

Infeção Tardia por *Streptococcus* do Grupo B em Gémeos Associada a Leite Materno: Importância do Estudo Molecular

Late-Onset Infection by Group B *Streptococcus* in Twins Associated with Breast Milk: The Importance of Molecular Study

Raquel Azevedo Alves¹, Andreia Meireles¹, Mariana Martins¹, Maria José Espinar², Cláudia Ferraz³, Lia Rodrigues e Rodrigues³

Acta Pediatr Port 2018;49:265-9
DOI: 10.21069/APP.2018.12971

Resumo

O *Streptococcus* do grupo B é a principal causa de sépsis neonatal e meningite nos países desenvolvidos. A implementação do rastreio materno universal e a profilaxia antibiótica periparto levou a um declínio significativo da incidência de sépsis precoce, mantendo-se constante a incidência de sépsis tardia. A transmissão através do leite materno na infeção tardia por *Streptococcus* do grupo B tem sido descrita na literatura, contudo, o recurso a técnicas moleculares para confirmação não é sistematicamente realizado. Descrevemos um caso de infeção tardia por *Streptococcus* do grupo B em gémeos prematuros associada a ingestão de leite materno infetado. O primeiro gémeo foi re-internado aos 46 dias de vida por sépsis com meningite e o outro gémeo foi re-internado aos 50 dias de vida por sépsis. O estudo por amplificação ao acaso de DNA polimórfico - reação em cadeia da polimerase confirmou igualdade genotípica entre a estirpe isolada no leite materno e a identificada no líquido cefalorraquidiano do primeiro gémeo.

Palavras-chave: Aleitamento Materno; Infeções por *Streptococcus agalactiae*/diagnóstico; Leite Humano; Recém-Nascido; *Streptococcus agalactiae*; Técnica de Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico

Abstract

Group B *Streptococcus* is the leading cause of neonatal sepsis and meningitis in industrialised countries. Although the use of intrapartum antibiotic prophylaxis has led to a significant decline in early-onset sepsis, the incidence of late-onset sepsis remains unchanged. Transmission of group B *Streptococcus* through the ingestion of breast milk in late-onset sepsis has been reported in the literature, but confirmation by molecular techniques is not systematically performed.

The authors describe a case of late group B *Streptococcus* infection in twins associated with the ingestion of infected breast milk. The first twin was re-admitted at 46 days of life for sepsis with meningitis and the second twin was re-admitted at 50 days of life for sepsis. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction confirmed that the genotypes of group B *Streptococcus* isolated in breast milk and identified in the cerebrospinal fluid of the first twin were identical.

Keywords: Breast Feeding; Diseases in Twins; Milk,

Human; Infant, Newborn; Random Amplified Polymorphic DNA Technique; *Streptococcus agalactiae*; Streptococcal Infections/diagnosis

Introdução

O *Streptococcus* do grupo B (SGB) constitui um dos principais agentes patogénicos de infeção bacteriana perinatal.^{1,2} A infeção neonatal precoce (até ao sexto dia de vida) manifesta-se por sépsis, pneumonia e/ou meningite³ e ocorre por transmissão vertical, após a rutura de membranas placentárias ou durante a passagem pelo canal de parto.⁴ Após a implementação do rastreio universal pré-natal e instituição da quimioprofilaxia intraparto, a sua incidência diminuiu 40% em Portugal e 70% nos Estados Unidos da América (EUA), com uma incidência de 0,44 por 1000 nascimentos em Portugal e 0,31-0,34 por 1000 nascimentos nos EUA.^{1,5-7} A incidência da infeção tardia (dos sete aos 90 dias de vida) permaneceu constante, aproximadamente de 0,35 por 1000 nascimentos nos EUA, representando

1. Serviço de Pediatria, Hospital de Pedro Hispano, Matosinhos, Portugal

2. Departamento de Patologia Clínica, Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal

3. Serviço de Neonatologia, Hospital de Pedro Hispano, Matosinhos, Portugal

Correspondência

Raquel Azevedo Alves

raquelazevedoalves@gmail.com

Hospital Pedro Hispano, Rua Dr. Eduardo Torres, 4464-513 Senhora da Hora, Portugal

Recebido: 30/08/2017 | Aceite: 20/02/2018

atualmente a maioria das infeções neonatais por SGB, o que corrobora a conhecida ausência de proteção da quimioprofilaxia intraparto relativamente à infeção tardia.^{5,8,9} A infeção tardia por SGB pode apresentar-se sob a forma de bacteriemia, sépsis ou infeção focalizada.³ O modo de transmissão, assim como o período em que ocorre, permanece incerto.¹⁰ Pode ser adquirida por transmissão horizontal (contacto materno, hospitalar e comunidade) ou refletir uma infeção retardada após colonização inicial.^{4,9,11-13} O leite materno é outra fonte possível de infeção, embora menos frequente.^{4,11,13-17} Há, na literatura, relatos de casos de infeção tardia ou recorrente por SGB adquiridos por transmissão horizontal através do leite materno, embora a maioria careça de confirmação por métodos moleculares.^{4,12}

Caso Clínico

Antecedentes perinatais

Mulher de 36 anos, saudável, três gestações e três partos, com gestação gemelar espontânea bicoriónica, sem intercorrências até às 31 semanas, quando é internada por ameaça de parto pré-termo. Foi realizada tocólise e corticoterapia para maturação fetal e colheita de exsudado anal-vaginal para SGB, que se revelou positivo.

Às 35 semanas e seis dias ocorre parto eutócico espontâneo, com rutura de membranas periparto, tendo a mãe cumprido profilaxia antibiótica com ampicilina endovenosa, duas doses.

Os gémeos foram internados na unidade de cuidados intensivos neonatais para monitorização clínica por risco infeccioso e por baixo peso (primeiro gémeo 1618 g, segundo gémeo 1620 g). A evolução clínica foi favorável, tendo alta aos 19 dias de vida com aleitamento misto. Não foi efetuada antibioterapia.

Caso Clínico 1

O primeiro gémeo é observado ao 46º dia de vida no serviço de urgência por febre, recusa alimentar e prostração com 12 horas de evolução. No exame objetivo apresentava ar séptico, icterico, gemido persistente, hipoatividade e hipotonia com fontanela anterior preenchida e pulsátil. Realizou rastreio séptico completo (saída de líquido turvo) e iniciou antibioterapia com ampicilina e cefotaxima (doses meníngeas). Analiticamente apresentava proteína C reativa de 110,6 mg/L, leucopenia (1730 células/ μ L) com neutropenia (750 células/ μ L), plaquetas 334 000 células/ μ L, hemoglobina 9,5 g/dL, hematócrito 26,5%. O exame citoquímico do líquido cefalorraquidiano (LCR) revelou pleocitose (5780 células/ μ L com 95,3% de polimorfonucleares), diminui-

ção da glicorraquia (33% da glicemia) e proteinorraquia normal.

Nas primeiras 24 horas de internamento houve um agravamento clínico com instabilidade hemodinâmica, necessidade de volemização, suporte inotrópico, transfusão de plasma fresco congelado e glóbulos vermelhos. Foi isolado SGB na hemocultura e no LCR, sensível à antibioterapia instituída, tendo cumprido 21 dias de ampicilina e 10 dias de cefotaxima. Na data da alta apresentava exame neurológico e ecografia transfontanelar sem alterações.

Caso Clínico 2

O segundo gémeo, avaliado seriadamente desde admissão do irmão, foi internado quatro dias depois por recusa alimentar parcial associada a sonolência. No exame objetivo na admissão apresentava razoável estado geral, gemido intermitente agravado com a manipulação e hipoatividade. Sinais vitais estáveis com temperatura axilar 37,7°C. Analiticamente apresentava proteína C reativa 3,6 mg/L, leucócitos 8800 células/ μ L, neutrófilos 4664 células/ μ L, plaquetas 546 000 células/ μ L. Doze horas após a primeira determinação verificou-se aumento da proteína C reativa para 77,2 mg/L. Não foi possível obter líquido para estudo apesar de duas tentativas de punção lombar traumáticas. Foi isolado SGB na hemocultura.

Após o internamento do segundo gémeo a mãe iniciou febre associada a tensão mamária, tendo sido diagnosticada mastite puerperal e foi medicada com amoxicilina e ácido clavulânico oral, durante sete dias. A mãe referia episódio prévio de tensão mamária sem febre 15 dias após o nascimento dos gémeos.

Foi realizado exame microbiológico do leite materno com isolamento do SGB com o mesmo perfil de sensibilidade antimicrobiana ao isolado no LCR do primeiro gémeo e nas hemoculturas de ambos os gémeos.

Solicitou-se a realização de estudo molecular por amplificação ao acaso de DNA polimórfico - reação em cadeia da polimerase (RAPD-PCR) para esclarecer se as estirpes de SGB isoladas, nos filhos e na mãe, eram idênticas.^{4,18} A RAPD-PCR é uma ferramenta molecular rápida, eficaz e de baixo custo económico que permite analisar a variabilidade e diversidade genética de estirpes bacterianas.

O aleitamento materno foi suspenso não tendo sido reiniciado após tratamento por opção materna. A evolução clínica do segundo gémeo foi favorável. Cumpriu 21 dias de antibioterapia visto não ter sido possível excluir atingimento meníngeo. Na data da alta apresentava exame neurológico e ecografia transfontanelar sem alterações. As crianças mantêm seguimento em consulta externa apresentando evolução clínica e desenvolvimento psicomotor adequados, aos 2 anos de idade.

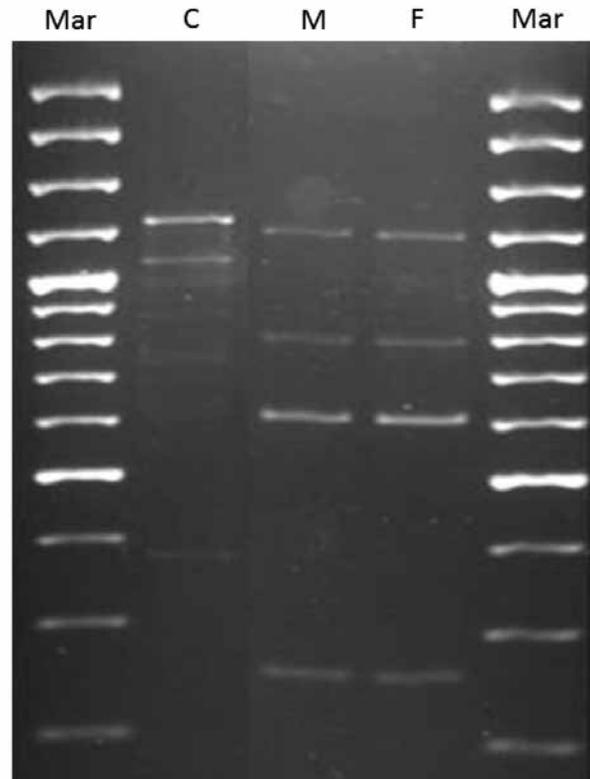
Discussão

O *Streptococcus* do grupo B é a causa mais frequente de doença invasiva neonatal, com uma taxa de mortalidade de 7,5%-11,8%.^{10,15} Em 25%-30% dos casos a expressão clínica é meningite, envolvendo o risco de sequelas neurológicas entre 25%-35% dos sobreviventes.^{3,10,15}

O esclarecimento do modo de transmissão do SGB na infeção tardia é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de prevenção eficazes.

A infeção tardia a SGB pode ser adquirida pela mãe, por transmissão vertical ou por transmissão horizontal.^{9,11} Aproximadamente 50% dos lactentes com infeção tardia são colonizados ao nascimento pelo mesmo serótipo de SGB da mãe.^{6,9} No caso clínico relatado, existe a hipótese de colonização perinatal por este agente, atendendo a que a mãe estava colonizada pelo SGB e o parto foi eutócico. No entanto, a mãe fez quimioprofilaxia intraparto completa (duas tomas de ampicilina endovenosa realizadas num período superior a quatro horas antes do parto) e a rutura de membranas foi periparto, o que torna teoricamente remota esta hipótese. A hipótese de transmissão nosocomial durante o internamento prévio na unidade de cuidados intensivos neonatais parece pouco consistente, atendendo a que não ocorreram outros casos durante o mesmo período. A infeção tardia consecutiva dos gémeos associada a mastite puerperal da mãe levantou a hipótese de infeção do leite materno como modo de transmissão.

Na literatura existem casos descritos de infeção tardia e/ou recorrente por SGB associada ao leite materno, com ou sem mastite, contudo o estudo molecular para comparar o SGB isolado no leite materno e no recém-nascido para confirmação desta associação, não é sistematicamente realizado.^{12,14,16,17} Foram analisados todos os casos de infeção neonatal tardia a SGB associado ao leite materno descritos na literatura, desde 1977 até 2013, tendo sido documentado 48 casos no total, 20 dos quais com estudo molecular realizado, nenhum em Portugal.¹⁷ No caso descrito, foram isoladas estirpes de SGB com o mesmo perfil de sensibilidade antimicrobiana nas três amostras do primeiro gémeo (LCR e duas hemoculturas), na hemocultura do segundo gémeo e no leite materno. A genotipagem por RAPD-PCR demonstrou que a estirpe de SGB isolado no leite materno era idêntica à isolada no LCR do primeiro gémeo (Fig. 1), o que evidenciou uma relação entre o leite materno infetado e a infeção tardia. Infelizmente quando foi solicitada esta técnica, as amostras das hemoculturas do primeiro e do segundo gémeo já tinham sido descartadas pelo laboratório de microbiologia, assim como exame bacteriológico do exsudado vaginal materno.



C - controlo positivo (*Streptococcus agalactiae*); F - filho; M - mãe; Mar - marcador de pesos moleculares (Nyzdna Ladder III, Nyztech[®]). A amplificação ao acaso de DNA polimórfico - reação em cadeia da polimerase baseia-se em iniciadores de sequências aleatórias curtas, geralmente de nove a 10 nucleótidos, e condições de reconhecimento de iniciadores de baixa rigidez para amplificar fragmentos arbitrários de DNA modelo. O DNA genómico das duas estirpes e da estirpe controlo foi extraído por extração fenólica e a sua concentração e qualidade foram avaliados por espetofotometria (Nanodrop[®]) e por visualização em gel de agarose (1%). Foi utilizada uma estirpe de *Streptococcus agalactiae* de um isolado clínico aleatório. A mistura para a realização de reação em cadeia da polimerase foi preparada de acordo com o procedimento descrito na NZYtaq 2x Green Master Mix (NZYTech[®]) contendo o oligo NP5. A amplificação ao acaso de DNA polimórfico - reação em cadeia da polimerase das estirpes e do controlo positivo foi realizado nas seguintes condições: primeiro programa (5 min a 94^o; 5 min a 35^o; 5 min a 72^o) e um segundo programa de 35 ciclos (30 s a 94^o; 1 min a 35^o; 1 min a 72^oC). O produto da amplificação ao acaso de DNA polimórfico - reação em cadeia da polimerase foi visualizado em gel de agarose 2% após eletroforese (70 V, duas horas).

Figura 1. Produtos da amplificação ao acaso de DNA polimórfico - reação em cadeia da polimerase (RAPD-PCR) das estirpes isoladas da mãe e do filho.

Na maioria dos casos descritos na literatura, não estavam presentes sinais de mastite, ocorrendo uma colonização silenciosa do ducto materno. Este facto pode justificar o sub-reconhecimento do leite materno como uma fonte de infeção.^{12,16,19} Kotiw *et al*¹⁶ descrevem um processo circular contínuo como hipótese desta patogénese, segundo o qual, o SGB coloniza inicialmente a mucosa orofaríngea do RN por infeção perinatal, infectando posteriormente os ductos maternos durante a amamentação, com proliferação deste agente. No entanto, Olver *et al*.¹⁹ descreveram casos de

infeção por SGB em prematuros alimentados com leite materno exclusivamente por sonda nasogástrica. Outra hipótese é descrita por Jeurink *et al.*²⁰, na qual algumas bactérias presentes no intestino materno atravessam o epitélio intestinal, atingindo a glândula mamária por via hematogénica, com posterior contaminação do leite materno. Os gémeos foram alimentados inicialmente por leite materno por sonda nasogástrica, posteriormente ao seio materno. Independentemente da patogénese do leite materno infetado, à medida que a concentração microbiana aumenta no leite, o lactente é re-infetado durante a amamentação.

Apesar da prematuridade ser um importante fator de risco para infeção tardia por SGB, a transmissão deste agente pelo leite materno tem sido descrita quer em prematuros quer em recém-nascidos de termo.^{6,8,10,13,15,17}

O exame bacteriológico do leite materno por rotina, antes do seu uso, não parece ter utilidade exceto se a mãe apresentar sinais de mastite.¹⁵

Nos casos de infeção tardia em recém-nascidos amamentados, o leite materno deve ser analisado e a amamentação deve ser suspensa até obtenção dos resultados das culturas.^{12,15} Se o leite materno estiver infetado com SGB, deve ser prescrita à mãe antibioterapia adequada.¹² Davanzo *et al.*¹⁵ recomendam ampicilina ou amoxicilina (7-10 dias) junto com rifampicina (4-7 dias) para erradicar a colonização materna, de forma a evitar a reinfeção. Posteriormente, o leite materno deve ser pasteurizado ou descartado até que o exame bacteriológico seja negativo, altura em que pode ser reiniciada a amamentação.^{12,13,15} No caso descrito, a mãe foi medicada com amoxicilina e ácido clavulânico (sete dias) e o aleitamento materno foi suspenso. Não foi realizado novo

exame bacteriológico do leite materno uma vez que a mãe decidiu suspender a amamentação. Davanzo *et al.*¹⁵ propõem também a associação de rifampicina (20 mg/kg/dia durante 4-7 dias) à antibioterapia habitual nos recém-nascidos com sepsis por SGB para erradicar a colonização deste; no entanto, no caso descrito ambos os gémeos realizaram apenas ampicilina e cefotaxima.

O QUE ESTE CASO ENSINA

- A transmissão do *Streptococcus* do grupo B através do leite materno é rara, mas deve ser considerada em casos de infeção neonatal tardia.
- A caracterização genotípica das estirpes de *Streptococcus* do grupo B com o recurso a técnicas de biologia molecular, como a amplificação ao acaso de DNA polimórfico - reação em cadeia da polimerase, constitui um importante avanço na compreensão da epidemiologia da infeção neonatal tardia.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse na realização do presente trabalho.

Fontes de Financiamento

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

Proteção de Pessoas e Animais

Os autores declaram que os procedimentos seguidos estavam de acordo com os regulamentos estabelecidos pelos responsáveis da Comissão de Investigação Clínica e Ética e de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial.

Confidencialidade dos Dados

Os autores declaram ter seguido os protocolos do seu centro de trabalho acerca da publicação dos dados de doentes.

Agradecimentos

À Dr.ª Isabel Miranda pela sua participação no estudo molecular realizado e à Dr.ª Alexandrina Portela pela sua ajuda na revisão crítica deste artigo.

Referências

1. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010;59:1-36.
2. Cohen-Wolkowicz M, Moran C, Benjamin DK, Cotton CM, Clark RH, Smith PB. Early and late onset sepsis in late preterm infants. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:1052-6.
3. Puopolo K, Baker C. Group B streptococcal infection in neonates and young infants [consultado em 31 de janeiro de 2017]. Disponível em: <https://www.uptodate.com>
4. Brandolini M, Corbella M, Cambieri P, Barbarani D, Sasseria D, Stronati M, et al. Late-onset neonatal group B streptococcal disease associated with breast milk transmission: Molecular typing using RAPD-PCR. *Early Human Develop* 2014;90:S84-6.
5. Ecker KL, Donohue PK, Kim KS, Shepard JA, Aucott SW. The impact of group B streptococcus prophylaxis on late-onset neonatal infections. *J Perinatol* 2012;33:206-11.

6. Lin FY, Weisman LE, Troendle J, Adams K. Prematurity is the major risk factor for late-onset group B Streptococcus disease. *J Infect Dis* 2003;188:267-71.
7. Neto MT. Group B streptococcal disease in Portuguese infants younger than 90 days. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93:F90-3.
8. Escolano Serrano S, Ruiz Alcántara I, Alfonso Diego J, González Muñoz A, Gastaldo Simeón E. Infección tardía por estreptococo grupo B en gemelos nacidos mediante cesárea. *An Pediat* 2015;82:e95-7.
9. Berardi A, Rossi C, Lugli L, Creti R, Bacchi Reggiani M, Lanari M, et al. Group B Streptococcus late-onset disease: 2003-2010. *Pediatrics* 2013;131:e361-8.
10. Elling R, Hufnagel M, Zoysa A, Lander F, Zumstein K, Krueger M, et al. Synchronous recurrence of group B streptococcal late-onset sepsis in twins. *Pediatrics* 2014;133:e1388-91.
11. Silva G, Marcos C, Lira S, Silva FP. Infeção recorrente neonatal

por estreptococo do grupo B. Acta Pediatr Port 2010;41:98-100.

12. Gagneur A, Héry-Arnaud G, Croyl-Labourdette S, Gremmo-Feger G, Vallet S, Sizun J, et al. Infected breast milk associated with late-onset and recurrent group B streptococcal infection in neonatal twins: A genetic analysis. Eur J Pediatr 2008;168:1155-8.

13. Byrne PA, Miller C, Justus K. Neonatal group B streptococcal infection related to breast milk. Breastfeed Med 2006;1:263-70.

14. Wang LY, Chen CT, Liu WH, Wang YH. Recurrent neonatal group B streptococcal disease associated with infected breast milk. Clin Pediatr 2007;46:547-49.

15. Davanzo R, De Cunto A, Travan L, Bacolla G, Creti R, Demarini S. To feed or not to feed? Case presentation and best practice guidance for human milk feeding and group B Streptococcus in developed countries. J Hum Lact 2013;29:452-7.

16. Kotiw M, Zhang GW, Daggard G, Reiss-Levy E, Tapsall JW, Numa A. Late-onset and recurrent neonatal group B streptococcal disease associated with breast-milk transmission. Pediatr Dev Pathol 2003;6:251-6.

17. Filleron A, Lombard F, Jacquot A, Jumas-Bilak E, Rodière M, Cambonie G, et al. Group B streptococci in milk and late neonatal infections: An analysis of cases in the literature. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2013;99:F41-7.

18. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 1990;18:7213-8.

19. Olver WJ, Bond DW, Boswell TC, Watkin SL. Neonatal group B streptococcal disease associated with infected breast milk. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2000;83:F48-9.

20. Jeurink PV, Bergenhenegouwen JV, Jiménez E, Knippels LM, Fernández L, Garssen J, et al. Human milk: A source of more life than we imagine. Benef Microbes 2013;4:17-30.