

CURSO DE FARMÁCIA

Michele Berger Ferreira

**AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR CONVENCIONAL E qPCR EM RELAÇÃO
AO PADRÃO-OURO PARA DETECÇÃO DE *Streptococcus agalactiae* EM
GESTANTES**

Santa Cruz do Sul

2016

Michele Berger Ferreira

**AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR CONVENCIONAL E qPCR EM RELAÇÃO
AO PADRÃO-OURO PARA DETECÇÃO DE *Streptococcus agalactiae* EM
GESTANTES**

Trabalho de Curso, apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana de Souza Nunes

Coorientador: Ms. Rodrigo Minuto Paiva

Santa Cruz do Sul

2016

RESUMO

Streptococcus agalactiae ou *Streptococcus* do grupo B (SGB) é um dos principais agentes causadores de infecções neonatais invasivas. A colonização materna por SGB é o principal fator de risco para a transmissão vertical e o desenvolvimento das infecções neonatais. A triagem das gestantes entre a 35^a e 37^a semanas de gestação e a administração de antimicrobiano durante o trabalho de parto às pacientes colonizadas é uma eficiente estratégia para a prevenção das infecções neonatais. Atualmente o método considerado como padrão-ouro para a detecção de SGB é a cultura microbiológica. No presente estudo, objetivamos avaliar o desempenho de ensaios de PCR convencional e PCR em tempo-real (qPCR), como métodos de triagem para SGB em gestantes, em relação ao padrão-ouro. Realizou-se um estudo transversal, onde foram analisadas 130 amostras de material combinado anal/vaginal, de gestantes com 35 semanas ou mais de gestação, atendidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os resultados foram avaliados para determinar a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos de ambos os ensaios de PCR. A análise estatística foi realizada no programa SPSS versão 20.0. A taxa de colonização verificada foi de 3,8% através do padrão-ouro, 17,7% através do ensaio de PCR convencional e 29,2% no ensaio de qPCR. Os ensaios de PCR convencional e qPCR apresentaram sensibilidade de 100%, especificidade de 85,6% e 73,6% respectivamente. O valor preditivo negativo foi de 100% em ambos os ensaios e o valor preditivo positivo foi de 21,7% no ensaio de PCR convencional e 13,1% no ensaio de qPCR. O ensaio de qPCR avaliado, apresentou alto desempenho quando comparado ao padrão-ouro e maior detecção da colonização por SGB em comparação ao ensaio de PCR convencional. Além disso, disponibiliza resultados em um menor período, demonstrando potencial para ser empregado na rotina de rastreio, contribuindo para a otimização das abordagens preventivas da infecção neonatal por SGB.

Palavras chaves: *Streptococcus agalactiae*, gestantes, triagem, PCR convencional, PCR em tempo-real.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae or Group B *Streptococcus* (GBS) is one of the main causative agents of invasive neonatal infections. Maternal colonization by SGB is the main risk factor for vertical transmission and the development of neonatal infections. Screening of pregnant women between the 35th and 37th weeks of pregnancy and antimicrobial administration during labor to colonized patients is an effective strategy for the prevention of neonatal infections. Currently the method considered the gold standard for detection of GBS is the microbiological culture. In this study, we aimed to evaluate the performance of conventional PCR and PCR in real-time (qPCR) assays, as screening methods for GBS in pregnant women compared to the gold standard. We conducted a cross-sectional study, which analyzed 130 samples of anal / vaginal combined material, pregnant women at 35 weeks or more of gestation, treated at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The results were evaluated for the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of both PCR assays. Statistical analysis was performed using SPSS version 20.0 program. The verified colonization rate was 3.8% through the gold standard, 17.7% by the conventional PCR assay and 29.2% in the test qPCR. The trials of conventional PCR and qPCR showed a sensitivity of 100%, specificity of 85.6% and 73.6% respectively. The negative predictive value was 100% in both tests and the positive predictive value was 21.7% in the conventional PCR assay and 13.1% in the qPCR test. The qPCR assay evaluated, showed high performance when compared to the gold standard and greater detection of colonization by SGB compared to conventional PCR assay. It offers results in a shorter period, demonstrating the potential to be used in routine screening, contributing to the optimization of preventive approaches to neonatal GBS infection.

Key words: *Streptococcus agalactiae*, pregnant women, screening, conventional PCR, Real-time PCR.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos Específicos	8
3 REFERENCIAL TEÓRICO	9
3.1 Gênero <i>Streptococcus</i>	9
3.2 <i>Streptococcus agalactiae</i>	10
3.3 Colonização e infecção por <i>S. agalactiae</i> em gestantes e neonatos.....	12
3.4 Prevenção das infecções neonatais por <i>S. agalactiae</i>	17
3.5 Importância e acurácia da técnica de PCR como método rápido de triagem	20
4 METODOLOGIA.....	23
4.1 Delineamento do estudo.....	23
4.2 Local do estudo	23
4.3 População e amostra.....	23
4.4 Critérios de inclusão e exclusão	23
4.5 Aspectos éticos	23
4.6 Procedimentos Metodológicos	24
4.6.1 Isolamento e identificação microbiológica	24
4.6.2 Identificação molecular.....	24
4.6.2.1 Extração DNA.....	24
4.6.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	25
4.6.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo-real (qPCR)	25
4.6.2.4 Análise estatística.....	27
5 ARTIGO	28
6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	52
ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO.....	55

INTRODUÇÃO

As infecções representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade neonatal, sendo o *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus* do grupo B (SGB) um dos principais patógenos envolvidos na ocorrência de septicemia levando ao óbito precoce (STOLL et al., 2011; CRETÍ et al., 2013; SEALE et al., 2013; BEKKER et al., 2014). O potencial invasivo desse micro-organismo em humanos foi inicialmente relatado nos anos 30, sendo que na década de 70, emergiu como o principal agente envolvido em infecções invasivas neonatais (BAKER et al., 1973; McCRACKEN, 1973).

A incidência das infecções neonatais por SGB nos países em desenvolvimento varia entre 0,80 e 3,06 por mil nascidos vivos (DAGNEW et al., 2012). No Brasil, alguns estudos revelam uma incidência entre 0,39 e 1 por mil nascidos vivos (MIURA, MARTIN, 2001; VACILOTO et al., 2002; FIOLO et al., 2012; EVANGELISTA, FREITAS, 2015).

O *S. agalactiae* coloniza principalmente o trato gastrointestinal inferior, sendo disseminado para o trato geniturinário, nas situações onde ocorre a diminuição da flora vaginal normal (*Lactobacillus*). Em gestantes, a colonização vaginal pela bactéria constitui o principal fator de risco para complicações durante a gravidez e infecção neonatal precoce. A principal forma de transmissão do SGB é a vertical (mãe-feto) que ocorre durante o parto, pelo contato do neonato com os fluidos amnióticos e vaginais contaminados, pode também ocorrer no próprio útero devido à infecção ascendente (SCHRAG et al., 2002; BRZYCHCZY-WLOCH et al., 2013; CHAN et al., 2013).

Em 1996, foram emitidas as primeiras diretrizes pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) para prevenção das infecções neonatais por SGB, sendo essas atualizadas em 2002 e posteriormente em 2010. A implementação destas práticas preventivas nos Estados Unidos, diminuiu em 80% a incidência de infecções neonatais precoces por SGB, reduzindo de 1,8 casos por mil nascidos vivos para 0,26 casos por mil nascidos vivos (SCHRAG, VERANI, 2013).

As diretrizes emitidas pelo CDC preconizam a triagem universal das gestantes entre a 35^a e 37^a semanas de gestação, através da coleta de material combinado anal/vaginal para detecção da colonização por SGB. Além disso, todas as gestantes que apresentarem resultados positivos devem receber a profilaxia com

antimicrobiano durante o trabalho de parto (VERANI, McGEE, SCHRAG, 2010).

A cultura microbiológica é considerada o padrão-ouro para a detecção da colonização por SGB em gestantes, no entanto, o método requer um longo período, entre 18 e 72 horas, para disponibilizar os resultados. Outra limitação da técnica, refere-se a sensibilidade reduzida em situações onde há uma baixa carga bacteriana ou a presença de micro-organismos não viáveis. A ocorrência de resultados falsos negativos, através da cultura microbiológica, conduz a ausência da abordagem profilática com antimicrobiano, elevando as chances da ocorrência de infecções neonatais por SGB (VAN DYKE et al., 2009; CRETÍ et al., 2013).

No que se refere à realidade do Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica a sepse neonatal por SGB como uma infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) (ANVISA, 2013). A Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) preconiza a triagem universal para identificação da colonização por *S. agalactiae*, no entanto, a rotina de rastreio não é uma realidade durante o período pré-natal, pois não é padronizada pelo Ministério da Saúde (MS). A falta de consenso entre os órgãos de saúde no país expõe a necessidade de serem estabelecidas políticas eficientes para a detecção da colonização em gestantes e conseqüentemente diminuir os casos de infecção neonatal (BRASIL, 2006; FEBRASGO, 2006).

Como alternativa ao padrão-ouro, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido avaliada, demonstrado alto poder de acurácia para a triagem de SGB em gestantes (BERGERON et al., 2000; EL AILA et al., 2011; YEUNG et al., 2015). Diante da evidente associação entre a colonização materna por SGB, a transmissão vertical e o desenvolvimento das infecções neonatais, torna-se importante o estudo de ensaios mais acurados que possam ser executados na rotina de triagem e que otimizem a correta abordagem preventiva. Através do presente estudo, objetivou-se avaliar o desempenho das técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR) como métodos mais sensíveis, específicos e rápidos para triagem de *S. agalactiae* em gestantes, quando comparadas ao padrão-ouro.

REFERÊNCIAS

- ALFA, M.J. et al. Real-Time PCR Assay Provides Reliable Assessment of Intrapartum Carriage of Group B Streptococcus. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 9, p. 3095–3099, 2010.
- ANDERSON, B.L. et al. Untreated asymptomatic group B streptococcal bacteriuria early in pregnancy and chorioamnionitis at delivery. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v.196, n.6, p. 524.e1-5, 2007.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Critérios Diagnósticos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde Neonatologia. 1ªed. 2013.
- BACK, E.E.; O'GRADY, E.J.; BACK, J.D. High Rates of Perinatal Group B Streptococcus Clindamycin and Erythromycin Resistance in an Upstate New York Hospital. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.56, n.2, p.739–742, 2012.
- BAKER, C.J.; RENCH, M.A.; McINNES, P. Immunization of pregnant women with group B streptococcal type III capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *Vaccine*, v.21, n.24, p.3468-3472, 2003.
- BAKER, C.J. et al. Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants. *The Journal of Pediatrics*, v.82, n. 4, p.724–729, 1973.
- BARCAITE, E. et al. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, v.87, n.3, p. 260-271, 2008.
- BEBIEN, M. et al. The Pore-Forming Toxin β hemolysin/cytolysin Triggers p38 MAPK-dependent IL-10 production in macrophages and inhibits innate immunity. *PLOS Pathogens*, v.8, n.7, p.e1002812, 2012.
- BEKKER, V. et al. Incidence of invasive group B streptococcal disease and pathogen genotype distribution in newborn babies in the Netherlands over 25 years: a nationwide surveillance study. *The Lancet Infectious Diseases*, v.14, n.11, p.1083–1089, 2014.
- BERARDI, A. et al. Universal antenatal screening for group B streptococcus in Emilia-Romagna. *Journal of Medical Screening*, v.18, n.2, p.60-64, 2011.
- BERARDI, A. et al. Group B Streptococcus Late-Onset Disease: 2003–2010. *Pediatrics*, v.131, n.2, p.361-368, 2013.
- BERGERON, M.G. et al. Rapid detection of group b streptococci in pregnant women at delivery. *The New England Journal of Medicine*, v. 343, n. 3, p.175-179, 2000.
- BERGSEN, H. et al. Real-time PCR targeting the sip gene for detection of group B streptococcus colonization in pregnant women at delivery. *Journal of Medical Microbiology*, v.56, n.2, p.223-228, 2007.

BORGER, I.L. et al. Streptococcus agalactiae em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.27, n.10, p.575-579, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área Técnica de Saúde da Mulher. Pré-natal e Puerpério: atenção qualificada e humanizada – manual técnico/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas – Brasília: Ministério da Saúde, 3ª ed. 2006.

Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde. Modulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância medica /Agencia Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.

BRZYCHCZY-WLOCH, M. et al. Incidence of maternal GBS colonization and neonatal GBS disease among Very Low Birth Weight Polish neonates. *Medical Science Monitor*, v.19, p.34-39, 2013.

CAMUSET, G. et al. Invasive Group B Streptococcal Disease in Non-pregnant Adults, Réunion Island, 2011. *International Journal Infectious Diseases*, v.35, p.46-50, 2015.

CAPANNA, F. et al. Antibiotic resistance patterns among group B Streptococcus isolates: implications for antibiotic prophylaxis for early-onset neonatal sepsis. *Swiss Medical Weekly*, n. 143, p.13778, 2013.

CAPE, A. et al. Peripartum Bacteremia in the Era of Group B Streptococcus Prophylaxis. *Obstetricians & Gynecologists*, v.121, n.4, p. 812-818, 2013.

CAPRARO, G.A. et al. High Rates of Inducible Clindamycin Resistance among Prenatal Group B Streptococcal Isolates in One Northwest Louisiana Academic Medical Center. *Journal of Clinical Microbiology*, v.51, n.7, p.2469, 2013.

CARLIN, A.F. et al. Group B Streptococcus suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5. *Journal of Experimental Medicine*, v.206, n.8, p.1691-1699, 2009.

CASTELLANO-FILHO, D.S. et al. Detection of group B Streptococcus in Brazilian pregnant women and antimicrobial susceptibility patterns. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.41, n.4, p.1047-1055, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep.*; 45(RR-7):1-24, 1996. Disponível em < <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00043277.htm>>. Acesso em: 12 Ago 2015.

CHAN, C.J. et al. Early-onset neonatal sepsis in Dhaka, Bangladesh: risk associated with maternal bacterial colonisation and chorioamnionitis. *Tropical Medicine and*

International Health, v.18, n.9, p.1057–1064, 2013.

CIESLEWICZ, M.J. et al. Structural and genetic diversity of Group B Streptococcus capsular polysaccharides. *Infection and Immunity*, v.73, n.5, p.3096–3103, 2005.

CONVERT, M. et al. Comparison of LightCycler PCR and culture for detection of group B streptococci from vaginal swabs. *Clinical Microbiology and Infection*, v.11, n.12, p.1022-1026, 2005.

COSTA, A.L.R. et al. Prevalência de colonização por estreptococos do grupo B em gestantes atendidas em maternidade pública da região Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.30, n.6, p.274-280, 2008.

CRETI, R. et al. Characteristics of neonatal GBS disease during a multicentre study (2007-2010) and in the year 2012. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, v.49, n.4, p.370-375, 2013.

DAGNEW, A.F. et al. Variation in reported neonatal group B streptococcal disease incidence in developing countries. *Clinical Infectious Diseases*, v.55, n.1, p.91–102, 2012.

DAVIES, H.D. et al. Multicenter Study of a Rapid Molecular-Based Assay for the Diagnosis of Group B Streptococcus Colonization in Pregnant Women. *Clinical Infectious Diseases*, v.39, n.8, p.1129-1135, 2004.

DE-PARIS, F. et al. Group B Streptococcus detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.15, n.4, p.323-327, 2011.

DEUTSCHER, M. et al. Incidence and severity of invasive Streptococcus pneumoniae, group A Streptococcus, and group B Streptococcus infections among pregnant and postpartum women. *Clinical Infectious Diseases*, v.53, n.2, p.114-123, 2011.

DONDERS, G.G. et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v.116, n.10, p.1315–1324, 2009.

DUTRA, V.G. et al. Streptococcus agalactiae in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *BMC Infectious Diseases*, v.14, p.323, 2014.

EDWARDS, M.S.; BAKER, C.J. Group B Streptococcal Infections in Elderly Adults. *Clinical Infectious Diseases*, v.41, n.6, p.839–847, 2005.

EL AILA, N.A. et al. Comparison of culture with two different qPCR assays for detection of rectovaginal carriage of Streptococcus agalactiae (group B streptococci) in pregnant women. *Research in Microbiology*, v.162, n.5, p.499-505, 2011.

EL HELALI, N. et al. Diagnostic Accuracy of a Rapid Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Universal Intrapartum Group B Streptococcus Screening. *Clinical Infectious Diseases*, v.49, n.3, p.417–423, 2009.

EVANGELISTA, M.L.B; FREITAS, F.T.M. Group B streptococcus neonatal infection in an intensive care unit in Brazil: high fatality and missed opportunities for antibiotic prophylaxis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.19, n.1, p.98–99, 2015.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA (FEBRASGO). Projeto Diretrizes: Assistência Pré-Natal, 2006.

FEUERSCHUETTE, O.M. et al. Performance of RT-PCR in the detection of Streptococcus agalactiae in the anogenital tract of pregnant women. *Archives Gynecology and Obstetrics*, v.286, n.6, p.1437-1442, 2012.

FIOLO, K. et al. Taxa de infecção e sorotipos de Streptococcus agalactiae em amostras de recém-nascidos infectados na cidade de Campinas (SP), Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.34, n.12, p.544-549, 2012.

GASCHIGNARD, J. et al. Neonatal Bacterial Meningitis: 444 Cases in 7 Years. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v.30, n.3, p.212-217, 2011.

GHERARDI, G. et al. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, n.9, p.2909–2916, 2007.

GOUDARZI, G. et al. Culture and Real-Time PCR Based Maternal Screening and Antibiotic Susceptibility for Group B Streptococcus: An Iranian Experience. *Global Journal of Health Science*, v.7, n.6, p.233-239, 2015.

HAKANSSON, S. et al. Group B streptococcal carriage in Sweden: a national study on risk factors for mother and infant colonisation. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, v.7, n.1, p.50-58, 2008.

HALPERIN, S.A. et al. Transfer and Persistence of Antibodies in Infants Following Maternal Immunization with an Investigational Trivalent Group B Streptococcus Vaccine. *Open Forum Infectious Diseases*, v1,Sup.1, p:S1–65, 2014.

HAN, C. et al. Diagnostic and therapeutic advancements for aerobic vaginitis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v.291, n.2, p.251-257, 2015.

HEATH, P.T. et al. Group B streptococcal disease in infants: a case control study. *Archives of Disease in Childhood*, v.94, n.9, p.674-680, 2009.

HONEST, H.; SHARMA, S.; KHAN, K.S. Rapid Tests for Group B Streptococcus Colonization in Laboring Women: A Systematic Review. *Pediatrics*, v.117, n.4, 2006.

IMPERI, M. et al. Invasive neonatal GBS infections from an area-based surveillance study in Italy. *Clinical Microbiology and Infection*, v.17, n.12, p.1834-1839, 2011.

IPPOLITO, D.L. et al. Group B Streptococcus serotype prevalence in reproductive-age women at a tertiary care military medical center relative to global serotype distribution. *BMC Infectious Diseases*, v.10, p.336, 2010.

JOACHIM, A. et al. Maternal and neonatal colonisation of group B streptococcus at Muhimbili National Hospital in Dares Salaam, Tanzania: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance. *BMC Public Health*, n.9, p. 437-443, 2009.

JONES, N. et al. Multilocus Sequence Typing System for Group B Streptococcus. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.6, p.2530-2536, 2003.

JONSSON, I.M. et al. Role of Fibrinogen-Binding Adhesin Expression in Septic Arthritis and Septicemia Caused by Streptococcus agalactiae. *The Journal of Infectious Diseases*, v.92, n.8, p.1456-1464, 2005.

JOUBREL, C. et al. Group B streptococcus neonatal invasive infections, France 2007-2012. *Clinical Microbiology and Infection*, v.21, n.10, p.910-916, 2015.

KE, D. et al. Development of Conventional and Real-Time PCR Assays for the Rapid Detection of Group B Streptococci. *Clinical Chemistry*, v.46, n.3, p. 324-331, 2000.

KISS, F.S. et al. Prevalência da colonização por Streptococcus agalactiae em uma amostra de mulheres grávidas e não grávidas de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul. *Scientia Medica*, v.23, n.3, p. 169-174, 2013.

KROHN, M.A.; HILLIER, S.L.; BAKER, C.J. Maternal Peripartum Complications Associated with Vaginal Group B Streptococci Colonization. *The Journal of Infectious Diseases*, v.179, n.6, p.1410–1415, 1999.

KUNZE, M. et al. Colonization, serotypes and transmission rates of group B streptococci in pregnant women and their infants born at a single University Center in Germany. *Journal of Perinatal Medicine*, v.39, n.4, p.417-422, 2011.

KUNZE, M. et al. Comparison of pre- and intrapartum screening of group B streptococci and adherence to screening guidelines: a cohort study. *European Journal of Pediatrics*, v.174, n.6, p.827-835, 2015.

KWATRA, G. et al. Natural acquired humoral immunity against serotype-specific group B Streptococcus rectovaginal colonization acquisition in pregnant women. *Clinical Microbiology and Infection*, v.21, n.6, p. 568.e13-21, 2015.

KWATRA, G. et al. Serotype-Specific Acquisition and Loss of Group B Streptococcus Recto-Vaginal Colonization in Late Pregnancy. *Plos One*, v.9, n.6, p.e98778, 2014.

LAMBIASE, A. et al. In Vitro Resistance to Macrolides and Clindamycin by Group B Streptococcus Isolated from Pregnant and Nonpregnant Women. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, v. 2012, Article ID 913603, 2012.

LANCASTER, L. et al. Immunogenicity and physico-chemical characterisation of a candidate conjugate vaccine against group B streptococcus serotypes Ia, Ib and III.

Vaccine, v.29, n.17, p.3213–3221, 2011.

LANCEFIELD, R.C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *The Journal of Experimental Medicine*, v.57, n.4, p. 571–595, 1933.

LANCEFIELD, R.C. A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (GROUP B). *The Journal of Experimental Medicine*, v.59, n.4, p.441-458. 1934.

LANCEFIELD, R.C.; HARE, R. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. *The Journal of Experimental Medicine*, v.61, n.3, p.335–349, 1935.

LECLAIR, C. M. Group B Streptococcus: prevalence in a non-obstetric population. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, v.14, n.3, p.162–166, 2010.

LIÉBANA-MARTOS, M. del C. et al. Serotypes and antibiotic resistance patterns in beta-hemolytic *Streptococcus agalactiae* isolates in colonized mothers and newborns with invasive disease. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v.33, n.2, p.84–88, 2015.

MADZIVHANDILA, M. et al. Serotype Distribution and Invasive Potential of Group B Streptococcus Isolates Causing Disease in Infants and Colonizing Maternal-Newborn Dyads. *Plos One*, v.6, n.3, p.e17861, 2011.

MAISEY, H.C. et al. Group B Streptococcal Pilus Proteins Contribute to Adherence to and Invasion of Brain Microvascular Endothelial Cells. *Journal of Bacteriology*, v.189, n.4, p.1464–1467, 2007.

MARCONI, C. et al. Detection of *Streptococcus agalactiae* colonization in pregnant women by using combined swab cultures: cross-sectional prevalence study. *São Paulo Medical Journal*, v.128, n.2, p.60-62, 2010.

MATSUBARA, K.; HOSHINA, K.; SUZUKI, Y. Early-onset and late-onset group B streptococcal disease in Japan: a nationwide surveillance study, 2004–2010. *International Journal of Infectious Diseases*, v.17, n.6, p.e379-84, 2013.

McCRACKEN, G.H. Group B streptococci: the new challenge in neonatal infections. *Journal of Pediatrics*, v.82, n.4, p.703–706, 1973.

MEE-MARQUET, N. et al. Molecular Characterization of Human-Colonizing *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated from Throat, Skin, Anal Margin, and Genital Body Sites. *Journal of Clinical Microbiology*, v.46, n. 9, p.2906–2911, 2008.

MELO, S.C.C.S. et al. Performance of Hitchens-Pike-Todd-Hewitt Medium for Group B Streptococcus Screening in Pregnant Women. *Plos One*, v.10, n.4, p.e0123988, 2015.

MEYN, L.A.; KROHN, M.A.; HILLIER, S.L. Rectal colonization by group B *Streptococcus* as a predictor of vaginal colonization. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 201, n.1, p.76.e1-7, 2009.

MITIMA, K.T. et al. Prevalence of colonization by *Streptococcus agalactiae* among pregnant women in Bukavu, Democratic Republic of the Congo. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v.8, n.9, p.1195-1200, 2014.

MIURA, E.; Martin, M.C. Group B streptococcal neonatal infections in Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.43, n.5, p.243–246, 2001.

MOUSSA, T.A.A. et al. Group B streptococcus colonization of pregnant women: comparative molecular and microbiological diagnosis. *Comparative Clinical Pathology*, v.22, n.6, p.1229-1234, 2013.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. *Microbiologia médica*. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE (NICE). Xpert GBS test for the intrapartum detection of group B streptococcus. 2015. Disponível em: < <https://www.nice.org.uk/advice/mib28/chapter/technology-overview>>. Acesso em: 16 Set 2015.

NETO, M.T. Group B streptococcal disease in Portuguese infants younger than 90 days. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, v.93, n.2, p.90-93, 2008.

NOMURA, M.L. et al. Colonização materna e neonatal por estreptococo do grupo B em situações de ruptura pré-termo de membranas e no trabalho de parto prematuro. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.31, n.8, p.397-403, 2009.

OKIKE, I.O. et al. Incidence, Etiology, and Outcome of Bacterial Meningitis in Infants Aged <90 Days in the United Kingdom and Republic of Ireland: Prospective, Enhanced, National Population- Based Surveillance. *Clinical Infectious Diseases*, v.59, n.10, p.150-157, 2014.

ÓLADÓTTIR, G.L. et al. Increasing incidence of late-onset neonatal invasive group B streptococcal infections in Iceland. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v.30, n.8, p.661-663, 2011.

OSTER, G. et al. Prevention of group B streptococcal disease in the first 3 months of life: Would routine maternal immunization during pregnancy be cost-effective? *Vaccine*, v.32, n.37, p.4778–4785, 2014.

PARK, J.S. et al. Usefulness of a rapid real time PCR assay in prenatal screening for group B streptococcus colonization. *Annals of Laboratory Medicine*, v.33, n.1, p.39-44, 2013.

PARK, K.H. et al. Current status and clinical presentations of invasive neonatal Group B streptococcal infections in Korea. *Pediatrics International*, v.53, n.2, p.236-239, 2011.

PETERSEN, K.B. et al. Increasing prevalence of group B streptococcal infection among pregnant women. *Danish Medical Journal*, v.61, n.9, p.A4908, 2014.

PHARES, C. R. et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *The Journal of The American Medical Association*, v.299, n.17, p.2056-2065, 2008.

PODBIELSKI, A.; BLANKENSTEIN, O.; LÜTTICKEN, R. Molecular characterization of the cfb gene encoding group B streptococcal CAMP-factor. *Medical Microbiology and Immunology*, v.183, n.5, p.239-256, 1994.

POGERE, A. et al. Prevalência da colonização pelo estreptococo do grupo B em gestantes atendidas em ambulatório de pré-natal. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.27, n.4, p.174-180, 2005.

POYART, C. et al. Invasive group B streptococcal infections in infants, France. *Emerging Infectious Diseases*, v.14, n.10, p.:1647-1649, 2008.

PULVER, L.S. et al. Continued early onset group B streptococcal infections in the era of intrapartum prophylaxis. *Journal of Perinatology*, v.29, n.1, p.20-25, 2009.

RAJAGOPAL, L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiology*, v.4, n.2, p.201–221, 2009.

SAMADI R., STEK, A., GREENSPOON, J.S. Evaluation of a rapid optical immunoassay-based test for group B streptococcus colonization in intrapartumpatients. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v.10, n.3, p.203-208.

SCASSO, S. et al. Vaginal group B streptococcus status during intrapartum. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, v.129, n.1, p.9-12, 2015.

SCHAECHTER, M. et al. *Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SCHRAG, S. et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep*;51:1-22, 2002.

SCHRAG ,S.J.; VERANI, J.R. Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: Experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine. *Vaccine*, 31 Suppl 4:D20-26, 2013.

SCHUCHAT, A. et al. Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: a multicenter case-control study. *Pediatrics*, v.105, n.1, p.21-26, 2000.

SCHROEDER, E-A. et al. The economic costs of Group B Streptococcus (GBS) disease: prospective cohort study of infants with GBS disease in England. *The European Journal of Health Economics*, v.10, n.3, p.275-285, 2009.

SEALE, A.C. et al. Neonatal severe bacterial infection impairment estimates in South Asia, sub-Saharan Africa, and Latin America for 2010. *Pediatric Research*, v.74 Sup.1, p.73-85, 2013.

SILVEIRA, J.L.S. et al. Comparison of a PCR assay to culture standard method for the screening of Group B Streptococcus in pregnant women. *Boletim Científico de Pediatria*, v.3, n. 2, p.87-91, 2014.

SIMÕES, J.A et al. Phenotypical Characteristics of Group B Streptococcus in Parturients. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.11, n.2, p.261-266, 2007.

SLOTVED, H.C. Et al. Serotype IX, a proposed new Streptococcus agalactiae serotype. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, n.9, p.2929-2936, 2007.

STOLL, B.J. et al. Early Onset Neonatal Sepsis: The Burden of Group B Streptococcal and E. coli Disease Continues. *Pediatrics*, v.127, n.5, p. 817-826, 2011.

SURGERS, L. et al. Evolving microbiological epidemiology and high fetal mortality in 135 cases of bacteremia during pregnancy and postpartum. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v.32, n.1, p. 107-113, 2013.

TEIXEIRA, M.L.; DUARTE, R.S.; TRABULSI, L.R. Streptococcus agalactiae. p.195-199. In: TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio (Coord.). Microbiologia. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TURRENTINE, M.A. et al. Duration of Intrapartum Antibiotics for Group B Streptococcus on the Diagnosis of Clinical Neonatal Sepsis. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, v. 2013, Article ID 525878, 2013.

VACILOTO, E. et al. A survey of the incidence of neonatal sepsis by Group B Streptococcus during a decade in a Brazilian maternity hospital. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.6, n.2, p.55-62, 2002.

VAN DYKE, M.K. et al. Evaluation of Universal Antenatal Screening for Group B Streptococcus. *The New England Journal of Medicine*, v.360, n.25, p.2626-2636, 2009.

VERANI, J.R.; MCGEE, L.; SCHRAG, S.J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep*; 19;59(RR-10):1-36, 2010.

VIEIRA, A.J.; GARRETT, J.M. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Family Medicine*, v.37, n.5, p.360-363, 2005.

VINNEMEIER, C.D. et al. Group B Streptococci serotype distribution in pregnant women in Ghana: assessment of potential coverage through future vaccines. *Tropical Medicine and International Health*, v. 20, n.11, p. 1516-1524, 2015.

WANG, Y.H. et al. Clinical and microbiological characteristics of recurrent group B streptococcal infection among non-pregnant adults. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 26, p.140–145, 2014.

WANG, P. et al. Serotype distribution, antimicrobial resistance, and molecular characterization of invasive group B Streptococcus isolates recovered from Chinese neonates. *International Journal of Infectious Diseases*, v.37, p.115–118, 2015.

WERNECKE, M. et al. Evaluation of a novel real-time PCR test based on the *ssrA* gene for the identification of group B streptococci in vaginal swabs. *BMC Infectious Diseases*, v.9, p.148, 2009.

WHIDBEY, C. A hemolytic pigment of Group B Streptococcus allows bacterial penetration of human placenta. *The Journal of Experimental Medicine*, v.210, n.6, p.1265-1281, 2013.

WHIDBEY, C. et al. A streptococcal lipid toxin induces membrane permeabilization and pyroptosis leading to fetal injury. *EMBO Molecular Medicine*, v.7, n.4, p.488-505, 2015.

YEUNG, S.W. et al. Evaluation of an in-house real-time polymerase chain reaction method to identify group B streptococcus colonization in pregnancy. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, v.41, n.9, p.1357-1362, 2015.

YOON, I.A. et al. Clinical significance of serotype V among infants with invasive group B streptococcal infections in South Korea. *International Journal of Infectious Diseases*, v.38, p.136-140, 2015.

ZUSMAN, A.S.; BALTIMORE, R.S.; FONSECA, S.N.S. Prevalence of Maternal group B Streptococcal Colonization and Related Risk Factors in a Brazilian Population. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.10, n.4, p.242-246, 2006.