

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
INCQS/FIOCRUZ

Nicolle Felix Lima Ramos

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

Rio de Janeiro

2022

Nicolle Felix Lima Ramos

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

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Ivano de Filippis

Rio de Janeiro

2022

Nicolle Felix Lima Ramos

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

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Nome: Profa. Dra. Celia Maria Carvalho Pereira Araujo Romao

Nome: Prof. Dr. Sérgio Longo Fracalanza

Nome: Prof. Dr. Kayo Cesar Bianco Fernandes

ORIENTADOR

Prof. Dr. Ivano de Filippis

Instituição: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) - Fiocruz

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Ramos, Nicolle

Caracterização molecular de *Streptococcus agalactiae* grupo B (SGB) isolados de gestantes no Rio de Janeiro. / Nicolle Ramos. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022.

46 f. : fig. ; graf.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

Orientador: Ivano de Filippis.

1. Microbiologia. 2. Diagnóstico. 3. Biologia Molecular. I. Título.

Phenotypic and molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* group B (SGB) isolated from pregnant women in Rio de Janeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O *Streptococcus agalactiae* grupo B (SGB) é uma bactéria 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 amostras de SGB isoladas de gestantes e pacientes e identificar a possível circulação de clones hipervirulentos por MLST e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Foram analisadas 132 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 amostras cepas isoladas foram submetidas ao TSA por disco-difusão e CIM. Cento e treze amostras de SGB foram recuperadas a partir de 132 amostras clínicas recebidas no laboratório do INCQS/FIOCRUZ. As amostras 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 amostras 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 antimicrobianos 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 amostras 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 beta-lactâmicos continua sendo a escolha terapêutica, no entanto há uma crescente resistência a outras classes de antimicrobianos, 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.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae* (SGB), qPCR-HRM, MLST, clone hipervirulento.

ABSTRACT

Group B *Streptococcus agalactiae* (GBS) is an opportunistic bacteria 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 samples from pregnant women and patients and identify the possible circulation of hypervirulent clones by MLST and antimicrobial susceptibility profile. One hundred thirty two 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 132 clinical samples received at the INCQS/FIOCRUZ laboratory. The samples 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 samples was performed by three different methods and none of them was sufficient to confirm the species in all samples 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 antimicrobial. Among the most efficient antimicrobial 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 pathogen. Regarding antimicrobial susceptibility, beta-lactam continue to be the therapeutic choice, however there is a growing resistance to other classes of antimicrobial, 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.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Fluxograma mostrando a identificação das cepas de SGB a partir do Lab Neolab de origem.	30
Figura 2 Resistência das amostras frente a 6 antibióticos. A porcentagem foi calculada em razão do número de amostras testadas e o número de resistentes entre as avaliadas.	33
Figura 3 Número de amostras resistentes avaliadas por disco-difusão (DD) e CIM. ..	34
Figura 4 Minimum Spanning Tree (MST) de todas as cepas de SGB depositadas no banco de dados de MLST. A figura mostra a alocação do ST-1, e ST-17 considerados mais virulentos, e dos outros ST descritos nesse estudo.	35
Figura 5 MST com destaque no agrupamento formado pelas três cepas MDR classificadas como ST-1872, ST-1873 e ST-1874 e suas relações filogenéticas com outros ST próximos.	36
Figura 6 MST com destaque no agrupamento formado pelas três cepas não-MDR classificadas como ST-1875, ST-1876 e ST-1877 e suas relações filogenéticas com outros ST.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das amostras recebidas por origem do isolamento.	26
Tabela 2 - Comparação dos resultados obtidos com a identificação por qPCR (genes <i>dltA</i> e <i>sip</i>), Maldi-Tof e CAMP. A T_m considerada positiva para os genes <i>dltA</i> e <i>sip</i> foi de $73,2^{\circ}\text{C}$ e $77,6^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ respectivamente.....	32

LISTA DE SIGLAS

Ácido Siálico - Ácido Neuro– Acetil-Neuramínico

adhP - Álcool desidrogenase

AS - Ágar Sangue

atr - Aminoácido transportador

AZI – Azitromicina

BHI - Brain Heart Infusion

CAMP - *Christie, Atkins, Munch-Petersen*

CBRVS - Coleção de bactérias de referência em vigilância sanitária

CC - Complexos clonais

CEP - Comitê de ética em pesquisa

CIM - Concentração inibitória mínima

CLI – Clindamicina

CLO – Cloranfenicol

cMLSB - Resistência constitutiva

CTX – Ceftriaxona

dltA - *D-alanine-D-alanyl-ligase*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EOD - *early-onset disease*

ERI – Eritromicina

erm - erythromycin ribosome methylase

Galp - Galactose

glcK - *Glicose kinase*

GlcP - Glucose

glnA - *Glutamina sintetase*

iMLSB - Resistência induzida

INCQS – Instituto nacional de controle de qualidade em saúde

LEV – Levofloxacina

LNZ – Linezolida

LOD - *late-onset disease*

MDR - Multidroga resistente

mef - macrolide efflux

MLST - *Multi Locus Sequence Typing*

mRNA - RNA mensageiro

MST - Minimum spanning tree

MT - Maldi-Tof

NeupNAc - Ácido N-acetil neuramínico

PEN – Penicilina

pheS - *Fenilalanil tRNA sintetase*

PIA - Profilaxia intraparto antimicrobiana

qPCR-HRM - PCR em tempo real com HRM

RIF - Rifampicina.

rRNA – RNA ribossômico

sdhA - *Serina desidratase*

SGB - *Streptococcus* do grupo B

ST - Sequence type

SXT - Sulfametoxazol-tremetoprima

TET – Tetraciclina

tkt – *Transketolase*

TM - Temperatura de melting

TSA - Teste de sensibilidade a antimicrobianos

TSB – Caldo tripticaseína soja

UFRJ – Universidade federal do Rio de janeiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	<i>Streptococcus</i>	15
1.2	<i>Streptococcus</i> do grupo B	15
1.3	Relevância clínica	16
1.4	Caracterização molecular de SGB	17
1.5	Epidemiologia	17
1.6	Manifestações clínicas	18
1.6.1	<i>Manifestações clínicas gerais</i>	18
1.6.2	<i>Manifestações clínicas em gestante e neonatos</i>	18
1.7	Profilaxia	19
1.8	Resistência aos antimicrobianos	20
1.8.1	<i>Resistência a eritromicina e clindamicina</i>	21
1.9	Tipificação molecular	22
1.9.1	<i>Multi Locus Sequence Typing (MLST)</i>	22
1.10	Complexos Clonais	22
1.11	Justificativa	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	METODOLOGIA	26
3.1	Seleção das amostras controle	26
3.2	Amostras clínicas	26
3.3	Extração e purificação de DNA dos isolados	27
3.4	Confirmação da identificação	27
3.5	Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos	28
3.6	<i>Multi Locus Sequence Typing (MLST)</i>	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Identificação polifásica	30
4.2	Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos	32
4.3	Tipificação pelo MLST	34
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÕES	40
7	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus*

O gênero *Streptococcus* foi inicialmente identificado em 1879 por Louis Pasteur e George Sternberg a partir de isolados de lesões supurativas no homem, sendo o organismo envolvido nesta infecção. A partir do estudo de Shottmuller em 1903 utilizando Agar com sangue, os estreptococos foram classificados em β -hemolíticos, α -hemolíticos ou γ -hemolíticos de acordo com a sua hemólise. No ano de 1933, foi estabelecida a Classificação de Lancefield, que consiste em um teste padrão para a identificação e diferenciação das cepas β -hemolíticas, baseando-se na atividade hemolítica e reações sorológicas com anticorpos (CHAVES, 2011; FACKLAM, 2002; LANCEFIELD, 1933; MCPHERSON AND PINCUS, 2007; MURRAY et al, 2007).

A parede celular do gênero é composta de peptidoglicano, ácido teicóico, carboidratos e proteínas. O carboidrato que permite a diferenciação dos grupos sorológicos é o antígeno C. Através de testes de precipitação, segundo as diferenças antigênicas foram diferenciados vários grupos, sendo eles: A, B, C, D e E. Posteriormente os grupos sorológicos foram ampliados, tornando-se vinte grupos designados de A a H e de K a V. Entretanto verificou-se que algumas espécies de *Streptococcus* que compartilham do mesmo grupo de antígenos podem ser taxonomicamente e fisiologicamente diferentes, tornando inviável a classificação do gênero baseado somente no grupo sorológico (BORGER, 2005; GOMES, 2013; GOUVÊA, 2016).

Somente em 1995, a partir do estudo de Kawamura e colaboradores em sequências de gene *rrs* do 16S rRNA de amostras de *Streptococcus*, foram encontradas relações filogenéticas entre as espécies, contribuindo na classificação. A pesquisa da análise comparativa subdividiu o gênero em seis grupos: bovis, salivarius, mutans, mitis, anginosus/milleri e piogênicos. A espécie *Streptococcus agalactiae* foi classificada no grupo B dos piogênicos (GOUVÊA, 2016).

1.2 *Streptococcus* do grupo B

Em 1887 o *Streptococcus* do Grupo B (SGB) foi caracterizado por Nocard, como *Streptococcus* da mastite, reconhecido principalmente como fator responsável pela mastite bovina, possuindo uma maior importância para a medicina veterinária. O termo *Streptococcus*

agalactiae foi inicialmente utilizado por Lehman & Neumann, em 1896, para definir *Streptococcus* isolados de leite. No ano de 1938, Frey descreveu casos fatais de septicemia a partir de amostras de secreção vaginal de mulheres puérperas assintomáticas. Porém, somente a partir de 1960 foi valorizada sua importância como patógeno humano em infecções em gestantes e recém-natos (BORGER, 2005; GOUVÊA, 2016; TAMINATO et al, 2011).

A espécie estudada apresenta-se como cocos Gram-positivos, possuindo forma esférica e em cadeias. A maioria das amostras são classificadas como beta-hemolíticas, porém algumas cepas podem promover lise parcial e em menor frequência podem apresentar ausência total de hemólise dos eritrócitos. São organismos não produtores de catalase, imóveis e não esporulados. Além de serem anaeróbios facultativos e nutricionalmente exigentes, possuem o metabolismo fermentativo e são potencialmente invasivas, especialmente no período perinatal, envolvendo as gestantes, recém-nascidos além de pacientes idosos, imunodeprimidos e em casos de infecção hospitalar (BOTELHO et al, 2018; CLOUSE, 2019; FARLEY et al, 2001; GOUVÊA 2016; JACKSON et al, 1995; MURRAY et al, 2007; SEALE et al, 2017).

1.3 Relevância clínica

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 uma bactéria 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 (ALVES, 2018; CHEN, 2019; MATSUBARA; YAMAMOTO, 2009).

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. A cada ano, aproximadamente 30 milhões de recém-nascidos são acometidos e cerca de 1 a 2 milhões, não resistem às complicações causadas pela doença. Sua incidência varia de 7,1 a 38 por 1000 nascidos vivos na Ásia, de 6,5 a 23 por 1.000 nascidos vivos na África, de 3,5 a 8,9 por 1000 nascidos vivos na América do Sul e Caribe e de 1,5 a 3,5 por 1000 nascidos vivos nos Estados Unidos e Austrália (AREAL et al, 2010; CHAVES, 2011; GOUVÊA, 2016; SHET AND FERRIERI, 2004).

1.4 Caracterização molecular de SGB

As amostras 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 (ALVES, 2018; GOSIEWSKI; BRZYCHCZYWŁOCH; HECZKO, 2012; IMPERI et al., 2009).

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 parte da cápsula do microrganismo. A cápsula do SGB inibe a fagocitose e bloqueia a ativação do sistema complemento. A seqüência α -D-NeupNAc (2 \rightarrow 3) - β -D-Galp e os monossacarídeos glucose (Glc p), galactose (Gal p) e ácido N-acetil neuramínico (NeupNAc) estão presentes em todos os sorotipos, sugerindo um possível papel na patogenicidade deste microrganismo (ALVES, 2018; CIESLEWICZ et al., 2005).

Sip é uma proteína imunogênica de superfície e está presente nas células SGB independente do sorotipo. Já o gene *DltR* que codifica a proteína carreadora *D-alanine-D-alanyl-ligase* envolvida na esterificação dos ácidos lipoteicoicos da membrana. São genes utilizados com o objetivo de detectar o SGB através da utilização da qPCR (BERGSENG et al, 2007; LAMY et al, 2006).

1.5 Epidemiologia

Com base nas informações de diagnóstico o sorotipo mais frequentemente associado às infecções no mundo é o sorotipo III, sendo o mais encontrado em infecções de neonatos, principalmente meningite e septicemia. O sorotipo Ia é o mais encontrado em amostras vaginais de gestantes assintomáticas e o V é predominante em casos de infecção em adultos (CORRÊA et al 2011; FIOLO et al, 2012; SOARES et al, 2013).

Nos Estados Unidos, Europa e Austrália os sorotipos Ia, II, III e V têm representado 80 a 90% das amostras de SGB. Em 2014, Morozumi e colaboradores analisaram amostras oriundas de neonatos no Japão, onde foram encontrados os sorotipos III, Ia e Ib como os mais prevalentes. Já estudos realizados na África do Sul descreveram maior prevalência dos

sorotipos Ia e III (ALVES, 2018; GHERARDI et al, 2007; KONG et al, 2008; MARTINS et al, 2007; MOROZUMI, 2014).

Um estudo realizado por Pinto e colaboradores em 2013 nas regiões do sul e sudeste do Brasil demonstrou 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 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 (DUTRA et al, 2014; PINTO et al, 2013).

Já em um estudo realizado no Rio de Janeiro, com 60 amostras provenientes de secreção vaginal de gestantes infectadas por SGB, os principais sorotipos associados foram Ia (33,3%), II (15%) e V (15%). No estudo realizado por Soares e colaboradores (2013) também no Rio de Janeiro com 39 amostras provenientes de amostras de swab vaginal/anal encontraram prevalência dos sorotipos III (38,5%) e V (25,6%) (ALVES, 2018; CORRÊA et al 2011; SOARES et al., 2013).

1.6 Manifestações clínicas

1.6.1 Manifestações clínicas gerais

As infecções assintomáticas por SGB acometem mulheres e homens em qualquer faixa etária, sendo a infecção do trato urinário a mais presente, em outros casos mais graves também pode causar pielonefrite e cistite. No entanto, pacientes imunocomprometidos ou com idade elevada, na maioria dos casos a infecção caracteriza-se por bacteremia, pneumonia, infecções de ossos, articulações, pele e tecidos moles. Hospedeiros que possuem doenças de base como diabetes, pielonefrite e abscesso renal também podem desenvolver pneumonia e infecção ascendente (SILVA et al, 2019).

1.6.2 Manifestações clínicas em gestante e neonatos

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 (ALVES, 2018).

O SGB apresenta dois tipos de manifestação clínica padrão em neonatos, sendo elas, doença de início precoce e doença de início tardio (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 evidenciou 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 à 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 prevalentes (AFSHAR et al, 2011; MARTINS et al, 2007; SHET AND FERRIERI, 2004; SILVA et al, 2019).

1.7 Profilaxia

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 passou a ser 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. Conforme relatado no item 1.5, os estudos no Brasil, relatam a maior frequência dos sorotipos Ia, II, III e IV, em diferentes estados, tornando inviável a cobertura apenas dos sorotipos Ia, Ib e III (ALVES, 2018; HEYDERMAN et al., 2016; LEROUX-ROELS et al., 2016).

O desenvolvimento de vacinas está relacionado diretamente com o predomínio dos sorotipos da região, portanto, futuras vacinas projetadas para a realidade brasileira devem levar em consideração as prevalências dos diferentes sorotipos identificados nos estudos localizados no país. 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).

A prevenção da doença estreptocócica neonatal pode se basear também no rastreamento das gestantes por meio de *swab* vaginal e retal entre 35 e 37 semanas de gestação, seguidas por quimioprofilaxia intraparto ou profilaxia intraparto antimicrobiana (PIA) quatro horas antes do parto para pacientes infectados. Estudos demonstram que após o uso da profilaxia antimicrobiana ocorreu uma grande redução na incidência da doença de SGB de início precoce em neonatos (CLOUSE et al, 2019).

Estudos demonstram que a penicilina é o antimicrobiano mais adequado para o tratamento. Nos casos de gestantes alérgicas ao medicamento, é indicado o uso de clindamicina ou eritromicina. O uso da vancomicina é indicado para pacientes alérgicas a penicilina, clindamicina e eritromicina (CDC, 2000; SILVA, 2018).

1.8 Resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos representa uma grande questão de saúde pública e socioeconômica mundial há mais de meio século. As bactérias desenvolveram resistência como resultado de mecanismos decorrentes de mutação e seleção natural, em especial devido ao uso intenso e/ou indevido dessas drogas. A resistência aos antibióticos pode também se desenvolver por transferência horizontal de genes de resistência, com conseqüente recombinação genética, ocorrida durante os processos de conjugação, quando a bactéria doadora transfere genes ou elementos móveis contendo os genes de resistência para uma bactéria receptora (SANTOS, 2004; TENOVER, 2006; ZIEMSKA et al, 2013)

Taxas crescentes de resistência de SGB à clindamicina e eritromicina foram encontradas em diversas regiões do mundo, incluindo Ásia, América do Norte, Europa e América do Sul. A penicilina é o antimicrobiano de primeira escolha para o tratamento de infecções causadas pelo SGB, pois possui uma contínua susceptibilidade deste microrganismo ao antimicrobiano. Em contrapartida, antimicrobianos usados como terapia alternativa, especialmente macrolídeos, lincosamidas, fluoroquinolonas e tetraciclina foram documentados como resistentes em diferentes países (CHEN, 2019; DUARTE et al. 2005, FILHO et al, 2008; PINHEIRO et al. 2009).

Em infecções em pacientes imunocomprometidos, o sorotipo V é o mais prevalente, além de possuir resistência a macrolídeos. Em contrapartida na América do Norte e regiões próximas, o sorotipo IV está emergindo gerando infecções neonatais e infecções invasivas em adultos,

sendo também relacionado à resistência à clindamicina, eritromicina e tetraciclina (ALVES, 2018).

Para determinar a sensibilidade bacteriana *in vitro* é realizado o teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) utilizando agentes antimicrobianos contribuindo para a escolha do antimicrobiano mais adequado para o paciente. A interpretação do resultado do TSA é realizada por critérios estabelecidos por uma documentação-padrão baseada em 3 tipos de dados: microbiológico, farmacocinético e resultados de estudos clínicos. Os resultados são interpretados como: *sensível*, onde é categorizado quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico utilizando o regime de dosagem padrão do agente; *intermediário*, quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico porque a exposição foi aumentada ajustando-se o regime de dosagem ou sua concentração no local de infecção e *resistente*, quando há alta probabilidade de falha terapêutica mesmo quando há aumento da exposição (ANDRADE, 2017; ANVISA, 2008; JORGENSEN and FERRARO, 2009).

1.8.1 Resistência a eritromicina e clindamicina

Amostras de SGB têm apresentado resistência à clindamicina e eritromicina, onde um dos principais mecanismos de resistência é a presença do gene *mef* (macrolide efflux) e do gene *erm* (erythromycin ribosome methylase). A presença dos dois genes confere a modificação do sítio de ligação do antimicrobiano mediada por metilases e atividade de bombas de efluxo (LECLERCQ, 2002; PINTO, et al, 2013).

O gene da subclasse *mefA* foi identificado primeiramente em *Streptococcus pyogenes* e o gene da subclasse *mefE* em *Streptococcus pneumoniae*, posteriormente as duas subclasses de genes citadas *mefA* e *mefE* foram identificadas em isolados clínicos de SGB resistentes a eritromicina (AZAVEDO et al., 2001; MARIMÓN et al., 2005).

Além da presença do gene *mef*, as cepas de SGB também contam com a presença do gene *erm*. Na maioria dos casos os genes *ermB* e *ermA* são responsáveis pela resistência aos macrolídeos. Essa resistência ocorre devido a metilases, codificadas pelos genes *erm*, que modificam o alvo ribossomal, podendo ser induzidas ou constitutivamente expressas. Confere 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).

Na resistência induzida (iMLSB), o RNA mensageiro (mRNA) inativo é transcrito e com presença de um macrolídeo indutor, torna-se ativo produzindo metilases. As cepas que carregam o gene *erm* induzível são resistentes à eritromicina e permanecem susceptíveis aos macrolídeos não indutores (claritromicina e azitromicina) e lincosamidas. Essas amostras são caracterizadas pelo teste D positivo. Nas amostras que possuem resistência constitutiva (cMLSB) o mRNA já se encontra ativo no microrganismo, sendo dispensável a presença de um agente indutor. Resulta em amostras resistentes à eritromicina e clindamicina (AZAVEDO et al., 2001; LECLERCQ, 2002; MARIMÓN et al., 2005; NASCIMENTO, 2019).

1.9 Tipificação molecular

1.9.1 Multi Locus Sequence Typing (MLST)

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 (pheS)*, *aminoácido transportador (atr)*, *glutamina sintetase (glnA)*, *serina desidratase (sdhA)*, *glicose kinase (glcK)* e *transketolase (tkt)*. A combinação dos alelos dos genes escolhidos possibilita a atribuição de um tipo sequencial (*sequence type - ST*) aos isolados. Amostras que compartilham um certo número de alelos idênticos podem formar grupos chamados complexos clonais (CC), podendo reunir amostras de diferentes sorotipos capsulares, mas com características genéticas similares. A tipagem por MLST permite uma resposta concreta para estudos epidemiológicos, a partir de caracterização das amostras 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).

1.10 Complexos Clonais

O banco de dados utilizado para a submissão de alelos e designação de 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 12.181 linhagens, com 302.419 alelos e 10.178 genomas, provenientes de diversos países dos 5 continentes e um total de 1877 ST (última atualização em 20/01/2022). O banco, no entanto, ainda não classifica os grupamentos de amostras com 4 ou mais alelos iguais em 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 ST-17, 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 amostras do sorotipo III (BELLAIS et al, 2012, LAMY et al, 2006; SILVESTRE, 2013).

A presença de elementos genéticos móveis em SGB facilita sua adaptação ao ambiente, contribuindo para a diversidade do genoma e para a emergência de clones virulentos. Análises filogenéticas indicam que amostras geneticamente relacionadas ao clone hipervirulento ST-17 surgiram a partir de uma linhagem de isolados de bovinos (BISHARAT et al, 2004; GLASER et al, 2002; SILVESTRE, 2013).

1.11 Justificativa

A vigilância sanitária tem um caráter estratégico para a proteção da saúde da população atuando na eliminação, diminuição e prevenção dos riscos à saúde. A promoção da segurança do paciente em serviços neonatais constitui área prioritária para a política de saúde no Brasil, contribuindo para a redução da morbimortalidade de mulheres e recém-nascidos.

A detecção de SGB envolve o cultivo em meio de cultura específico e confirmação por PCR em tempo real com HRM (qPCR-HRM). A designação dos clones circulantes e a susceptibilidade aos antimicrobianos contribuem com o monitoramento epidemiológico do microrganismo no país. Além disso, o monitoramento de grupos assintomáticos torna-se importante para a vigilância epidemiológica, a fim de diminuir a disseminação. Também é importante, a promoção de medidas que visam o tratamento desses portadores, além de medidas profiláticas.

Em casos de paciente alérgico a penicilina é recomendável o uso de clindamicina e penicilina, porém algumas cepas de SGB tem demonstrado resistência a esse antimicrobiano, tornando considerável análises mais aprofundadas sobre essa resistência (PINTO, et al, 2013).

O SGB é descrito como um perigoso agente etiológico de septicemia e meningite em neonatos no período perinatal, contudo, os dados referentes aos sorotipos circulantes de SGB no Brasil são escassos. Dessa forma, torna-se muito importante novos estudos sobre a circulação dessa bactéria no país, visando a melhoria da prevenção e tratamento das infecções causadas por SGB.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar, avaliar e classificar quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos e tipificar cepas de *Streptococcus agalactiae* (SGB) isoladas de gestantes no Município do Rio de Janeiro.

2.2 Objetivos específicos

- Confirmar a identificação de SGB isolados de materiais clínicos de gestantes por qPCR-HRM e técnicas fenotípicas;
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos;
- Determinar os ST circulantes pela análise de MLST.

3 METODOLOGIA

3.1 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 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 Trypticaseína Soja) e semeada em meio Ágar Sangue com 5% de sangue de Equino (AS).

3.2 Amostras clínicas

Foram recebidas 132 amostras de urina, secreção vaginal previamente identificados como SGB provenientes de laboratórios privados no Rio de Janeiro no período de 2018 a 2021 (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das amostras recebidas por origem do isolamento. SV= Secreção vaginal.

ANO	AMOSTRA	MATERIAL
2018	17	SV
2018	1	Urina
2018	2	Não identificado
2019	22	SV
2019	10	Urina
2019	14	Não identificado
2020	52	SV
2020	5	Urina
2020	8	Não identificado
2021	1	SV

As amostras fazem parte de projeto de pesquisa em colaboração com o Laboratório NeoLab de análises clínicas localizada em Realengo e Curicica que realiza monitoramento de colonização por SGB em gestantes em alguns bairros do Rio de Janeiro e utiliza testes de identificação como a utilização do ágar cromogênico, teste de bile esculina e teste CAMP para identificar os isolados como SGB. As amostras recebidas foram semeadas em meio de ágar-sangue composto por uma base de ágar Columbia adicionada de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Após confirmação da identidade as amostras 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 foram preservadas em freezer comum a -15°C. As amostras 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.

3.3 Extração e purificação de DNA dos isolados

O crescimento bacteriano em meio de AS foi submetido à extração e purificação de 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 purificado, foi estocado a -20°C no Laboratório de Microrganismos de Referência do INCQS (LMR).

3.4 Confirmação da identificação

Para a amplificação por qPCR-HRM, foi utilizado o Master Mix HOT FIREPol® EvaGreen® HRM MIX PCR (SOLIS Biodyne), otimizado para HRM. Esse reagente contém um agente fluorescente intercalante de DNA que emite fluorescência quando ligado a DNA de fita dupla. A mistura da PCR foi composta de 1X Master Mix HOT FIREPol®; 50 pmol de cada iniciador; aproximadamente 10 ng de DNA molde e água para PCR Gibco® completando o volume. As condições da reação foram: 1 ciclo a 95°C por 5' e 40 ciclos 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 confirmação da espécie foi obtida utilizando como alvos, os genes conservados e exclusivos do SGB: gene *dltR* e o gene *sip*, que codifica a síntese da proteína de superfície *sip*. Os iniciadores utilizados para a amplificação dos dois genes foram: *dltR* (5'-TTGACAGGTCTCTATGATTTAGTC-3') e (5'-GTCTGGTTCTCAGCCTAATTC-3') descritos por Lamy et al (2006) e *sip* (5'-ATCCTGAGACAACACTGACA-3') e (5'-TTGCTGGTGTCTTCTATTTTCA-3') descritos por Bergsens et al (2007).

Algumas amostras não identificadas como SGB na qPCR-HRM com alvo *dltR*, 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.

Foi semeada uma amostra controle de *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 (ATCC 25923) 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 houve formação de hemólise em forma de “seta” ou “meia-lua” convergindo para o *S. aureus* na intersecção do crescimento das duas bactérias.

Amostras previamente identificadas como SGB pelo Neolab que não foram confirmadas pela amplificação do gene *dltR* descrito por Lamy et al (2006) poderiam sugerir ausência do gene em algumas amostras. Passamos então a utilizar como alvo o gene *sip* descrito por Bergseng et al (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 *dltR* 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, 14 amostras foram submetidas à identificação proteômica por Maldi-Tof (MT) no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica da UFRJ.

3.5 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos

As cepas confirmadas como SGB foram avaliadas quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos. Obtivemos uma suspensão bacteriana com concentração celular correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Após homogeneização da suspensão foram inoculadas placas de Mueller-Hinton com 5% de sangue desfibrinado de carneiro por espalhamento com *swab*. A determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada por disco difusão e as cepas resistentes foram confirmadas pelo teste de concentração inibitória mínima (CIM) com fitas de gradiente de concentração tipo E-test.

No teste de disco difusão foram utilizados discos de papel-filtro contendo os antimicrobianos em concentrações fixas, sendo eles penicilina (10UI), ceftriaxona (30µg), eritromicina (15µg), azitromicina (15µg), tetraciclina (30µg), clindamicina (2µg), levofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), linezolida (10µg), rifampicina (5µg) e sulfametoxazol-trimetoprima (1,25-25µg) todos da Oxoid. A cepa controle utilizada foi o *Streptococcus pneumoniae* INCQS 440 (ATCC 49619). O antibiograma foi realizado em placas de 150 mm e 90 mm, que 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 de um paquímetro. A interpretação do resultado do antibiograma foi realizada seguindo as diretrizes do manual EUCAST (2021) e as cepas foram categorizadas em sensíveis (S), resistentes (R) ou intermediárias (I).

Todas as amostras foram também avaliadas quanto à resistência à clindamicina (2µg) induzida pela eritromicina (15µg), utilizando discos dos dois antimicrobianos aplicados a aproximadamente 12 mm de distância. O achatamento do halo de clindamicina indica a resistência induzida à clindamicina (Teste D).

Na confirmação da susceptibilidade pelo teste de CIM, a preparação do inóculo é realizada da mesma forma que no teste de disco difusão. Utilizando-se 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 observando o ponto de intersecção entre a fita e a zona de inibição do crescimento do microrganismo.

3.6 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*). Foi empregado o protocolo para o sequenciamento dos genes 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).

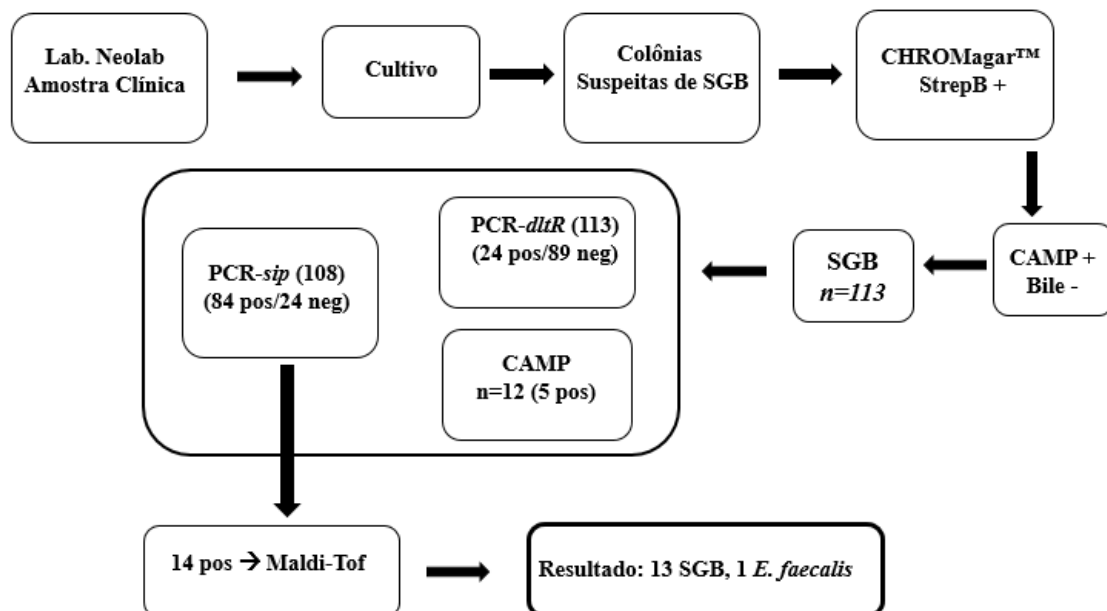
4 RESULTADOS

4.1 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 Tm 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 Tm para cada alvo foi de $\pm 0,5^\circ\text{C}$. 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.

Figura 1 - Fluxograma mostrando a identificação das cepas de SGB a partir do Lab Neolab de origem.



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 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. A Tabela 2, mostra os resultados comparativos entre a qPCR dos dois genes, o MT e o teste CAMP. Para efeito de comparação dos três métodos entre as cepas testadas, não incluímos os resultados da qPCR-HRM com o gene *dltR* pois apresentou apenas a cepa de referência como positiva.

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.

Tabela 2 - Comparação dos resultados obtidos com a identificação por qPCR (genes *dltR* e *sip*), Maldi-Tof e CAMP. A Tm considerada positiva para os genes *dltR* e *sip* foi de 73,2°C e 77,6°C ± 0,5°C respectivamente.

Cepa	qPCR (<i>dltR</i>)	qPCR (<i>sip</i>)	Maldi-Tof	CAMP
INCQS 000128	73.2	77.6	+++	+
P6373	80.8	77.2	+++	+
P6374	81.2	77.3	+++	+
P6375	80.9	75.7	+++	+
P6376	79.7	77.0	++	+
P6377	81.0	77.6	++	+
P6378	81.0	72.8*	+++	+
P6462	80.6	66.1*	+++	-
P6457	79.2	76.8	++	-
P6765	80.8	77.4	+++	+
DC	81.1	77.7	<i>E. faecalis</i> *	+
P7197	78.7	77.0	+++	+
P7198	78.7	77.1	++	+
VB	78.6	77.6	++	+

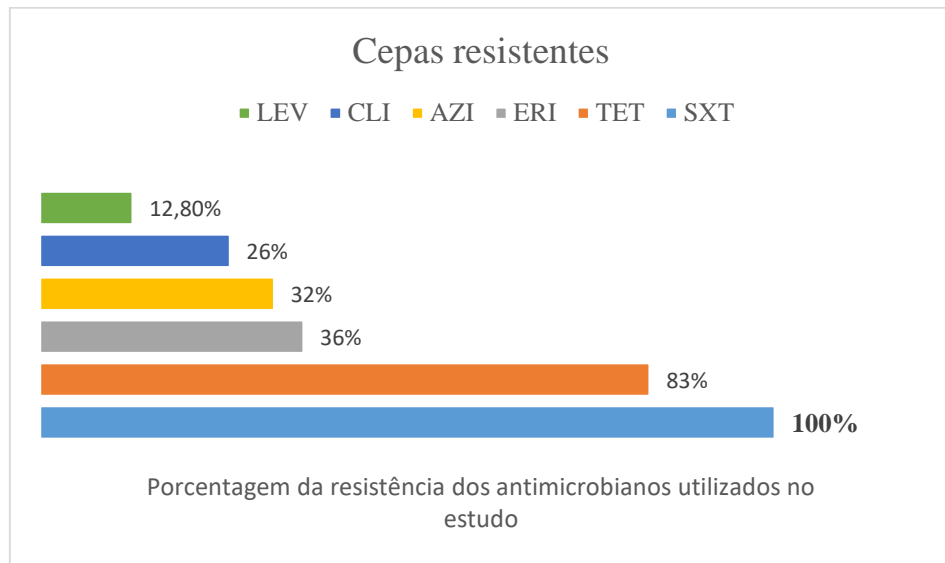
*16S= *S.agalactiae*

4.2 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.

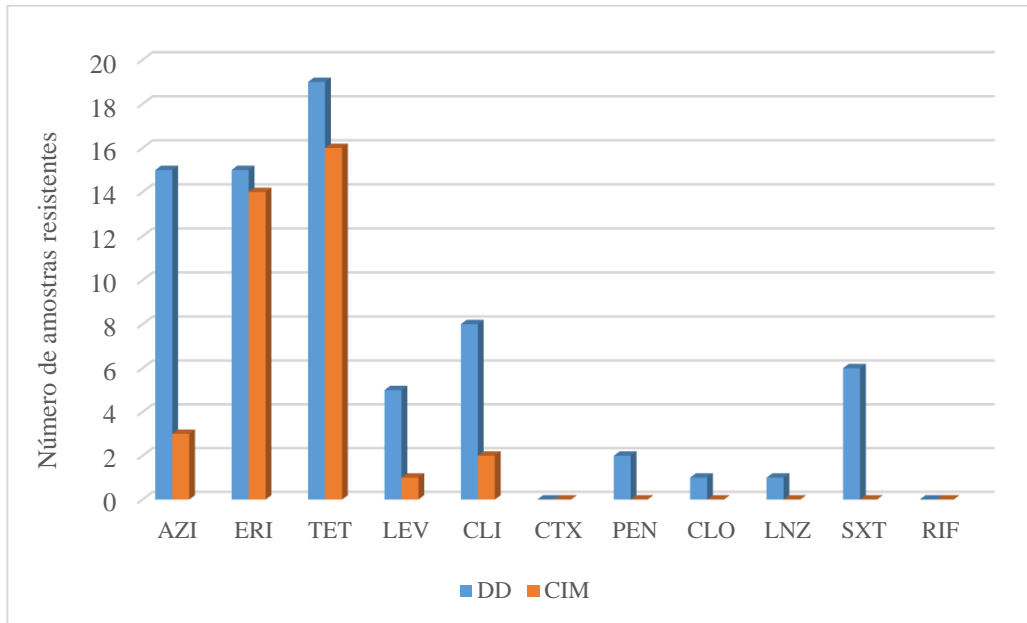
Foi determinada a susceptibilidade das cepas de SGB aos antimicrobianos por disco difusão. Entre os antimicrobianos testados, o que apresentou menor eficácia com maior número de amostras resistentes, foi o sulfametoxazol-trimetoprima com 100% das amostras testadas resistentes. Em seguida foi a tetraciclina com 83%, eritromicina com 36%, azitromicina com 32%, clindamicina com 26% e a levofloxacina com 12,8% (Figura 2).

Figura 2 - Resistência das amostras frente a 6 antibióticos. A porcentagem foi calculada em razão do número de amostras testadas e o número de resistentes entre as avaliadas. LEV= levofloxacina; CLI= clindamicina; AZI= azitromicina; ERI= eritromicina; TET= tetraciclina; SXT= sulfametoxazol-trimetoprima; RIF= rifampicina.



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 (Figura 3).

Figura 3 - Número de amostras resistentes avaliadas por disco-difusão (DD) e CIM. AZI= azitromicina; ERI= eritromicina; TET= tetraciclina; LEV= levofloxacina; CLI= clindamicina; CTX= ceftriaxona; PEN= penicilina; CLO= cloranfenicol; LNZ= linezolida; SXT= sulfametoxazol-trimetoprima; RIF= rifampicina.



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.

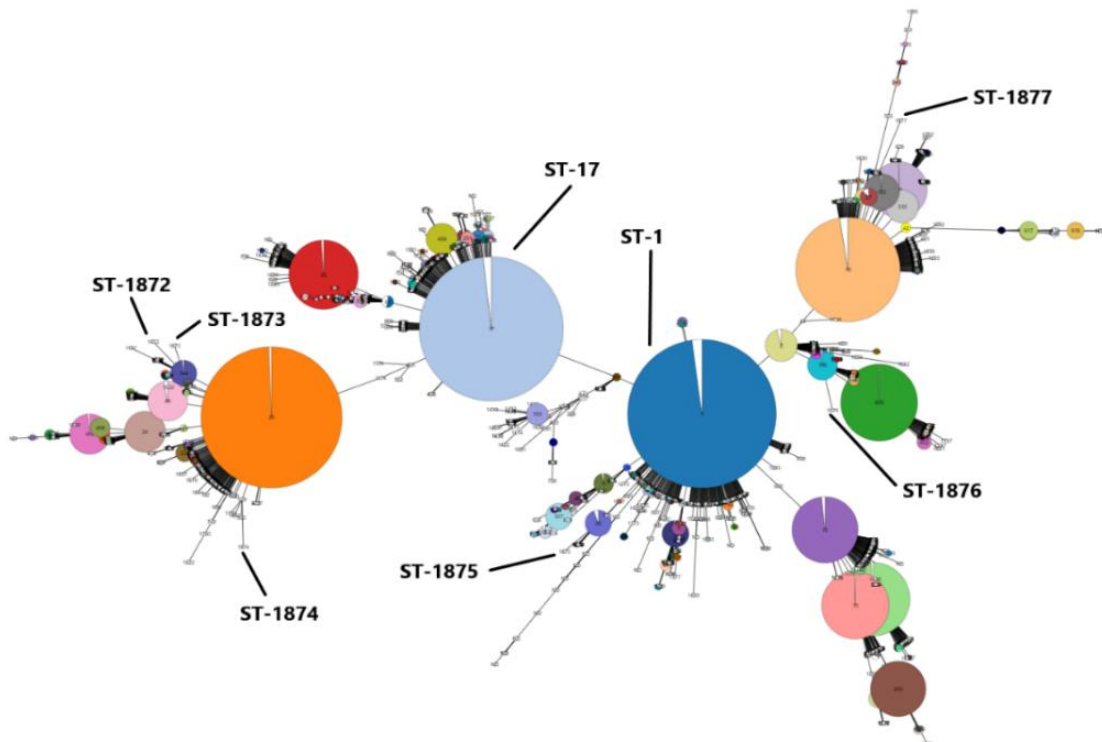
4.3 Tipificação pelo MLST

As 11 amostras com perfil MDR foram submetidas à tipificação por MLST. Entre essas cepas, 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* (<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.

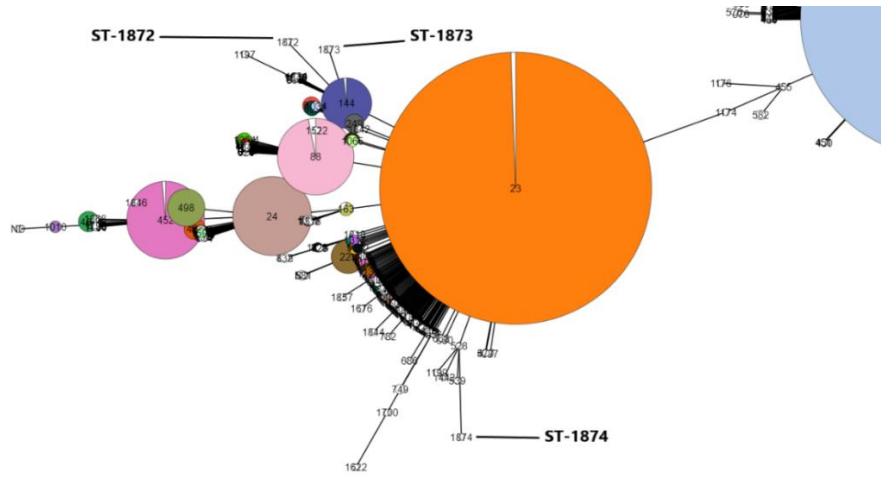
A análise dos ST por Minimum Spanning Tree (MST) na Figura 4, mostra as relações filogenéticas de todos os ST depositados no banco de MLST no mundo e a alocação do ST-1, e ST-17 considerados mais virulentos, e dos outros ST descritos nesse estudo (MANNING *et al.*, 2009; LAMY *et al.*, 2006; LARTIGUE *et al.*, 2011).

Figura 4 - Minimum Spanning Tree (MST) de todas as cepas de SGB depositadas no banco de dados de MLST. A figura mostra a alocação do ST-1, e ST-17 considerados mais virulentos, e dos outros ST descritos nesse estudo.



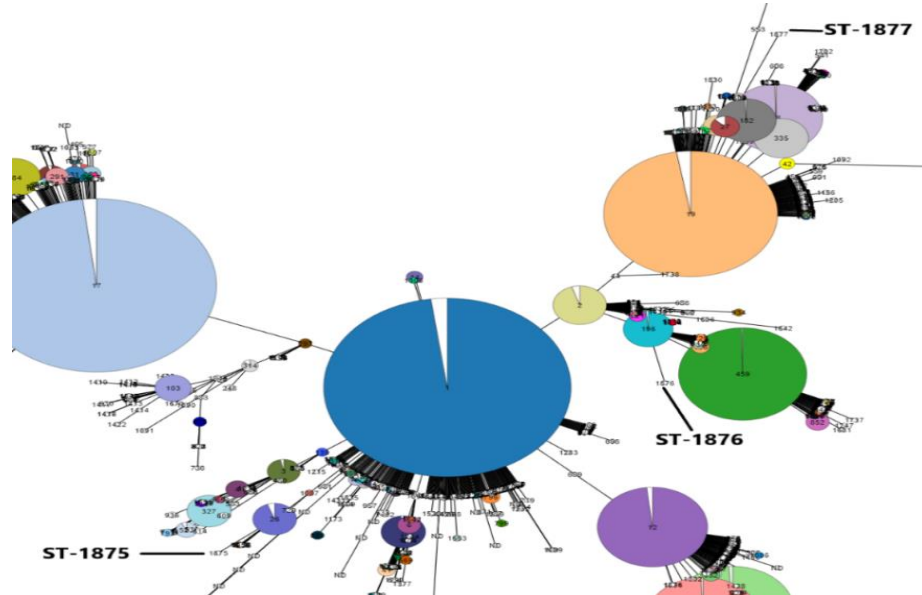
A Figura 5 mostra em detalhe como estão alocados os quatro ST que apresentaram perfil MDR, ST-17, ST1872, ST-1873 e ST-1874.

Figura 5 - MST com destaque no agrupamento formado pelas três cepas MDR classificadas como ST-1872, ST-1873 e ST-1874 e suas relações filogenéticas com outros ST próximos.



A Figura 6 destaca como estão alocados os outros ST que não foram classificados como MDR (ST-1875, ST-1876 e ST-1877).

Figura 6 - MST com destaque no agrupamento formado pelas três cepas não-MDR classificadas como ST-1875, ST-1876 e ST-1877 e suas relações filogenéticas com outros ST.



5 DISCUSSÃO

As infecções causadas por SGB podem causar abortos 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 e resistência aos antimicrobianos de 113 amostras de SGB recuperadas de 132 amostras clínicas recebidas no laboratório de microbiologia de microrganismo de referência, localizado no INCQS/FIOCRUZ. As amostras 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 amostras foi realizada por três métodos diferentes e nenhum deles foi suficiente para confirmar a espécie em todas as amostras testadas. Tanto a qPCR-HRM, quanto o MT e o CAMP apresentaram alguns resultados conflitantes quando comparados entre si, com algumas amostras 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, mas 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.

Os resultados da presente investigação sugerem que a utilização de dois métodos de menor custo que seriam o CAMP e a qPCR-HRM, pode representar uma alternativa a ser utilizada na rotina laboratorial, já que o custo de um termociclador para PCR em tempo real atualmente é de aproximadamente US\$ 20.000,00 enquanto que um sistema para análise proteômica por Maldi-Tof, tem o preço inicial em US\$ 450.000,00. No entanto, a identificação equivocada de cepas de *E. faecalis* como SGB pode ser diminuída pela confirmação com o MT, já que uma amostra identificada como SGB por qPCR-HRM e pelo CAMP, foi classificada como *E. faecalis* pelo MT. Por outro lado, a utilização do método de qPCR-HRM, permite a

identificação do patógeno diretamente a partir de material clínico quando não é possível o isolamento do agente etiológico o que não é possível com o MT.

O perfil de susceptibilidade encontrado entre as amostras analisadas, não foi muito diferente do que tem sido relatado em outros estudos no mundo, onde a maior resistência foi observada para os antimicrobianos eritromicina, clindamicina, azitromicina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima (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 amostras 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 antimicrobianos beta-lactâmicos foi muito baixo, seguindo outros estudos no Brasil e no mundo.

O estudo de Botelho et al (2018) apresentou um nível de resistência similar a este estudo, mas nenhum dos trabalhos no Brasil avaliou a resistência à azitromicina que foi de 32% das amostras 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 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 amostras 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 antimicrobianos diferentes e com cinco amostras resistentes a 4 classes. Essa classificação, descrita primeiramente por Magiorakos et al (2012), é utilizada para definir o nível de resistência de um patógeno bacteriano. No Brasil, poucos estudos que avaliaram a susceptibilidade do SGB informam se foram encontradas amostras MDR, apenas a susceptibilidade a determinados antimicrobianos sem realizar essa avaliação de acordo com a classe do antimicrobiano (BOTELHO et al., 2018).

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 amostras de SGB classificadas como MDR em relação à susceptibilidade aos antimicrobianos. 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-1876 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 e a cepa ST-1876 está relacionada ao ST-1 com 4 alelos iguais, podendo ser classificada como cc1, 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 de virulência importante desse organismo, que apresenta grande potencial de adquirir novos genes associados à resistência a antimicrobianos, 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 antimicrobianos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a identificação do SGB tanto pelos métodos convencionais, moleculares ou proteômicos, pode não apresentar a especificidade necessária para uma identificação acurada. Acreditamos 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 ou o MT se disponível. Caso a cepa não tenha sido isolada e apenas o material clínico esteja disponível, o único método possível seria a qPCR-HRM.

A susceptibilidade das cepas de SGB estudadas aos antimicrobianos beta-lactâmicos foi muito alta, o que pode indicar que possam ser utilizados como terapia de primeira linha para o tratamento.

Percentual significativo de resistência foi encontrado para os antimicrobianos sulfametoxazol-trimetoprima, tetraciclina, eritromicina e azitromicina, sendo também detectadas cepas com perfil MDR.

Foram descritos seis novos STs que foram depositados no banco de MLST de *S. 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.

Foi evidenciada aproximação genética de cepas MDR com o clone hipervirulento ST-17, o que é uma observação 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 que corrobora essa afirmação é que até agora apenas uma cepa do ST-17 tinha sido detectada no Brasil a partir de leite de vaca em 1987 e agora em nosso estudo em um grupo de apenas 11 amostras MDR um foi classificada como ST-17.

O monitoramento das infecções causadas por SBG é uma ação importante de vigilância em saúde, e deve ser implementada em todos os hospitais públicos e privados.

7 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.
- ANDRADE, R. **Proposta de seleção de fármacos aplicados ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos para gestantes com infecção do trato urinário em âmbito nacional**. 2017. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, [s. l.], 2017.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos**, ANVISA 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/introducao.htm [acesso em: 01/06/2021].
- AREAL A, NUNES S, MOREIRA M, FAUSTINO MA, CARDOSO L, SÁ C. **Infecção perinatal por *Streptococcus agalactiae* pode ser evitada: Prevalência da colonização em parturientes 42 no Hospital São Marcos, fatores de risco e a sua relação com a infecção perinatal**. Acta Pediátrica Portuguesa. 41(1):16-21, 2010.
- 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.
- 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.
- BERGSENG, 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, p. 223-228, 2007.

BISHARAT, N. et al. **Hyperinvasive Neonatal Group B Streptococcus Has Arisen from a Bovine Ancestor.** *Journal of Clinical Microbiology.* 42:2161-2167, 2004.

BORGER, I. **Estudos da Colonização por Streptococcus agalactiae em Gestantes Atendidas na Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro.** Niterói: [S.N], 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.

BOTELHO A.C. N. et al. *Streptococcus agalactiae* carriage among pregnant women living in Rio de Janeiro, Brazil, over a period of eight years. **PLoS One.** V. 5, 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.

CHAVES, B. **Estudo da colonização por Streptococcus agalactiae, de mulheres em idade fértil, na área metropolitana do Porto.** 2011. Dissertação (Mestre em Análises Clínicas) - Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, [S. l.], 2011.

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

CLOUSE, K. et al. High prevalence of Group B *Streptococcus* colonization among pregnant women in Amman, Jordan. **BMC Pregnancy Childbirth**, [S.I], v. 19, Article 177, 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.

- 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.
- FACKLAM, R. 2002. **What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes.** *Clinical Microbiology Reviews*. 15:613-630.
- FARLEY MM. **Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults.** *Clinical Infectious Diseases*. 33:556-61, 2001.
- 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.
- FIOLO, K. et al. Infection rate and Streptococcus agalactiae serotypes in samples of infected neonates in the city of Campinas (São Paulo), Brazil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, São Paulo, v. 34, p. 544-549, 2012.
- 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.
- GLASER, P., C. RUSNIOK, C. BUCHRIESER, F. CHEVALIER, L. FRANGEUL, T. MSADEK, M. ZOUINE, E. COUVÉ, L. LALIOUI, C. POYART, P. TRIEU-CUOT, AND F. KUNST. **Genome sequence of Streptococcus agalactiae, a pathogen causing invasive neonatal disease.** *Molecular Microbiology*. 45:1499-1513, 2002.
- GOMES, M. **Gênero Streptococcus spp.** Favet-Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, p. 1-76, 2013.
- 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.
- GOUVEA, Maria. **Streptococcus do grupo b: acurácia da metodologia xpert gbs para o diagnóstico da colonização materna e estudo da prevalência de recolonização em uma**

- coorte de gestantes infectadas pelo hiv.** 2016. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, [S. l.], 2016.
- 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.
- JACKSON LA, HILSDON R, FARLEY MM, HARRISON LH, REINGOLD AL, PLIKAYTIS BD, et al. **Risk factors for Group B Streptococcal disease in adults.** *Ann Intern Med.* 123:415- 20, 1995.
- JONES, N. et al. Multilocus sequence typing system for group B Streptococcus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 2530-2536, 2003.
- JORGENSEN JH, FERRARO MJ. **Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices.** *Clin Infect Dis.* 49(11):1749–1755, 2009.
- 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.
- LANCEFIELD, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **J. Exp. Med.** V. 57, P. 571–595, 1933.
- 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.
- 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.
- MCPHERSON, R. A. and M. R. PINCUS. **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods** (21 ed.). Saunders, Philadelphia, 2007.
- 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
- MURRAY, Patrick. **Microbiologia Médica**. [S. l.: s. n.], 2017.
- 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.

- 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.
- SANTOS, N. D. Q. **A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar.** *Texto & Contexto - Enfermagem*, v. 13, p. 64-70, 2004.
- SEALE, A. C. et al. Estimates of the Burden of Group B Streptococcal Disease Worldwide for Pregnant Women, Stillbirths, and Children. *Clinical Infectious Diseases*, Oxford, v. 65, p. S200–S219, 2017.
- 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.
- SOARES, G. C. T. et al. **Prevalence of Group B *Streptococcus* serotypes III and V in pregnant women of Rio de Janeiro, Brazil.** *Brazilian journal of microbiology*, v. 44, n. 3, p. 869–72, 2013.

TAMINATO, M.; et al. **Rastreamento de Streptococcus do grupo B em gestantes: revisão sistemática e metanálise**. 2011. Artigo de Revisão (Doutorado em Ciências) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, [S. l.], 2011.

TENOVER, F. C. **Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria**. The American journal of medicine, v. 119, n. 6, p. S3-S10, 2006.

ZIEMSKA, J.; RAJNISZ, A.; SOLECKA, J. **New perspectives on antibacterial drug research**. Central European Journal of Biology, v. 8, n. 10, p. 943-957, 2013.