

Artigo

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* GRUPO B (SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

PHENOTYPIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* GROUP B (GBS) ISOLATED FROM PREGNANT WOMEN IN RIO DE JANEIRO

Nicolle Félix Lima Ramos¹

Beatriz Cordeiro Esteves da Silva²

Emanuele Maximiano Antunes de Araújo Teixeira³

Nicea Magaly Matias da Silva⁴

Marco Antonio Pereira Henrique⁵

Ivano de Filippis⁶

RESUMO – O *Streptococcus agalactiae* grupo B (SGB) é um patógeno oportunista que pode colonizar o trato gastrointestinal e geniturinário de forma assintomática. Estima-se que 15 a 40% das mulheres grávidas estejam colonizadas pelo SGB, que pode causar meningite, pneumonia, sepse e abortos. A linhagem hipervirulenta ST-17 é responsável por 80% a 95% de casos de SGB neonatal. O estudo teve o objetivo de identificar e caracterizar cepas de SGB isoladas de gestantes e pacientes e identificar a possível circulação de clones hipervirulentos por MLST e perfil de susceptibilidade aos

¹ Bióloga, aluna de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ;

² Biomédica, aluna de IC do Programa de Estágio Curricular – PEC, Instituto de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ;

³ Aluna de odontologia, aluna de IC do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC, Instituto de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ;

⁴ Bióloga, Microbiologista do Laboratório Neolab;

⁵ Biólogo, Gerente do Laboratório Neolab;

⁶ Doutor em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Coordenador de pesquisa do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ. E-mail: ivano.defilippis@incqs.fiocruz.br



Artigo

antimicrobianos. Foram analisadas 134 amostras isoladas de pacientes e gestantes do estado do Rio de Janeiro, cuja identidade foi confirmada por uma abordagem polifásica utilizando os métodos da qPCR-HRM, Maldi-Tof e CAMP. As cepas isoladas foram submetidas ao TSA por disco-difusão e CIM. Cento e treze cepas de SGB foram recuperadas a partir de 133 amostras clínicas recebidas no laboratório do INCQS/FIOCRUZ. As cepas foram isoladas de secreção vaginal, urina e swab reto-vaginal de gestantes ou pacientes com suspeita de infecção por SGB. A confirmação da identidade dessas cepas foi realizada por três métodos diferentes e nenhum deles foi suficiente para confirmar a espécie em todas as cepas testadas. De um modo geral, a qPCR-HRM apresentou resultados mais consistentes e confiáveis do que os outros dois métodos. A susceptibilidade aos antimicrobianos revelou um número considerável de cepas MDR, com uma alta resistência principalmente ao sulfametoxazol-trimetoprima (100%), tetraciclina (79%), eritromicina (36%) e azitromicina (32%) que representam três classes diferentes de antibióticos. Entre os antibióticos mais eficientes com menor taxa de resistência ($\leq 2\%$) estão os beta-lactâmicos (penicilina e ceftriaxona), linezolida, rifampicina e cloranfenicol o que apresenta uma possibilidade terapêutica importante. A análise genética pelo MLST trouxe dados importantes sobre a distribuição das cepas analisadas. Foram descritos 6 novos ST sendo três com perfil de MDR. Uma outra cepa também com perfil MDR foi classificada como ST-17. A identificação do SGB pelos métodos convencionais mostrou ser pouco acurada. A inclusão de mais um método molecular (qPCR-HRM) ou proteômico (MT) permitiria uma identificação mais precisa. No entanto, o alto custo inicial da aquisição de um equipamento de MT, dificulta o uso desse método. Em nosso estudo verificamos que a utilização do método convencional CAMP, aliado à qPCR-HRM, seria a melhor escolha custo-benefício para uma identificação mais acurada desse patógeno. Quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, os antibióticos beta-lactâmicos continua sendo a escolha terapêutica, no entanto há uma crescente resistência a outras classes de antibióticos, aliada à relação genética de cepas MDR com o clone hipervirulento ST-17 o que preocupa por sua associação à doença invasiva. A adaptação de cepas com esse perfil e a crescente resistência aos antimicrobianos, tornam o monitoramento dessas infecções imprescindível para a vigilância em saúde, e deve ser implementada em todos os hospitais públicos e privados.



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE GRUPO B (SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

DOI: [10.29327/213319.22.2-1](https://doi.org/10.29327/213319.22.2-1)

Páginas 6 a 30

Artigo

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae* (SGB); qPCR-HRM; MLST; Clone hipervirulento; Infecção neonatal.

ABSTRACT - Group B *Streptococcus agalactiae* (GBS) is an opportunistic pathogen that can colonize the gastrointestinal and genitourinary tracts asymptotically. An estimated 15 to 40% of pregnant women are colonized with GBS, which can cause meningitis, pneumonia, sepsis, and miscarriages. The ST-17 hypervirulent lineage is responsible for 80% to 95% of neonatal GBS cases. The study aimed to identify and characterize GBS strains isolated from pregnant women and patients and identify the possible circulation of hypervirulent clones by MLST and antimicrobial susceptibility profile. One hundred thirty-four samples isolated from patients and pregnant women in the state of Rio de Janeiro were analyzed, with identity confirmed by a polyphasic approach using qPCR-HRM, Maldi-Tof and CAMP methods. One hundred and thirteen strains of GBS were recovered from 133 clinical samples received at the INCQS/FIOCRUZ laboratory. The strains were isolated from vaginal secretions, urine and recto-vaginal swab of pregnant women or patients with suspected GBS infection. Confirmation of the identity of these strains was performed by three different methods and none of them was sufficient to confirm the species in all strains tested. Overall, qPCR-HRM showed more consistent and reliable results than the other two methods. Antimicrobial susceptibility revealed a considerable number of MDR strains, with a high resistance mainly to trimethoprim-sulfamethoxazole (100%), tetracycline (79%), erythromycin (36%) and azithromycin (32%) representing three different classes of antibiotics. Among the most efficient antibiotics with the lowest resistance rate ($\leq 2\%$) are beta-lactams (penicillin and ceftriaxone), linezolid, rifampicin, and chloramphenicol, which presents an important therapeutic possibility. Genetic analysis by MLST provided important data on the distribution of the analyzed strains. Six new STs were described, three with an MDR profile. Another strain also with an MDR profile was classified as ST-17. The identification of GBS by conventional methods proved to be inaccurate. The inclusion of one more molecular (qPCR-HRM) or proteomic (MT) method would allow a more precise identification. However, the high initial cost of acquiring MT equipment makes it difficult to use this method. In our study, we found that the use of the conventional CAMP method, combined with qPCR-HRM, would be the best cost-effective choice for a more accurate identification of this



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE GRUPO B (SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

DOI: 10.29327/213319.22.2-1

Páginas 6 a 30

Artigo

pathogen. Regarding antimicrobial susceptibility, beta-lactam antibiotics continue to be the therapeutic choice, however there is a growing resistance to other classes of antibiotics, allied to the genetic relationship of MDR strains with the hypervirulent clone ST-17, which is a cause for concern due to its association with invasive disease. Strains fitness with this profile and the increasing resistance to antimicrobials make the monitoring of these infections essential for health surveillance, and should be implemented in all public and private hospitals.

Keywords: *Streptococcus agalactiae* (GBS); qPCR-HRM; MLST; Hypervirulent clones; Neonatal infection.

INTRODUÇÃO

A partir de 1970, o SGB foi reconhecido como a principal causa infecciosa de doença neonatal precoce nos Estados Unidos e Europa Ocidental com taxas de mortalidade nos recém-nascidos de 15 a 50%. Trata-se de um patógeno oportunista que coloniza o trato gastrointestinal e geniturinário de adultos saudáveis e também está presente como parte normal da microbiota genital feminina, podendo ser transmitido por contato direto, via fecal-oral ou verticalmente. Cerca de 15-40% das gestantes são colonizadas por SGB na vagina e/ou no ânus sendo essa colonização transitória, crônica ou intermitente. Entretanto a grande relevância clínica está na contaminação de neonatos, ocasionando graves quadros de septicemia, pneumonia e meningite, além de ocorrência de partos prematuros e abortos (ALVES, 2018; CHEN, 2019; MATSUBARA; YAMAMOTO, 2009).

Os isolados de SGB apresentam um polissacarídeo capsular rico em ácido siálico, conhecido como um importante fator de virulência, que auxilia o microrganismo a escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Os sorotipos capsulares são classificados com base no polissacarídeo capsular específico, sendo estes antigenicamente e estruturalmente únicos, e contendo virulência variável, são eles: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX. A variabilidade sorológica capsular está relacionada com a organização de quatro compostos fundamentais, como: Glucose, Galactose, N-Acetil-glucosamina e Ácido Neuro- Acetil-Neuramínico (Ácido Siálico) que fazem



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE GRUPO B (SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

DOI: 10.29327/213319.22.2-1

Páginas 6 a 30

Artigo

parte da cápsula do microrganismo (ALVES, 2018; CIESLEWICZ et al., 2005; GOSIEWSKI; BRZYCHCZYWŁOCH; HECZKO, 2012; IMPERI et al., 2009).

Nos Estados Unidos, Europa e Austrália os sorotipos Ia, II, III e V têm representado 80 a 90% das estirpes de SGB. Em 2014, Morozumi e colaboradores analisaram isolados oriundos de neonatos no Japão, onde foram encontrados os sorotipos III, Ia e Ib como os mais prevalentes. Já em estudos realizados na África do Sul descreveram maior prevalência dos sorotipos Ia e III. Um estudo realizado por Pinto e colaboradores em 2013 nas regiões do sul e sudeste do Brasil houve uma prevalência dos sorotipos Ia e III. No estudo de Dutra e colaboradores em 2014 em diversas regiões do país, contendo o total de 434 isolados provenientes de amostras invasivas detectaram os sorotipos Ia e II como os mais predominantes no geral. Os sorotipos Ia e II foram os mais frequentes nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, enquanto os sorotipos Ib e V foram os mais comuns nas regiões Norte e Nordeste (ALVES, 2018; DUTRA et al, 2014; GHERARDI et al, 2007; KONG et al, 2008; MARTINS et al, 2007; MOROZUMI, 2014; PINTO et al, 2013).

Na maioria dos diagnósticos em gestantes, esse microrganismo atua de forma assintomática no trato genital e gastrointestinal, porém em casos mais graves pode provocar infecções no trato urinário, amnionite, endometrite, entre outras complicações. O SGB apresenta dois tipos de manifestação clínica padrão em neonatos, sendo elas, doença de início precoce e doença de início tardio (ALVES, 2018; SILVA et al, 2019).

- Doença de início precoce (*early-onset disease* - EOD): Ocorre geralmente por transmissão vertical da bactéria, da mãe para o feto, adquirida por via intra-amniótica ou pelo canal do parto. Os sintomas manifestam-se geralmente na primeira semana de vida, sendo aproximadamente 80% dos casos nas primeiras horas de vida do bebê. É caracterizada por sepse, desconforto respiratório, apneia, pneumonia e meningite. Um estudo realizado nos EUA analisou que os sorotipos Ia, III e V foram responsáveis por 78 a 87% da doença invasiva de início precoce nos recém-nascidos (BEITUNE et al, 2005; MARTINS et al, 2007; SHET AND FERRIERI, 2004; SILVA et al, 2019).
- Doença de início tardio (*late-onset disease* - LOD): Manifesta-se entre o sétimo e nonagésimo dia após o parto. A transmissão pode ocorrer de forma horizontal, vertical ou nosocomial, sendo 50% dos casos associados a infecção hospitalar. A meningite é a principal ocorrência. Assim como na doença de início precoce, a doença de início tardio também apresenta os sorotipos Ia, Ib, II, III e V como



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE GRUPO B (SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

DOI: 10.29327/213319.22.2-1

Páginas 6 a 30

Artigo

prevalentes (AFSHAR et al, 2011; MARTINS et al, 2007; SHET AND FERRIERI, 2004; SILVA et al, 2019).

A partir dos estudos já descritos, foi observado que diversos sorotipos estão envolvidos em doença perinatal, assim como em adultos. Com isso a produção de vacinas multivalentes tornaram-se o objetivo principal de diversos grupos de pesquisa. Em 2016 foram realizados testes clínicos com vacinas trivalentes, contendo os sorotipos Ia, Ib e III, no entanto, há diferenças na prevalência dos sorotipos, variando de acordo com a região estudada. Pesquisas realizadas no Brasil, relataram a maior frequência dos sorotipos Ia, II, III e IV, em diferentes estados, tornando inviável a cobertura só dos sorotipos Ia, Ib e III. Logo, torna-se extremamente importante mais estudos sobre a prevalência dos sorotipos circulantes nas diferentes regiões do Brasil, com o objetivo de proteger a população dos sorotipos circulantes (ALVES, 2018; DUTRA et al., 2014; HEYDERMAN et al., 2016; LEROUX-ROELS et al., 2016).

Com relação a tratamento, estudos demonstram que a Penicilina é o antibacteriano mais apropriado, nos casos de gestantes alérgicas ao medicamento, é indicado o uso de Clindamicina ou Eritromicina. O SGB tem sido continuamente sensível à Penicilina e outros β -lactâmicos. Em contrapartida, antimicrobianos usados como terapia alternativa, especialmente Macrolídeos, Lincosamidas, Fluoroquinolonas e Tetraciclina foram documentados como resistentes em diferentes países (CDC, 2000; CHEN, 2019; DUARTE et al. 2005, FILHO et al, 2008; PINHEIRO et al. 2009; SILVA, 2018).

Isolados de SGB têm apresentado resistência à Clindamicina e Eritromicina, onde um dos principais mecanismos de resistência é a presença do gene *mef* (macrolide efflux), conferindo resistência a Eritromicina e o gene *erm* (erythromycin ribosome methylase), conferindo resistência aos Macrolídeos. Essa resistência pode ocorrer de forma induzida ou constitutivamente expressa, atribuindo um fenótipo associado à resistência cruzada aos Macrólidos, Lincosamidas e Estreptograminas B (MLSB) (AZAVEDO et al., 2001; LECLERCQ, 2002; MARIMÓN et al., 2005; NASCIMENTO, 2019; PINTO, et al, 2013).

Para a caracterização molecular de SGB a metodologia MLST tem sido bastante utilizada, com o objetivo de permitir a definição das estruturas populacionais através da identificação de linhagens genéticas. É um método de tipagem que envolve o sequenciamento de fragmentos com aproximadamente 500 pb de sete genes constitutivos, sendo eles: *álcool desidrogenase (adhP)*, *fenilalanil tRNA sintetase*



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE GRUPO B (SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

DOI: 10.29327/213319.22.2-1

Páginas 6 a 30

Artigo

(*pheS*), aminoácido transportador (*atr*), glutamina sintetase (*glnA*), serina desidratase (*sdhA*), glicose kinase (*glcK*) e transketolase (*tkt*). A tipagem por MLST permite uma resposta concreta para estudos epidemiológicos, a partir de caracterização das estirpes de SGB promovendo uma pesquisa mais profunda sobre a biologia populacional deste microrganismo, além de se destacar como método padrão para a identificação da estrutura clonal das populações de SGB (DIEDRICK et al, 2010; LIN et al, 2006; JONES et al, 2003; MELLES et al, 2007; SILVESTRE, 2013).

O banco de dados utilizado para a submissão de alelos e designação de *sequence type* (ST) está disponível em <https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-agalactiae>. Trata-se de um banco de dados curado, desenvolvido pelo grupo de pesquisa do John Radcliffe Hospital, Oxford, UK. Atualmente estão depositadas 12.124 linhagens, com 300.337 alelos e 10.178 genomas, provenientes de diversos países dos 5 continentes e um total de 1867 ST (última atualização em 17/11/2021). O banco, no entanto, ainda não classifica os grupamentos de cepas com 4 ou mais alelos iguais em complexos clonais (CC). Essa classificação vem sendo adotada por grupos de pesquisa em todo o mundo para facilitar os estudos epidemiológicos. Nesses estudos, *o aumento da prevalência de infecção invasiva neonatal estudada a partir de 1960 foi fortemente associada à linhagem hipervirulenta CC17*, sendo responsável por 80% a 95% de casos de meningite induzida por SGB neonatal em doença de início precoce e doença de início tardio, a maioria composta por estirpes do sorotipo III (BELLAIS et al, 2012, LAMY et al, 2006; SILVESTRE, 2013).

O presente estudo tem o objetivo de (a) identificar e classificar cepas de SGB isoladas de gestantes, confirmando a identificação de SGB isolados de swab reto-vaginal de gestantes por qPCR-HRM, (b) determinar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos beta-lactâmicos, macrolídeos e quinolonas e (c) determinar os ST circulantes pela análise de MLST.

MÉTODOS

Seleção das amostras controle

A amostra controle utilizada no estudo foi o *Streptococcus agalactiae* INCQS 00128 (ATCC 13813). A amostra faz parte da Coleção de Bactérias de Referência em



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE GRUPO B (SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

DOI: 10.29327/213319.22.2-1

Páginas 6 a 30

Artigo

Vigilância Sanitária - CBRVS do INCQS/FIOCRUZ onde está preservada por liofilização em ampolas de vidro seladas à vácuo. A ampola foi reconstituída com 0,5 ml de TSB (Caldo Tripticaseína Soja) e semeada em meio Ágar Sangue com 5% de sangue de Equino (AS).

Amostras clínicas

Foram recebidas 133 amostras de urina, secreção vaginal ou reto-vaginal colhidas para pesquisa de SGB isoladas no Rio de Janeiro no período de 2018 a 2021 oriundas de projeto de pesquisa em colaboração com o Laboratório NeoLab de análises clínicas que realiza monitoramento de colonização por SGB em gestantes em alguns bairros do Rio de Janeiro e utiliza testes de identificação fenotípicas por provas bioquímicas convencionais para identificar as amostras como SGB. As amostras recebidas foram semeadas em meio de ágar-sangue composto por uma base de ágar Columbia adicionada de 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Após confirmação da identidade as cepas foram preservadas por dois métodos diferentes, congelamento profundo em criotubo com caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 20% de glicerol a -70°C e liofilização. As ampolas liofilizadas são preservadas em freezer comum a -15°C. As cepas confirmadas foram catalogadas e incorporadas à Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária (CBRVS) do INCQS/FIOCRUZ.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número 3.409.306.

Confirmação da espécie *S. agalactiae*

Para a confirmação da espécie, foi realizada qPCR-HRM (PCR em Tempo Real com etapa de *High Resolution Melting* – HRM) com alvo em genes exclusivos do SGB. Para a PCR, foi coletada uma colônia do crescimento bacteriano em meio de AS para extração e purificação do DNA genômico utilizando o protocolo para Gram positivos do kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico extraído foi estocado a -20°C para posterior utilização. Para a amplificação por qPCR-HRM, foi utilizado o Master Mix MeltDoctor HRM (Applied Biosystems), otimizado para HRM. Esse reagente contém um agente fluorescente intercalante de DNA que emite fluorescência quando ligado a DNA de fita



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE GRUPO B (SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

DOI: 10.29327/213319.22.2-1

Páginas 6 a 30

Artigo

dupla. A reação foi realizada com 1X MeltDoctor, 5 μ M de cada iniciador, 20 ng/ μ L de DNA genômico da amostra e água para PCR para um volume total de 10 μ L. As condições da reação foram: 1 ciclo a 95°C por 5' e 40 cycles a 95°C por 15", 60°C por 1' e 72°C por 10". A etapa de HRM para a curva de dissociação onde as fitas de DNA são abertas para a leitura da fluorescência e determinação da Temperatura de Melting (T_m), foi realizada imediatamente após os ciclos da PCR de acordo com as instruções do termociclador utilizado, sendo ele o QuantStudio 7 (Applied Biosystems). Controles negativos da reação sem DNA genômico foram introduzidos. A análise por HRM é um teste realizado após a amplificação convencional pela PCR, onde a região amplificada é submetida a um aumento da temperatura para abertura das fitas do DNA, e esfriamento gradual com retorno para fita dupla quando então a T_m é detectada. Para cada sequência de nucleotídeos há uma T_m específica, portanto sequencias de genes diferentes irão apresentar T_m diversa.

A confirmação da espécie foi obtida utilizando como alvos, os genes conservados e exclusivos do SGB: *dltA* que codifica a proteína carreadora *D-alanine-D-alanyl-ligase* envolvida na esterificação dos ácidos lipoteicoicos da membrana e o gene *sip*, que codifica a síntese da proteína de superfície Sip. Os iniciadores utilizados para a amplificação dos dois genes foram: *dltA* (5'-TTGACAGGTCTCTATGATTTAGTC-3') e *dltRA* (5'-GTCTGGTTCTCAGCCTAATTC-3') descritos por Lamy et al, 2006 e *sip* (5'-ATCCTGAGACAACACTGACA-3') e (5'-TTGCTGGTGTTCATTTTCA-3') descritos por BERGSENG et al., 2007. A mistura da PCR foi composta de 1X HOT FIREPol® EvaGreen® HRM MIX PCR (SOLIS Biodyne); 50 pmol de cada iniciador; aproximadamente 10 ng de DNA molde e água para PCR Gibco® completando o volume. As reações foram realizadas no termociclador *QuantStudio 7* (Applied Biosystem) com etapa de HRM no final da amplificação.

Algumas amostras não identificadas como SGB na qPCR-HRM com alvo *dltA*, foram submetidas ao teste CAMP (*Christie, Atkins, Munch-Petersen*), que consiste na detecção da produção do fator CAMP, uma proteína extracelular produzida pelo SGB que atua sinergicamente com a β -hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus* produzindo hemólise no meio ágar sangue. Resumidamente, uma amostra controle de *Staphylococcus aureus* foi semeada de um ponto a outro em uma placa de ágar sangue. Em seguida, perpendicularmente foi semeada a amostra de SGB para confirmação, sem contato com a estria de *S. aureus*. As placas foram incubadas por 48 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O resultado foi interpretado como positivo para o SGB quando



Artigo

houve formação de hemólise em forma de “seta” ou “meia-lua” convergindo para o *S. aureus* na intersecção do crescimento das duas bactérias.

Foi observado um número considerável de amostras previamente identificadas como SGB pelo Neolab, mas que não foram confirmadas pela amplificação do gene *dltA* descrito por Lamy e cols. em 2006 o que poderia sugerir ausência do gene em algumas amostras. Passamos então a utilizar como alvo o gene *sip* descrito por Bergseng e cols. em 2007 em um estudo onde afirma que esse alvo proporcionou um método altamente sensível e específico para detecção do SGB por qPCR. Todas as cepas previamente identificadas e submetidas à confirmação por PCR do gene *dltA* e pelo teste de CAMP, foram então testadas com esse novo gene. Mesmo com essa mudança de alvo, algumas amostras clínicas não foram confirmadas pela qPCR-HRM. Assim, 15 cepas foram submetidas à identificação proteômica por Maldi-Tof (MT) no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica da UFRJ.

Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos

As cepas confirmadas como SGB foram avaliadas quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos. Resumidamente, obtivemos uma suspensão bacteriana com concentração celular correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Após homogeneização da suspensão são inoculadas placas de Mueller-Hinton com 5% de sangue de carneiro hemolisado por espalhamento com swab. A determinação da susceptibilidade aos antibióticos foi realizada por disco difusão e a CIM foi confirmada com fitas de gradientes de concentração tipo E-test. No teste de disco difusão foram utilizados discos de papel-filtro contendo os antibióticos em concentrações fixas (Oxoid). O antibiograma foi realizado em placas de Mueller-Hinton com 5% de sangue de carneiro hemolisado. As placas de 150mm e 90mm, comportam 12 e 6 discos respectivamente e foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os diâmetros dos halos inibitórios de cada disco foram medidos com o uso do paquímetro.

A interpretação do resultado do antibiograma foi analisada a partir do manual do EUCAST e as cepas foram categorizadas em sensíveis, resistentes ou intermediárias. Todos as linhagens foram também testadas quanto à avaliação da resistência à Clindamicina induzida pela Eritromicina, utilizando dois discos dos antibióticos aplicados a aproximadamente 12mm de distância. O achatamento do halo de Clindamicina indica a resistência induzida à Clindamicina.



Artigo

Na confirmação da susceptibilidade pelo teste de CIM a preparação do inóculo é realizada da mesma forma que no teste de disco difusão. Utilizando placas de 150 mm e 90 mm, porém adicionando 6 e 3 tiras respectivamente (Oxoid). As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A leitura da CIM pelo halo inibitório é medida pela própria fita.

Multi Locus Sequence Typing (MLST)

A tipificação pelo MLST consiste no sequenciamento dos fragmentos internos de sete genes constitutivos (*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK* e *tkl*). O protocolo para o sequenciamento dos genes está descrito no banco de dados do MLST de *Streptococcus agalactiae*, disponível em (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-agalactiae>). As sequências obtidas foram submetidas ao banco de dados incluindo os dados dos isolados para a obtenção dos tipos sequenciais (ST).

RESULTADOS

Identificação polifásica

Cento e treze amostras clínicas foram testadas por qPCR-HRM com alvo *dltR* e dessas, apenas 24 (21,2%) foram confirmadas como SGB. A amplificação com o alvo *siP* resultou em 106 amostras clínicas confirmadas como SGB de um total de 108 (98%) testadas por qPCR-HRM. Com esse resultado o gene alvo *siP* mostrou uma especificidade e sensibilidade muito superior quando comparado ao *dltR*. A determinação da T_m pela qPCR-HRM tendo como alvo os genes *dltR* e *siP* foi confirmada como 73,2°C e 77,6°C respectivamente. A faixa de variação da T_m para cada alvo foi de ± 0,5°C. A cepa de *Streptococcus agalactiae* INCQS 00128 (ATCC 13813) foi utilizada como referência.

Doze amostras clínicas confirmadas por qPCR-HRM com alvo *dltR*, foram submetidas ao teste CAMP no LMR e 5 apresentaram resultado positivo.

Todas as cepas, apesar de morfologia compatível com SGB, apresentaram resultado negativo pela qPCR-HRM do gene *dltR*. As cepas foram então avaliadas pela qPCR-HRM do gene *siP* e dessas, 11 foram positivas. Os métodos utilizados foram o



Artigo

tradicional fenotípico fator CAMP, o método de análise proteômica Maldi-Tof (MT) e a qPCR-HRM. A cepa de referência INCQS 00128 (ATCC 13813) foi também avaliada apresentando resultado positivo pelos três métodos.

Todas as amostras recebidas do Laboratório Neolab são previamente classificadas como SGB por provas bioquímicas (bile-esculina) e teste CAMP, portanto todas apresentaram resultado positivo para o teste de CAMP. Das 14 amostras avaliadas por MT (incluindo a cepa de referência), 9 (64,3%) apresentaram resultado positivo para todos os métodos. Na comparação da qPCR-HRM com o MT, 10 (71,4%) foram positivas para os dois métodos. Mesmo resultado foi obtido comparando apenas a qPCR-HRM com o CAMP. Comparando o CAMP com o MT, 11 (78,6%) foram confirmadas como positivas para os dois métodos.

Na comparação dos três métodos com resultados negativos, não tivemos concordância entre os três ao mesmo tempo ou qPCR-HRM + MT e MT + CAMP. Na comparação da qPCR-HRM com o CAMP, apenas uma amostra apresentou resultado negativo pelos dois métodos. Uma cepa identificada como *E. faecalis* pelo MT, foi positiva tanto pelo CAMP quanto pela qPCR-HRM. Resumindo, o método da qPCR-HRM confirmou 71,4% das cepas positivas por MT e pelo CAMP. O método de MT confirmou 100% das cepas positivas pelo CAMP, mas uma cepa negativa pelo MT, foi positiva pelo CAMP, e uma cepa negativa pela qPCR-HRM, foi positiva pelo CAMP. Três amostras negativas para pelo menos um dos métodos, foram submetidas ao *sequenciamento* do gene do RNA ribossomal *16S* e as três foram identificadas como *S. agalactiae*.

Os resultados mostraram que a identificação dessa espécie ainda é difícil e dependendo do método utilizado pode-se obter resultados conflitantes.

Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Os isolados identificados como SGB foram submetidos ao TSA com as seguintes classes de antimicrobianos: beta-lactâmicos (penicilina e ceftriaxona), macrolídeos (eritromicina e azitromicina), tetraciclina, lincosamida (clindamicina), quinolonas (levofloxacina), cloranfenicol, linezolida, rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprima.

Foi determinada a susceptibilidade das cepas de SGB aos antimicrobianos por disco difusão. Entre os antimicrobianos testados, o que apresentou menor eficácia com



Artigo

maior número de amostras resistentes, foi o sulfametoxazol-trimetoprima com 100% das amostras testadas resistentes. Em seguida foi a tetraciclina com 83%, eritromicina com 36%, azitromicina com 32%, clindamicina com 26% e a levofloxacina com 12,8%.

As amostras consideradas resistentes foram submetidas à determinação da CIM. Foram obtidos os seguintes resultados: tetraciclina (TET): 24 amostras avaliadas com 83% resistentes e 95% confirmadas pela CIM; eritromicina (ERI): 47 amostras avaliadas com 36% resistentes e 94% confirmadas pela CIM; clindamicina (CLI): 42 amostras avaliadas com 26% resistentes e 54,5% confirmadas pela CIM; penicilina (PEN): 45 amostras avaliadas com 4,4% resistentes por disco difusão e 100% foram confirmadas pela CIM. levofloxacina (LEV): 39 amostras avaliadas com 12,8% resistentes e dessas apenas uma foi confirmada pela CIM; cloranfenicol (CLO): 47 amostras avaliadas com apenas uma (2,1%) resistente. Essa amostra não foi avaliada pela CIM; azitromicina (AZI): 47 amostras avaliadas com 32% resistentes e 20% confirmadas pela CIM; ceftriaxona (CTX): 47 amostras avaliadas com 100% sensíveis; linezolida (LNZ): 47 amostras avaliadas com apenas uma (2,1%) resistente. Essa amostra não foi testada pela CIM; rifampicina (RIF): 47 amostras avaliadas com 100% sensíveis; sulfametoxazol-trimetoprima (SXT): apenas seis amostras foram avaliadas e todas foram resistentes. Essas amostras não foram avaliadas quanto à CIM.

Por conta do período de pandemia devido a Covid19, a realização dos testes de DD e CIM foi limitada, portanto os antimicrobianos SXT, CLO, LNZ não foram avaliados de acordo com a CIM. Valorizamos o resultado do teste CIM em relação a Penicilina, considerando uso do antimicrobiano importante no tratamento de SGB. Sete amostras classificadas como resistentes à eritromicina e sensíveis à clindamicina, foram avaliadas quanto à resistência induzida à clindamicina pelo teste D. Nenhuma amostra apresentou resistência induzida à clindamicina. Um total de 11 amostras apresentou perfil multidroga resistente (MDR) sendo 6 resistentes a 3 classes de antimicrobianos e 5 resistentes a 4 classes de antimicrobianos do total de 8 classes de antimicrobianos testados contra os isolados de SGB.

Tipificação pelo MLST

As 11 cepas com perfil MDR foram submetidas à tipificação por MLST. Foram descritos 6 novos ST (ST-1872, ST-1873, ST-1874, ST-1875, ST-1876 e ST-1877) que foram depositados no banco de MLST de *S. agalactiae*



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE GRUPO B (SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

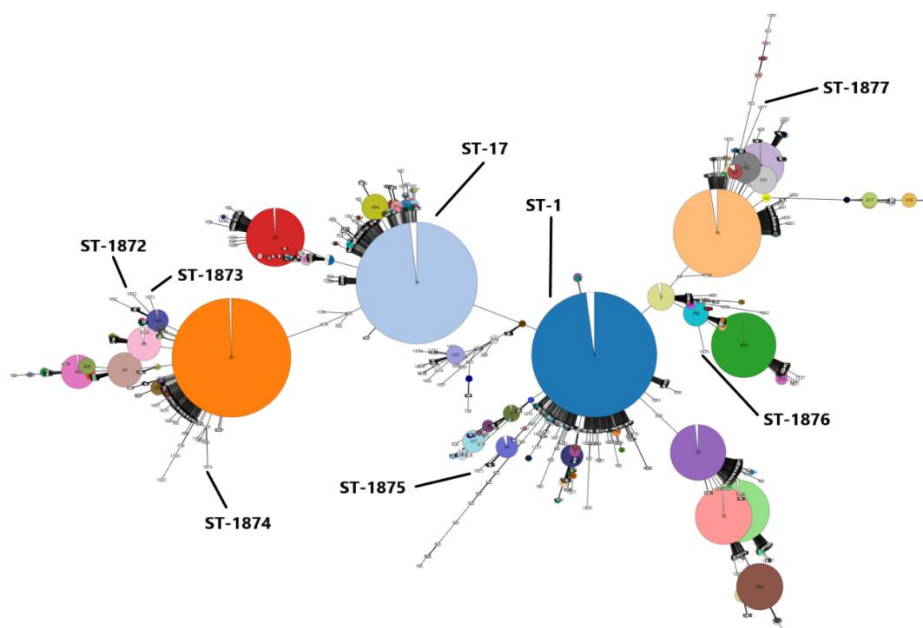
DOI: 10.29327/213319.22.2-1

Páginas 6 a 30

Artigo

(<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-agalactiae>). Uma cepa foi classificada como ST-17 já descrito e considerado um clone hipervirulento frequentemente associado à doença de início tardio e sepse em neonatos. Outras 4 cepas não foram classificadas em ST pois não obtivemos uma sequência de boa qualidade para alguns genes o que impediu completar o perfil do MLST. Das sete cepas classificadas em ST, quatro, ST-17, ST-1872, ST-1873 e ST-1874 apresentaram perfil MDR. A análise dos ST por Minimum Spanning Tree (MST) na figura 1, mostra as relações filogenéticas de todos os ST depositados no banco de MLST no mundo e a alocação do ST-1, e ST-17 considerados mais virulentos, e dos outros ST descritos nesse estudo (MANNING *et al.*, 2009; LAMY *et al.*, 2006; LARTIGUE *et al.*, 2011).

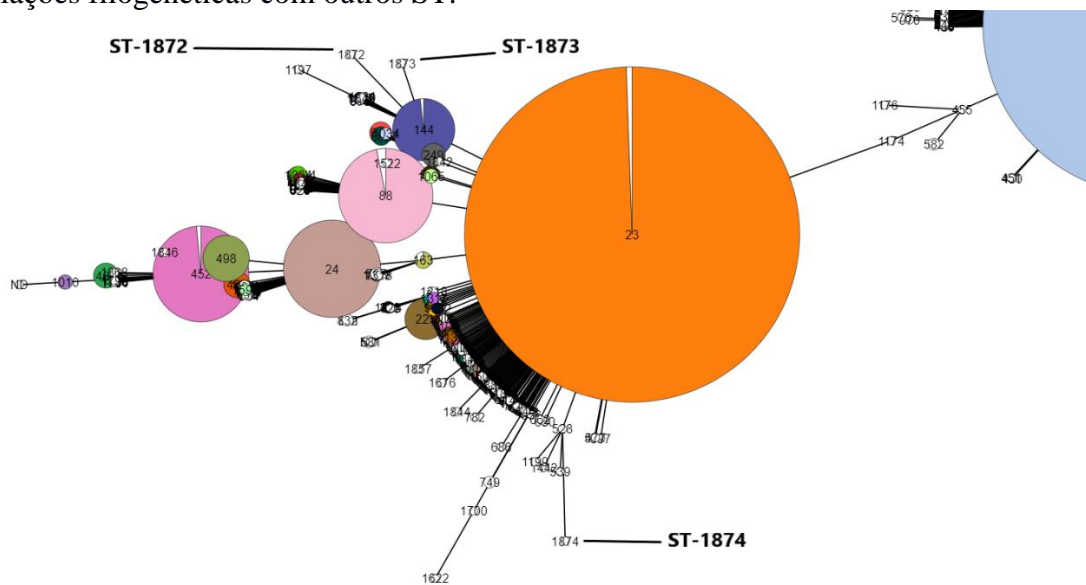
Figura 1. Minimum Spanning Tree (MST) de todas as cepas de SGB (12.180 isolados de todos os países do mundo) depositadas no banco de dados de MLST (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-agalactiae>). Os ST descritos em nosso estudo e o ST-1 estão em destaque mostrando a alocação dos mesmos e suas relações filogenéticas com outros ST.



Artigo

A figura 2 mostra em detalhe como estão alocados os quatro ST que apresentaram perfil MDR, ST-17, ST1872, ST-1873 e ST-1874.

Figura 2. MST com destaque no agrupamento formado pelas três cepas MDR e suas relações filogenéticas com outros ST.

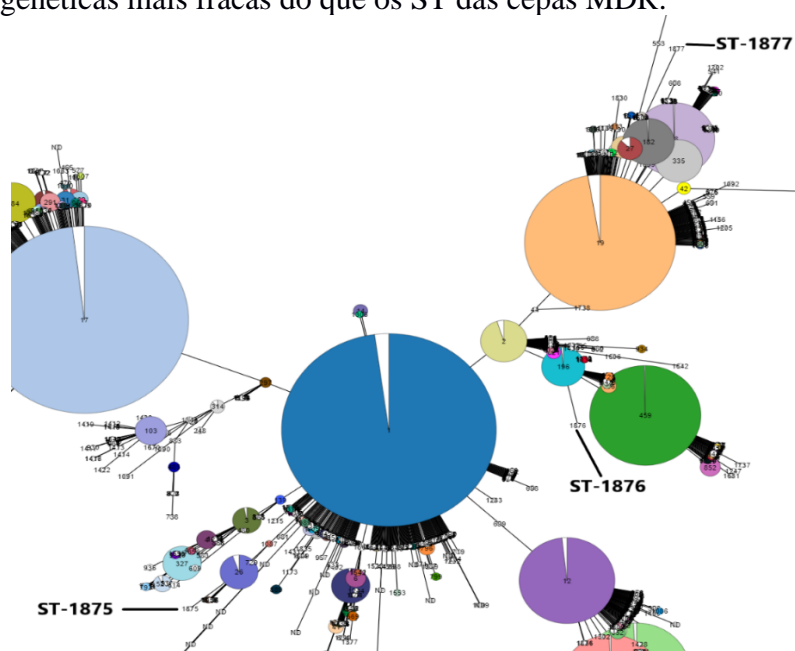


A figura 3 destaca como estão alocados os outros ST que não foram classificados como MDR (ST-1875, ST-1876 e ST-1877).



Artigo

Figura 3. MST com destaque no agrupamento formado pelas três cepas não-MDR e suas relações filogenéticas com outros ST. É importante notar que esses ST possuem relações filogenéticas mais fracas do que os ST das cepas MDR.



DISCUSSÃO

As infecções causadas por SGB podem causar abortos em gestantes ou acometer os neonatos ocasionando quadros graves de septicemia e meningite. O diagnóstico rápido e acurado do agente etiológico é imprescindível para um prognóstico favorável.

O estudo aqui apresentado utilizou uma abordagem polifásica para avaliar as relações filogenéticas, de patogenicidade e resistência aos antimicrobianos de 113 cepas de SGB recuperadas de 133 amostras clínicas recebidas no laboratório do INCQS/FIOCRUZ. As cepas foram isoladas de secreção vaginal, urina e swab reto-vaginal de gestantes ou pacientes com suspeita de infecção por SGB. A confirmação da identidade dessas cepas foi realizada por três métodos diferentes e nenhum deles foi



Artigo

suficiente para confirmar a espécie em todas as cepas testadas. Tanto a qPCR-HRM, quanto o MT e o CAMP apresentaram alguns resultados conflitantes quando comparados entre si, com algumas cepas sendo confirmadas por dois métodos e outras que apresentaram resultado negativo por um ou mais métodos, sendo confirmadas como positivas por outro método. Em nosso estudo, como a qPCR-HRM foi testada com uma quantidade maior de amostras, consideramos que este método apresentou resultados mais consistentes e confiáveis do que os outros dois métodos. No entanto, para uma identificação mais acurada, seria importante incluir um método adicional. De acordo com nossos resultados, a identificação pela qPCR-HRM e confirmação pelo Maldi-Tof, seria recomendável para uma identificação mais confiável do SGB, no entanto seria muito oneroso para um laboratório seja público ou privado, utilizar esses dois métodos. Nossa sugestão então seria utilizar os dois métodos mais baratos que seriam o CAMP e a qPCR-HRM, já que o custo de um termociclador para PCR em tempo real hoje começa em aproximadamente US\$ 20.000,00 enquanto que um sistema para análise proteômica por Maldi-Tof, tem o preço inicial em US\$ 450.000,00. A identificação equivocada de cepas de *E. faecalis* como SGB, pode ser diminuída pela confirmação com o MT, já que uma cepa identificada como SGB por qPCR-HRM e CAMP, foi classificada como *E. faecalis* pelo MT.

O perfil de susceptibilidade encontrado entre as cepas analisadas, não foi muito diferente do que tem sido relatado em outros estudos no mundo, onde a maior resistência foi encontrada para os antibióticos Eritromicina, Clindamicina, Azitromicina, Tetraciclina e Sulfametoxazol-trimetoprima, todos com níveis de resistência acima de 50% (MARIMÓN *et al.*, 2005; ROJO-BEZARES *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2018; NEEMUCHWALA *et al.*, 2018; PERME *et al.*, 2020). No Brasil poucos estudos avaliaram a susceptibilidade de cepas de SGB isoladas de pacientes, mas o perfil de resistência encontrado é similar ao relatado em nosso estudo com menor resistência à Eritromicina e Clindamicina (BOTELHO *et al.*, 2018; OTAGUIRI *et al.*, 2013; CORRÊA *et al.*, 2009, 2011; COSTA *et al.*, 2008; PINTO *et al.*, 2013). É importante ressaltar que o nível de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos foi muito baixo, seguindo outros estudos no Brasil e no mundo. O estudo de Botelho e cols. (2018) encontrou um nível de resistência similar a este estudo, mas nenhum dos trabalhos no Brasil avaliou a resistência à Azitromicina que foi de 32% das cepas analisadas em nosso estudo. Considerando que as avaliações da susceptibilidade do SGB foram realizadas no período pré-Covid-19 e em parte no início da pandemia, é



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE GRUPO B (SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

DOI: 10.29327/213319.22.2-1

Páginas 6 a 30

Artigo

possível sugerir que a crescente resistência à Azitromicina encontrada em nosso estudo possa estar relacionada ao uso disseminado desse antibiótico em pacientes com pneumonia por Covid-19. Em alguns casos, a Azitromicina foi utilizada inclusive por indivíduos saudáveis como profilaxia para a Covid-19. No presente estudo, as cepas de SGB avaliadas, foram coletadas no período pré-Covid-19, mas a coleta se estendeu até o final de 2020 quando no Brasil já havia milhões de infectados pelo Sars-Cov-2, hospitalizados e sendo submetidos à antibioticoterapia por Azitromicina. É importante notar que do total de cepas avaliadas pelo TSA, 23,4% (n=11) foram consideradas MDR com 6 cepas resistentes a três classes de antibióticos diferentes e com cinco cepas resistentes a 4 classes. Essa classificação descrita primeiramente por Magiorakos e cols. (2012), é utilizada para definir o nível de resistência de um patógeno bacteriano. No Brasil, os estudos que avaliaram a susceptibilidade do SGB não informam se foram encontradas cepas MDR, apenas a susceptibilidade a determinados antibióticos sem realizar essa avaliação de acordo com a classe do antibiótico. Assim, consideramos esse trabalho como o primeiro a relatar cepas de SGB classificadas como MDR no Brasil.

A tipificação pelo MLST é um método molecular muito utilizado para estudar as relações filogenéticas e a epidemiologia de diferentes patógenos bacterianos. No presente estudo, avaliamos as relações genéticas de 11 cepas de SGB classificadas como MDR em relação à susceptibilidade aos antibióticos. Os resultados obtidos mostraram uma tendência de agrupamento das cepas classificadas como MDR com uma relação genética importante com as cepas ST-17 descritas como hipervirulentas e associadas a casos de doença invasiva especialmente em neonatos. As três cepas MDR classificadas como ST-1872, ST-1873 e ST-1874, estão alocadas em torno de um possível ancestral comum, o ST-23 que surgiu pela expansão do ST-17 onde está alocada a outra cepa MDR. Já as cepas ST-1875, ST-1976 e ST-1877, com perfil de resistência não-MDR, alocaram de forma mais esparsa do lado oposto às cepas MDR, e surgiram a partir de diferentes ST. A cepa ST-1875 surgiu do ST-26 que apareceu com uma das expansões do ST-1 também associado a doença invasiva. A cepa ST-1876 surgiu do ST-196 e a cepa ST-1877 surgiu do ST-19. Em nosso estudo isolamos uma cepa ST-17 de secreção vaginal de uma gestante. Apenas uma outra cepa ST-17 havia sido reportada no Brasil com isolamento em 1987 a partir de leite de vaca. Essa cepa além de seu potencial hipervirulento, apresentou perfil MDR, o que é uma grande preocupação pois por ser encontrada como comensal em pessoas saudáveis, pode ser facilmente disseminada e causar importantes agravos em gestantes e neonatos. A característica de MDR é mais um fator



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE GRUPO B
(SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

DOI: [10.29327/213319.22.2-1](https://doi.org/10.29327/213319.22.2-1)

Páginas 6 a 30

Artigo

de virulência importante desse organismo, que apresenta grande potencial de adquirir novos genes associados à resistência à antibióticos, pela disseminação. O monitoramento de gestantes principalmente nos últimos três meses de gestação, deve ser implementado como uma importante ação de vigilância em saúde, para evitar a expansão desse clone e de novos clones em potencial, que podem estar surgindo a partir do ST-17 como os três MDR acima descritos, trazendo mais fatores de virulência e resistência aos antibióticos.

CONCLUSÕES

Em nosso estudo mostramos que a identificação do SGB tanto pelos métodos convencionais, quanto por proteômica ou métodos moleculares, pode não ter a especificidade necessária para uma identificação acurada. Nós concluímos que para uma identificação mais precisa, seria necessário utilizar pelo menos dois desses métodos. Pelo custo inicial da aquisição de um equipamento de MT, consideramos que o mais viável seria utilizar, para cepas isoladas, o método de CAMP inicial e em seguida a qPCR-HRM. Caso a cepa não tenha sido isolada e apenas o material clínico esteja disponível, o único método possível seria a qPCR-HRM. A susceptibilidade do SGB aos antibióticos beta-lactâmicos ainda é muito alta, o que os torna os antibióticos de primeira linha para o tratamento. No entanto a crescente resistência a outras classes de antibióticos, aliada à aproximação genética de cepas MDR com o clone hipervirulento ST-17, é preocupante. Esse resultado mostra a expansão de cepas resistentes a partir de um clone que tem sido associado à doença invasiva, e a adaptação genômica dessas cepas à crescente resistência aos antimicrobianos. O monitoramento das infecções causadas por esse patógeno é uma ação importante de vigilância em saúde, e deve ser implementada em todos os hospitais públicos e privados.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório Neolab e Clínica Santa Bárbara (Rio de Janeiro) pelas amostras clínicas fornecidas. Esta publicação fez uso do website *Multi Locus Sequence Typing* (<http://pubmlst.org/neisseria/>) desenvolvido por Keith Jolley e localizado na Universidade de Oxford. O desenvolvimento deste site foi financiado pelo Wellcome



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE GRUPO B (SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

DOI: 10.29327/213319.22.2-1

Páginas 6 a 30

Artigo

Trust e pela União Europeia. Os autores agradecem ao núcleo de Sequenciamento "Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ."

Financiamento

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária – PPGVS (INCQS/FIOCRUZ), Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), INCQS/FIOCRUZ e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Finanças 001.

Declaração de conflito de interesses.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

AFSHAR, B. et al. Devani uk clinical screening study for maternal carriage of Streptococcus agalactiae. **21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Milão, [S.I.], p. 7-10, 2011.

ALVES, E. **Determinação molecular dos sorotipos capsulares e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em Streptococcus agalactiae isolados de pacientes atendidos no Hospital Universitário/UFSC na cidade de Florianópolis/SC**. 2018. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, [S. l.], 2018.

AZAVEDO, J. C. S. et al. **Prevalence and Mechanisms of Macrolide Resistance in Clinical Isolates of Group A Streptococci from Ontario, Canada**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 45, n. 12, p. 3504–3508, 2001.

BELLAIS, S. et al. Capsular Switching in Group B Streptococcus CC17 Hypervirulent Clone: A Future Challenge for Polysaccharide Vaccine Development. **The Journal of Infectious Diseases**. [S.I.], v. 206, p. 1745-1752, 2012.



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE GRUPO B (SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

DOI: 10.29327/213319.22.2-1

Páginas 6 a 30

Artigo

BEITUNE, P. E.; DUARTE, G.; MAFFEI, C. M. L. Colonization by *Streptococcus agalactiae* During Pregnancy: Maternal and Perinatal Prognosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. São Paulo, v. 9, p. 276-282, 2005.

BOTELHO, A. C. N. et al. A Perspective on the Potential Zoonotic Role of *Streptococcus agalactiae*: Searching for a Missing Link in Alternative Transmission Routes. **Front. Microbiol.**, Suíça, v. 9, Article 608, 2018.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL. **Early onset group B streptococcal disease**. United States, 2000. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4935a1.htm>. Acesso em: 12 de agosto de 2021.

CHEN, S. L. Genomic Insights Into the Distribution and Evolution of Group B *Streptococcus*. **Front. Microbiol.**, Suíça, v. 10, Article 1447, 2019.

CIESLEWICZ, M. et al. **Structural and Genetic Diversity of Group B *Streptococcus* Capsular Polysaccharides**. *Infection and Immunity*, v.73, p. 3096–3103, 2005.

CORRÊA, A. B. et al. Pulsed-field gel electrophoresis, virulence determinants and antimicrobial susceptibility profiles of type Ia group B streptococci isolated from humans in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 599-603, 2009.

CORRÊA, A. B. et al. The genetic diversity and phenotypic characterisation of streptococcus agalactiae isolates from Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 8, p. 1002–1006, 2011.

COSTA AL, et al. **Prevalência de colonização por estreptococos do grupo B em gestantes atendidas em maternidade pública da região Nordeste do Brasil** [Prevalence of colonization by group B *Streptococcus* in pregnant women from a public maternity of Northwest region of Brazil], *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 30, p. 274-80, 2008.



Artigo

DIEDRICK, M. J. et al. **Clonal Analysis of Colonizing Group B Streptococcus, Serotype IV, an Emerging Pathogen in the United States.** *Journal of Clinical Microbiology*. 48:3100-3104, 2010.

DUARTE R. S. et al. **Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources.** *Antimicrob Agents Chemother*. 49: 97-103, 2005.

DUTRA, V. G. et al. **Streptococcus agalactiae in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility.** *BMC Infectious Diseases*, v. 14, n. 1, p. 323, 2014.

FILHO, D. TIBIRIÇA, S. DINIZ, C. Doença Perinatal associada aos estreptococos do Grupo B: aspectos clínico-microbiológicos e prevenção, **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 34, p. 127-134, 2008.

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.

GOSIEWSKI, T.; BRZYCHCZY-WŁOCH, M.; HECZKO, P. B. **The application of multiplex PCR to detect seven different DNA targets in group B streptococci.** *Folia microbiologica*, v. 57, n. 3, p. 163–7, 2012.

HEYDERMAN, R. S. et al. **Group B streptococcus vaccination in pregnant women with or without HIV in Africa: A non-randomised phase 2, open-label, multicentre trial.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 5, p. 546–555, 2016.

IMPERI, M. et al. **A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of Streptococcus agalactiae.** *Journal of microbiological methods*, v. 80, n. 2, p. 212–4, 2009.

JONES, N. et al. Multilocus sequence typing system for group B Streptococcus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 2530-2536, 2003.



Artigo

KONG, F. et al. **Use of phenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypeable group B streptococci.** *Journal of Clinical Microbiology* v.46, p.2745-2750, 2008.

LAMY, M. C. et al. Rapid detection of the “highly virulent” group B Streptococcus ST-17 clone. **Microbes and Infection**, [S.I.], v. 8, p. 1714-1722, 2006.

LARTIGUE MF. et al. Rapid detection of "highly virulent" Group B Streptococcus ST-17 and emerging ST-1 clones by MALDI-TOF mass spectrometry. **J Microbiol Methods**, v. 86, p. 262-5, 2011.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clin Infect Dis**, Oxford, v. 34, p. 482-492, 2002.

LEROUX-ROELS, G. et al. **A randomized, observer-blind Phase Ib study to identify formulations and vaccine schedules of a trivalent Group B Streptococcus vaccine for use in non-pregnant and pregnant women.** *Vaccine*, v. 34, n. 15, p. 1786–1791, 2016.

LIN, F. C. et al. **Phylogenetic Lineages of Invasive and Colonizing Strains of Serotype III Group B Streptococci from Neonates: a Multicenter Prospective Study**, v. 44, p. 1257-1261, 2006.

LU B et al. **Microbiological and clinical characteristics of Group B Streptococcus isolates causing materno-neonatal infections: high prevalence of CC17/PI-1 and PI-2b sublineage in neonatal infections.** *J Med Microbiol*, v. 67, p. 1551-1559, 2018.

MAGIORAKOS, A.P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 18, p.268-281, 2012.



Artigo

MANNING SD. et al. **Multilocus sequence types associated with neonatal group B streptococcal sepsis and meningitis in Canada.** J Clin Microbiol, v. 47, p. 1143-8, 2009.

MARIMÓN, J. M. et al. Erythromycin resistance and genetic elements carrying macrolide efflux genes in Streptococcus agalactiae. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 49, p. 5069-5074, 2005.

MARTINS ER. et al. **Analysis of Group B Streptococcal Isolates from Infants and Pregnant Women in Portugal Revealing Two Lineages with Enhanced Invasiveness.** Journal of Clinical Microbiology. 3224- 3229, 2007.

MATSUBARA, K.; YAMAMOTO, G. **Invasive group B streptococcal infections in a tertiary care hospital between 1998 and 2007 in Japan.** International Journal of Infectious Diseases, v. 13, n. 6, p. 679–684, 2009.

MELLES, D. C. et al. Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of Staphylococcus aureus. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 69, p. 371–375, 2007.

MOROZUMI, M. et al. **Associations between capsular serotype, multilocus sequence type, and macrolide resistance in Streptococcus agalactiae isolates from Japanese infants with invasive infections.** Epidemiology and infection, v. 142, n. 2014, p. 812–9, 2014.

NASCIMENTO, CILÍCIA SILVÉRIO. **Streptococcus agalactiae - Distribuição sorotípica e relação com fatores de virulência e resistência antimicrobiana.** 2019. 68 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

NEEMUCHWALA A, et al. **Genetic Diversity and Antimicrobial Drug Resistance of Serotype VI Group B Streptococcus, Canada.** Emerg Infect Dis, v. 24, p. 1941-1942, 2018.



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE GRUPO B (SGB) ISOLADOS DE GESTANTES NO RIO DE JANEIRO

DOI: 10.29327/213319.22.2-1

Páginas 6 a 30

Artigo

OTAGUIRI ES, et al. **Commensal Streptococcus agalactiae isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants.** BMC Microbiol, v. 21, 2013.

PERME T, et al. **Genomic and phenotypic characterisation of invasive neonatal and colonising group B Streptococcus isolates from Slovenia, 2001-2018.** BMC Infect Dis, v. 16;20. P. 958, 2020.

PINHEIRO, S. et al. Prevalence and mechanisms of erythromycin resistance in *Streptococcus agalactiae* from healthy pregnant women. **Microb Drug Resist**, Nova York, v. 15, p. 121-124, 2009.

PINTO, T. C. A. et al. **Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine Streptococcus agalactiae strains isolated in Brazil between 1980 and 2006.** Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 17, n. 2, p. 131–136, 2013.

ROJO-BEZARES B et al. **Streptococcus agalactiae from pregnant women: antibiotic and heavy-metal resistance mechanisms and molecular typing.** Epidemiol Infect, v. 144, p. 3205-3214, 2016.

SHET, A.; FERRIERI, P. Neonatal & maternal group B streptococcal infections: A comprehensive review. **Indian J Med Res**, Índia, v. 120, p. 141-150, 2004.

SILVA, R. S.; VILELA, M. A.; SOLIDÔNIO, E. G. Síndromes clínicas em neonatos de mães colonizadas por estreptococos do grupo B. **Repositório Institucional Tiradentes**, Universidade Tiradentes, Pernambuco, 2019.

SILVESTRE, INÊS FELIPA PALÃO. **Evolução de genótipos de Streptococcus agalactiae associados a colonização na grávida.** 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.

