada.



