

Matheus Amaral Leal

Potencial de virulência em amostras de *Streptococcus agalactiae* obtidas de fontes humanas e animais no Brasil



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2019**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do(a) Professor(a) Tatiana de Castro Abreu Pinto e coorientação de Danielle Cristina dos Santos Silva Alvim

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Matheus Amaral Leal**
DRE: 116038313

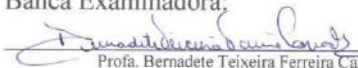
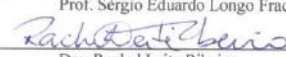

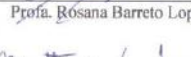
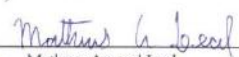
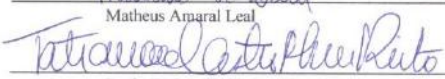
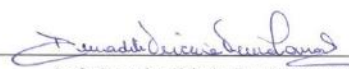
BANCA EXAMINADORA: Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho (Presidente)
Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza
Dra. Rachel Leite Ribeiro
Profa. Rosana Barreto Lopes Ferreira (Suplente)

Título da Monografia: **“Potencial de virulência em amostras de
Streptococcus agalactiae obtidas de fontes humanas e animais no
Brasil”**

Local: **Sala de reuniões do departamento de Microbiologia Geral/ IMPPG / CCS / UFRJ**
Data e hora de início: **13 de dezembro de 2019 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 8,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2019.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>8,5</u>	 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho
<u>8,5</u>	Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza 
<u>8,5</u>	Dra. Rachel Leite Ribeiro 
	Profa. Rosana Barreto Lopes Ferreira 
Aluno:	 Matheus Amaral Leal
Orientador:	 Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto
Coorientador:	MSc. Danielle Cristina dos Santos Silva Alvim
Coordenador de TCC	 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

CIP - Catalogação na Publicação

LL435p Leal, Matheus Amaral
Potencial de virulência em amostras de
Streptococcus agalactiae obtidas de fontes humanas
e animais no Brasil / Matheus Amaral Leal. -- Rio
de Janeiro, 2019.
53 f.

Orientadora: Tatiana de Castro Abreu Pinto.
Coorientadora: Danielle Cristina dos Santos
Silva Alvim.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. Streptococcus agalactiae. 2. fatores de
virulência. 3. pilus. 4. BibA. 5. sobrevivência em
sangue humano. I. Pinto, Tatiana de Castro Abreu,
orient. II. Alvim, Danielle Cristina dos Santos
Silva, coorient. III. Título.

Agradecimentos

Pode parecer clichê, mas primeiramente agradecerei a Deus, pois sem Ele eu não seria quem eu sou e não estaria onde estou. Obrigado meu Senhor pela Sua graça. Obrigado por até aqui ter me sustentado.

Agradeço imensamente aos meus Pais, meu irmão, meus tios, meus primos e minha sobrinha por me apoiarem, me amarem, me incentivarem e possibilitarem que eu pudesse estar conquistando esse bacharel.

Agradeço aos meus amigos, pois sem eles eu não conseguiria me manter são e feliz nos momentos mais difíceis. Agradeço a família que eu tenho desde o ensino médio, que com o tempo foi crescendo e que me traz muitas alegrias e orgulho por podermos estar juntos trilhando as novas fases da vida, muito obrigado Raiane, Julliana, Kamilly, Alícia, Suzana, Matheus, Andre e Victor. Agradeço a família que esteve mais presente durante minha graduação, meus colegas de bancada, meus conselheiros, meu Squad, muito obrigado Danielle, Cris, Carol, Débora e Marcelo. Agradeço ao irmão que encontrei nessa graduação e que sem ele com certeza eu não teria ido tão bem quanto fui nas provas, obrigado por me ensinar tanto, sobre a microbiologia e sobre a vida, muito obrigado por todos os seus conselhos, André. Agradeço ao amigo que surgiu tão de repente e que se tornou a pessoa mais próxima que eu já tive, muito obrigado por sempre estar ao meu lado, Breno. Agradeço a Deus por ter colocado vocês no meu caminho e por todo carinho e amor que compartilhamos.

Agradeço a Professora Tatiana de Castro Abreu Pinto pelos ensinamentos e pela oportunidade de me ajudar a iniciar a minha carreira científica. Agradeço também a equipe do LCPM, do Laboratório de Apoio Biotecnológico, do LIMM e do LaDIMDIP.

Agradeço banca examinadora desse trabalho pela disponibilidade, paciência e cuidado em analisar nosso projeto e contribuir para a melhoria do mesmo.

Agradeço a CAPES e a FAPERJ pelo apoio financeiro.

RESUMO

Matheus Amaral Leal

Potencial de virulência em amostras de *Streptococcus agalactiae* obtidas de fontes humanas e animais no Brasil

Orientador: Tatiana de Castro Abreu Pinto

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Streptococcus agalactiae tem importância na medicina humana e veterinária, pois é um importante agente de mastite em bovinos e de infecções invasivas neonatais em humanos, além de causar outras doenças. Fatores de virulência associados à capacidade de aderência e de evasão do sistema imune podem contribuir para a patogenicidade do microrganismo em diferentes hospedeiros e sugere-se que a habilidade das amostras de GBS em causar doença possa ser de natureza multifatorial. Assim, essa pesquisa tem como objetivo geral avaliar aspectos envolvidos na virulência deste microrganismo entre amostras de GBS isoladas de humanos e animais no Brasil. Para tanto, foi investigada a presença dos genes envolvidos na produção de variantes de pilus e gene envolvido na produção de BibA através de PCR convencional, além de avaliar a capacidade de sobrevivência em sangue humano e a capacidade de autoagregação celular. Os resultados desse estudo foram relacionados com a capacidade de produção de biofilme, descrita em trabalhos anteriores. Todas as 149 amostras avaliadas albergavam ao menos uma das variantes de pilus pesquisadas, sendo a variante PI-2a associada com amostras de fontes humanas e a variante PI-2b com amostras de fontes animais. A grande maioria (cerca de 95%) das 149 amostras analisadas apresentava o gene *bibA*, sendo amplicons de 400-600 pb associados com amostras de fontes humanas e amplicons de 700-900 pb associados com amostras de fontes animais. Mais de 80% dentre as 22 amostras de GBS selecionadas para avaliação da capacidade de autoagregação foram capazes de autoagregar *in vitro*. A forte capacidade de autoagregação celular foi associada com amostras albergando somente uma variante de pilus (PI-1, PI-2a ou PI-2b), e não foi necessariamente associada a produção forte de biofilme. Uma proposta de classificação dos fenótipos de autoagregação celular foi desenvolvida e precisa ser melhor avaliada. Todas as 10 amostras selecionadas para avaliação da capacidade de sobrevivência em sangue humano total foram capazes de sobreviver em sangue humano total *in vitro*, e a maior capacidade de sobrevivência foi associada com amostras obtidas de colonização vaginal/anal humana. A presença de genes de pilus, de *bibA* e a capacidade de autoagregar e sobreviver em sangue parece ser uma característica comum na espécie *S. agalactiae*, assim como é a produção de biofilme, embora diferentes perfis contemplando esses quatro aspectos pareçam ser específicos a alguns sítios ou hospedeiros.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*, fatores de virulência, pilus, BibA, sobrevivência em sangue humano, autoagregação celular.

ABSTRACT

Matheus Amaral Leal

Potencial de virulência em amostras de *Streptococcus agalactiae* obtidas de fontes humanas e animais no Brasil

Orientador: Tatiana de Castro Abreu Pinto

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Streptococcus agalactiae is important in human and veterinary medicine as it is an important agent of mastitis in cattle and invasive neonatal infections in humans, besides causing other diseases. Virulence factors associated with the adherence and immune system evasion capacity may contribute to the microorganism pathogenicity in different hosts and it is suggested that the ability of GBS strains to cause disease may be multifactorial in nature. Thus, this research aims to evaluate aspects involved in the virulence of this microorganism among GBS strains isolated from humans and animals in Brazil. To this end, the presence of genes involved in the production of pilus variant and gene involved in BibA production was investigated by conventional PCR, as well as to evaluate the survival capacity in human blood and the capacity of GBS cell autoaggregation. The results of this study were related to biofilm production results, described in previous works. All 149 strains evaluated harbored at least one of the pilus gene variants, being PI-2a associated with human strains and PI-2b with animal strains. The vast majority of them (around 95%) also had bibA gene, with amplicons of 400-600 bp associated with human strains and amplicons of 700-900 bp associated with animal strains. More than 80% of 22 GBS strains selected to evaluate autoaggregation capacity were able to autoaggregate in vitro. The strong ability to autoaggregate was associated with strains harboring only one pilus variant genes (PI-1, PI-2a or PI-2b), and was not necessarily associated with a strong biofilm production. A proposal for classifying GBS strains according to autoaggregation phenotypes was developed and needs further evaluation. All 10 strains selected to evaluate survive in whole human blood capacity were able to survive in whole human blood in vitro, and a stronger ability in this regard was associated with strains recovered from vaginal/anal colonization. Presence of pilus genes, bibA gene and the ability to autoaggregate and survive in whole human blood seem to be common characteristics in the species *S. agalactiae*, as also is the production of biofilms, although different profiles covering these four features seem to be specific to certain niches and hosts.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, virulence factors, pilus, BibA, survival in human blood, cell autoaggregation.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Streptococcus agalactiae</i>	1
1.2 Infecções causadas por GBS em animais	2
1.3 Infecções causadas por GBS em humanos.....	4
1.4 Epidemiologia molecular de GBS.....	6
1.5 Fatores envolvidos na virulência de GBS.....	7
1.5.1 Cápsula polissacarídica.....	8
1.5.2 Pilus.....	8
1.5.3 BibA (adesina bacteriana imunogênica de estreptococos do grupo B).....	9
1.5.4 Outras proteínas produzidas por GBS.....	10
1.5.5 Produção de biofilme.....	11
1.5.6 Capacidade de autoagregação celular.....	13
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Amostras bacterianas.....	16
4.2 Obtenção de DNA bacteriano.....	16
4.3 Detecção de genes codificadores das variantes de pili	17
4.4 Detecção de gene envolvido na produção de BibA.....	18
4.5 Avaliação da capacidade de autoagregação celular <i>in vitro</i>	18
4.6 Avaliação da capacidade de sobrevivência em sangue humano <i>in vitro</i>	19
4.7 Análises estatísticas.....	20
5 RESULTADOS	21
5.1 Ocorrência e distribuição de genes codificadores das variantes de pili	21
5.2 Ocorrência e distribuição de gene codificador de BibA.....	22
5.3 Capacidade de autoagregação celular.....	25
5.4 Capacidade de sobrevivência em sangue humano.....	30
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSOES	37
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus agalactiae*

Os estreptococos são bactérias do filo Firmicutes e de grande importância na medicina humana. Atualmente são descritas 129 espécies e 23 subespécies no gênero *Streptococcus* (Euzéby, 2019), sendo as espécies mais estudadas *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus pneumoniae*. São microrganismos nutricionalmente exigentes, crescendo bem em ágar sangue, em atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) e caldo nutriente suplementado com glicose (Teixeira, Pinto e Merquior, 2015; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2017).

Ao serem submetidos à coloração de gram, são visualizados em microscopia óptica como cocos gram-positivos em cadeias. Apresentam colônias puntiformes brancas ou cinzentas em placas contendo ágar sangue de carneiro e podem apresentar alfa (quando há hemólise parcial), beta (quando a lise das hemácias é completa) ou gama-hemólise (quando há a ausência de hemólise).

Os estreptococos são catalase negativos, e os testes bioquímicos e fisiológicos que podem ser empregados para auxílio na identificação de amostras de origem clínica são: avaliação da hemólise, teste de sensibilidade a bacitracina, teste de sensibilidade à optoquina, teste de bile-solubilidade, teste do fator CAMP, teste da bile-esculina, detecção da enzima hidrolítica de PYR (L-pirrolidona-β-naftilamida) e crescimento em NaCl 6,5% (Tabela 1). O conjunto de resultados pode ser usado para prever a espécie (Teixeira, Pinto e Merquior, 2015; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2017; Rosa-Fraile e Spellerberg, 2017).

Os estreptococos podem ser classificados segundo Lancefield, o que diferencia as espécies de acordo com o carboidrato C, ou o ácido teicoico no caso dos grupos D e H (Elliot, 1962; Rosan e Argenbright, 1982), dividindo-os em 20 grupos sorológicos (A-H e K-V).

Streptococcus agalactiae, a espécie abordada neste estudo, é conhecido também como estreptococos do grupo B (GBS, do inglês group B *Streptococcus*), devido à composição do carboidrato C (ramnose, N-acetilglicosamina e galactose). As principais características utilizadas para ajudar na identificação desta espécie são a resistência à bacitracina, a produção do fator CAMP e, apesar de sua hemólise poder ser variável, a maioria das amostras obtidas de fontes humanas apresentam beta-hemólise (Lancefield, 1934; Teixeira, Pinto e Merquior, 2015; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2017; Rosa-Fraile e Spellerberg, 2017). Uma característica da espécie é a presença de capsula polissacarídica, que pode ser usada para identificação em sorotipos, para GBS já foram identificados 10 sorotipos (Ia, Ib, II a IX) (Paoletti, Bradford e Paoletti, 1999; Tsolia *et al.*, 2003; Slotved *et al.*, 2007). Testes moleculares também podem

ser utilizados como ferramentas mais rápidas e precisas de identificação da espécie, como a reação de polímerase em cadeia (PCR) para detecção de genes espécie-específicos como o *dltS*, gene de uma histidina-quinase específica de GBS (Morozumi *et al*, 2015; Arora *et al.*, 2017). Testes sorológicos, como aqueles visando a detecção do carboidrato C do grupo B, também são utilizados. MALDI-TOF MS (abreviatura do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*) também tem sido proposto como uma alternativa mais rápida para identificação de espécies bacterianas, incluindo *S. agalactiae* (Binghuai *et al.*, 2014; Rosa-Fraile e Spellerberg, 2017).

A identificação precisa deste microrganismo é necessária uma vez que *S. agalactiae* é um dos principais causadores de meningite, pneumonia e bacteremia em neonatos, sendo também um comum agente de mastite bovina (Teixeira, Pinto e Merquior, 2015; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2017).

Tabela 1. Esquema simplificado para diferenciação dos principais grupos ou espécies de estreptococos encontrados em espécimes clínicos de origem humana (Teixeira, Pinto e Merquior, 2015).

Testes bioquímicos ou fisiológicos	Espécie/ categoria			
	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>	Grupo C e G
Grupo sorológico	B	A	-	C ou G
Hemólise	Beta	Beta	Alfa	Beta
CAMP	+	-	-	-
Bacitracina	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente
Optoquina	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente
Bile esculina	-	-	-	-
Bile solubilidade	-	-	+	-
Hidrólise do PYR	-	+	-	-
NaCl 6,5%	+	-	-	-

1.2 Infecções causadas por GBS em animais

Diversos estudos têm demonstrado *S. agalactiae* como agente de infecções em animais como vacas, cães, peixes, camundongos, elefantes, porquinhos-da-india, lagartos-esmeralda,

ratos, cobras, coelhos, cabras, porcos, tartarugas, sapos, focas, golfinhos, lhamas, entre outros (Yildirim *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2010; Delannoy *et al.*, 2013; Morach *et al.*, 2017; Tavella *et al.*, 2018). Nesse contexto, GBS se destaca como um dos principais agentes causadores de mastite em bovinos, caprinos e outros mamíferos ruminantes (Keefe, 2012; Klaas e Zadoks, 2017; Ruegg, 2017).

A mastite é a infecção da glândula mamária, e pode ter mais de 130 diferentes agentes causais, sendo GBS um dos agentes etiológicos mais comuns em vacas leiteiras. A doença causa uma redução significativa no bem-estar do animal e consequentes perdas econômicas aos produtores e à indústria de laticínios em todo o mundo (Elhaig e Selim, 2014; Almeida *et al.*, 2016; Lakew, Fayera e Ali, 2019). Pode ser classificada em mastite clínica ou subclínica. A mastite clínica é definida pela presença de pus, coágulos, flocos, sangue no leite ou pelo inchaço do quarto mamário ou úbere e percepção de dor. Na forma subclínica não há alterações visíveis no úbere e no leite, porém a composição deste produto sofre mudanças consideráveis nos seus elementos como acidez, presença de álcool e elevada contagem de células somáticas (Mdegela, 2009; Lipkens *et al.*, 2019).

A transmissão do agente causador de mastite normalmente ocorre pelo contato de vacas doentes com vacas saudáveis, ou através das mãos ou equipamentos dos ordenhadores (Lakew, Fayera e Ali, 2019). Recentemente foi sugerido que a transmissão de GBS pode também acontecer pelo ambiente, através do contato do animal com a cocheira, bebedouro, chão e paredes da área de alimentação, além das fezes de outros animais. Nesse contexto, são indicadas como medidas preventivas o aprimoramento da prática da ordenha e a limpeza correta dos úberes no momento da ordenha (Jorgensen *et al.*, 2016; Cobo-Ángel *et al.*, 2018; Svennesen *et al.*, 2019).

Durante as últimas décadas, alguns países desenvolvidos testemunharam uma redução drástica na ocorrência de GBS em gados leiteiros devido à implementação de programas especificamente projetados para o controle da mastite bovina. Entre outros aspectos, tais programas são baseados na administração de infusões antimicrobianas a todo o rebanho para tratar e prevenir a doença. O sucesso desses programas se sustenta no fato de esse microrganismo permanece susceptível à maioria dos agentes antimicrobianos de escolha, incluindo as penicilinas semi-sintéticas (Keefe, 1997; Radostits *et al.*, 2000; Rubhun, 2000; Gomes e Henriques, 2015; Ruegg, 2017).

No Brasil, existem 180 formulações antimicrobianas aprovadas para tratamento e prevenção de mastite bovina (<http://www.sindan.org.br>). Os principais antimicrobianos

utilizados no tratamento e na prevenção das infecções causadas por *S. agalactiae* em animais são penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos e lincosamidas (Tenhagen *et al.*, 2006). Dessa forma, os antibióticos ainda se apresentam como principal ferramenta para tratar e prevenir mastite em rebanhos leiteiros (Erskine *et al.*, 2002; Roberson, 2012; Klaas e Zadoks, 2017; Krömker e Leimbach, 2017).

No Brasil, um estudo realizado no período de fevereiro de 2012 a janeiro de 2013, em uma fazenda produtora de leite bovino em Minas Gerais, demonstrou que a mastite era a condição que mais contribuía para o impacto econômico na indústria leiteira, sendo a redução da produção de leite de 54,9%, estimando um prejuízo de US\$ 91.552,69 (Guimarães *et al.*, 2017). Outro estudo, também realizado em Minas Gerais em 2004 com dados de 2002, estimou que o custo de cada caso de mastite clínica é de US\$ 100,43, levando em conta os custos de exames, medicamentos, mão-de-obra adicional, descarte de leite, descarte precoce ou morte de vacas e honorários do médico veterinário. Apesar de defasados, estes valores evidenciam a importância da doença na lucratividade dos sistemas de produção de leite e justificam os esforços para manter a doença sob controle (Carneiro *et al.*, 2004).

Apesar dos esforços terem sido direcionados para o controle dessas infecções em diversos países, muitas fazendas leiteiras em todo o mundo continuam a apresentar circulação predominante de GBS, ou vêm observando um recente ressurgimento no número de casos de mastite por esse microrganismo (Kalmus *et al.*, 2011; Klimienė *et al.*, 2011; Mweu *et al.*, 2012; Bi *et al.*, 2016; Jorgensen *et al.*, 2016).

1.3 Infecções causadas por GBS em humanos

Streptococcus é um gênero frequente na microbiota de humanos saudáveis, estando presente em vários sítios, como vias respiratórias e trato intestinal. *S. agalactiae* é encontrado na microbiota vaginal de 1% a 34% da população gestante mundial, variando de acordo com as regiões geográficas do mundo, podendo se apresentar como colonizador assintomático desse sítio (Kwatra *et al.*, 2016; Russell *et al.*, 2017; Clouse *et al.*, 2019). GBS também pode ser encontrado em adultos não gestantes em sítios como orofaringe, trato geniturinário, trato gastrointestinal e outros, tanto como colonizador assintomático quanto como agente infeccioso (Chrenien *et al.*, 1979; Chaiwarith *et al.*, 2011; Falagas *et al.*, 2006; Roloff *et al.*, 2018; Collin *et al.*, 2019).

Na maioria das infecções neonatais associadas a GBS, o microrganismo é transmitido verticalmente da mãe para o filho antes ou durante o nascimento. Infecções adquiridas antes

do nascimento ocorrem pela capacidade de *S. agalactiae* penetrar na cavidade amniótica através da placenta íntegra e causar infecções fulminantes no feto (Teixeira, Pinto e Merquior, 2015; Yadeta *et al.*, 2018).

Infecções neonatais por GBS desenvolvidas em até sete dias de vida são classificadas como síndrome precoce, nas quais a aquisição do microrganismo ocorre ainda no útero em consequência da aspiração de líquido amniótico contaminado ou durante a passagem pelo canal vaginal colonizado. As infecções que se desenvolvem entre uma semana e três meses de vida são classificadas como síndrome tardia, e a aquisição do microrganismo geralmente ocorre pelo contato com a própria mãe, com outras crianças infectadas ou até mesmo com o ambiente hospitalar (Schuchat e Wenger, 1994; Gibbs, Schrag e Schuchat, 2004; Faro *et al.*, 2010; CDC, 2010; Schrag e Verani, 2013; Doare e Heath, 2013; Teixeira, Pinto e Merquior, 2015). Dentre as manifestações clínicas precoces mais comuns em neonatos estão pneumonia, artrite séptica, sepse, meningite e síndrome da angústia respiratória. Já a manifestação clínica tardia mais comum é a bacteremia associada à meningite (Furyk, Swann e Molyneux, 2011; Teixeira, Pinto e Merquior, 2015; Gao *et al.*, 2018).

Em gestantes, GBS pode causar infecção urinária, sepse grave, tromboflebite séptica, corioamnionite, endometrite puerperal, celulite e fascite, além de levar ao aborto ou parto prematuro (Furyk, Swann e Molyneux, 2011; Carroll, 2014; Teixeira, Pinto e Merquior, 2015). Em adultos não gestantes, os quadros clínicos mais comuns são bacteremia, pneumonia, infecções respiratórias e geniturinárias, e infecções de pele e tecidos moles. A maioria dos casos relatados em adultos não gestantes está associada a fatores clínicos apresentados pelos pacientes, como diabetes mellitus, câncer, idade avançada, cirrose hepática, terapia com corticosteroides, HIV e outros estados de imunocomprometimento (Falagas *et al.*, 2006; Lambertsen, 2010; Chaiwarith *et al.*, 2011; Collin *et al.*, 2019).

Para prevenir as infecções neonatais causadas por GBS, *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) publicou em 1996 recomendações que consistem no rastreamento do microrganismo em todas as mulheres entre a 35ª e a 37ª semana de gestação utilizando culturas vaginais e retais (CDC, 1996, 2000, 2010). Todas as gestantes que apresentam culturas positivas para GBS devem ser submetidas ao programa de Profilaxia Antibiótica Intraparto ou IAP (sigla em inglês para *Intrapartum Antibiotic Prophylaxis*) (CDC, 1996, 2000, 2010).

O agente antimicrobiano de escolha para a administração intraparto é ampicilina, apesar de que cepas de GBS com susceptibilidade reduzida a beta-lactâmicos vêm sendo

esporadicamente relatadas desde 2008 (Kimura *et al.*, 2008; Dahesh, 2008; Nagano *et al.*, 2012; Nagano *et al.*, 2014; Seki *et al.*, 2015; Cooper, Abbott e Gould, 2016; Bonofiglio *et al.*, 2018). Além disso, frequentemente são observados episódios de falha terapêutica, nos quais, apesar da amostra bacteriana apresentar-se fenotipicamente sensível aos beta-lactâmicos, não há sucesso na descolonização da paciente. Para os casos de gestantes alérgicas a penicilinas, são recomendados os antibióticos cefazolina para casos com baixo risco de anafilaxia, e clindamicina ou eritromicina para casos com alto risco de anafilaxia (Pearlman, Pierson e Faix, 1998; Schrag *et al.*, 2002; CDC, 2010).

A implementação de IAP resultou na redução marcante da incidência de síndrome neonatal precoce por GBS, principalmente nos Estados Unidos e em países da Europa (Schrag *et al.*, 2002; CDC, 2007). Estudos mostraram, contudo, que a recolonização da mãe ocorre em até 65% dos casos após o tratamento com antibióticos; e não houve mudanças na incidência da síndrome de início tardio (infecções ocorrendo de sete dias até três meses de idade) (Schrag *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2004; Manning *et al.*, 2008).

A Sociedade Brasileira de Pediatria (Costa, 2011; SBP, 2018) recomenda a política de rastreamento de gestantes e tratamento daquelas colonizadas desde 2011, mas a aderência a essas recomendações parece ser ainda baixa (cerca de 20% dos casos) no Brasil (Le Doare *et al.*, 2017).

1.4 Epidemiologia molecular de GBS

A classificação em tipos capsulares tem sido utilizada como base para estudos epidemiológicos e de patogenicidade de GBS. A distribuição dos sorotipos pode variar de acordo com vários aspectos, incluindo a região geográfica, quadro clínico, faixa etária do paciente e a origem da amostra.

O sorotipo III é o mais frequente entre neonatos com infecção invasiva, enquanto o sorotipo V tem destaque entre amostras de adultos não gestantes (Lamy *et al.*, 2006; Tazi *et al.*, 2010; Bellais *et al.*, 2012; Florindo *et al.*, 2014; Alhazmi, Hurteau e Tyrrell, 2016). Entretanto, cinco sorotipos (Ia, Ib, II, III e V) são os mais prevalentes no mundo, assim como no Brasil (Melin e Efstratiou, 2013; Russel *et al.*, 2017; Hall *et al.*, 2017; Botelho *et al.*, 2018; Do Nascimento *et al.*, 2019; Furfaro *et al.*, 2019; Madrid *et al.*, 2019). Somente no Japão os sorotipos VI e VIII, raramente encontrados em outras regiões do mundo, são frequentes (Weisner *et al.*, 2004; Tazi *et al.*, 2011; Edmond *et al.*, 2012; Melin e Efstratiou, 2013; Morozumi *et al.*, 2016).

Em animais é observada a prevalência dos mesmos sorotipos capsulares detectados em humanos, com variações em sua distribuição de acordo com a região geográfica (Simões *et al.*, 2007; Palmeiro *et al.*, 2010; Corrêa *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2013; Rato *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013).

Complementar à classificação em sorotipos, a técnica de MLST (*multilocus sequence typing*) permite classificar as amostras de *S. agalactiae* circulantes no mundo em ST (*sequence type*) e CC (complexo clonal), sendo cada CC composto por um número variável de STs que apresentam um mesmo ancestral comum.

De forma geral, a maioria das cepas de *S. agalactiae* obtidas de humanos pode ser agrupada em quatro principais complexos clonais: CC1, CC17, CC19 e CC23 (Sorensen *et al.*, 2010; Da Cunha *et al.*, 2014). Estudos mostram que os CCs 1, 19 e 23 estão frequentemente associados à colonização assintomática em gestantes e são identificados como bem adaptados à mucosa vaginal (Jones *et al.*, 2003; Manning *et al.*, 2008; Teatero *et al.*, 2017), mas também são encontrados como causa de infecções invasivas inclusive em adultos (Jones *et al.*, 2003). Já o CC17 é considerado o clone hipervirulento de *S. agalactiae*, sendo essas cepas responsáveis pela grande maioria dos casos de meningite neonatal (Jones *et al.*, 2003; Poyart *et al.*, 2008; Florindo *et al.*, 2014). Estudos evolutivos e análises filogenéticas comparativas fornecem evidências de que o CC17, apesar de associado a infecções invasivas em neonatos atualmente, tenha um ancestral comum a clones de *S. agalactiae* circulantes entre bovinos (Bisharat *et al.*, 2004; Héry-Arnaud *et al.*, 2007). Já entre as amostras de GBS de origem bovina, destacam-se os CCs 61 e 67, que são exclusivamente encontrados nesses hospedeiros (Bisharat *et al.*, 2004; Sukhnanand *et al.*, 2005; Sorensen *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013; Springman *et al.*, 2014). Mais recentemente, contudo, o CC103 vem se destacando como um clone emergente em mastite bovina em vacas leiteiras na Europa e parte do leste da Ásia (Zadoks *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013).

1.5 Fatores envolvidos na virulência de GBS

Fatores de virulência são mecanismos, estruturas ou metabólitos bacterianos utilizados por bactérias no desenvolvimento do processo infeccioso. São utilizados para evadir o sistema imunológico, aderir a tecidos, invadir células ou produzir danos ao hospedeiro. Para que um patógeno seja capaz de estabelecer doença, normalmente são necessárias três etapas: contato, invasão e disseminação (Taddei e Martinez, 2015). A colonização e a persistência no hospedeiro são fatores críticos para as doenças mediadas por *S. agalactiae*, e compreender a

interação de fatores que conduzem à transmissão e à infecção persistente é essencial para o desenvolvimento de abordagens que levem à prevenção dessas doenças (CDC, 2002; Rosini e Margarit, 2015).

1.5.1 Cápsula polissacarídica

O principal fator de virulência desta espécie é a cápsula polissacarídica. A presença de uma cápsula polissacarídica com composição variável permitiu que os estreptococos do grupo B fossem classificados em diferentes tipos capsulares (Lancefield, 1934). Atualmente são descritos dez sorotipos: Ia, Ib, II a IX (Paoletti, Bradford e Paoletti, 1999; Tsolia *et al.*, 2003; Slotved *et al.*, 2007). Cada um desses polissacarídeos capsulares consiste em um polímero de peso molecular elevado, composto de unidades monossacarídicas repetidas de galactose, glicose, N-acetilglicosamina e ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico). Estes polissacarídeos capsulares são essenciais para o microrganismo, atuando na inibição da fagocitose e da ativação do complemento na ausência de anticorpos específicos, além de induzirem a produção de citocinas pró-inflamatórias (Teixeira, Pinto e Merquior, 2015).

Os polissacarídeos capsulares vêm sendo considerados os principais alvos para a elaboração de vacinas contra *S. agalactiae* e devem incluir os sorotipos mais prevalentes associados a doença (Baker e Edwards, 2003; Slotved *et al.*, 2007; Hillier *et al.*, 2009; Nobbs, Lamont e Jenkinson, 2009; Melin e Efstratiou, 2013; Dzanibe e Madhi, 2018). Atualmente está em desenvolvimento uma vacina trivalente, contendo os sorotipos Ia, III e V, e sendo proposta uma vacina pentavalente contendo Ia, Ib, II, III e V (Kobayashi *et al.*, 2019).

1.5.2 Pilus

Pili são compostos por polímeros proteicos ancorados na parede celular que se projetam para fora da superfície bacteriana. Essas estruturas são formadas por subunidades ligadas covalentemente, chamadas de proteína estrutural principal (BP do inglês *backbone protein*) e proteínas auxiliares (AP1 e AP2 do inglês *ancillary proteins*), localizadas na ponta e na base da estrutura, respectivamente (Rosini *et al.*, 2006; Teixeira, Pinto e Merquior, 2015). Três variantes de pili já foram identificadas até o momento em GBS e os genes codificadores estão alocados em ilhas genômicas denominadas de PI-1, PI-2a e PI-2b (PI abreviatura do inglês *pilus islets*) (Rosini *et al.*, 2006). Acredita-se que todas as amostras de GBS possuam ao menos uma das três variantes de pili já descritas (Rosini *et al.*, 2006; Margarit *et al.*, 2009).

Essas estruturas já foram relacionadas à aderência e/ou invasão a células epiteliais (Dramsi *et al.*, 2006; Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009), células endoteliais de capilares cerebrais (Maisey *et al.*, 2007, Lazzarin *et al.*, 2017), células pulmonares (Krishnan *et al.*, 2007), migração transepitelial (Pezzicoli *et al.*, 2008), assim como formação de biofilme (Rinaudo *et al.*, 2010), aderência a glicoproteínas da saliva (Brittan e Nobbs, 2014) e resistência a fagócitos (Maisey, Doran e Nizet, 2008). A contribuição de pilus para a patogênese de GBS foi inicialmente investigada em cepas expressando a variante PI-2a. Mutantes para esta variante apresentaram diminuição na aderência e invasão ao epitélio humano (Maisey *et al.*, 2007; Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009). Além disso, já foi demonstrado que a proteína AP1-2a medeia o recrutamento de neutrófilos e melhora a penetração na barreira hematoencefálica (BHE) de camundongos (Banerjee *et al.*, 2011).

1.5.3 BibA (adesina bacteriana imunogênica de estreptococos do grupo B)

BibA é uma adesina imunogênica que pode estar presente em amostras de GBS. É uma proteína ancorada na parede celular de aproximadamente 58% até o momento, envolvida na aderência bacteriana às células epiteliais humanas (Santi *et al.*, 2007; 2009). É possível também encontrar uma forma solúvel dessa proteína em meio de cultura com crescimento de *S. agalactiae* (Santi *et al.*, 2007; 2009). Um mutante nocaute no gene codificador desta proteína demonstrou menor capacidade de aderência às células epiteliais do pulmão, intestino e cérvix (Santi *et al.*, 2007). A superexpressão de BibA, por sua vez, resultou no aumento da aderência às células epiteliais humanas (Santi *et al.*, 2007). Além disso, foi relatado que BibA ajuda na sobrevivência de GBS em sangue humano através da interferência com a via clássica do complemento, conferindo atividade anti-fagocítica (Santi *et al.*, 2007; 2009). Dessa forma, BibA parece ser um fator de virulência com múltiplas ações em GBS, contribuindo para a colonização da mucosa, aderência às células hospedeiras e resistência à fagocitose.

Apesar da localização do gene *bibA* no genoma de GBS ser conservada em todas as amostras analisadas até o momento (locus *gbs2018*), é relatada uma alta variabilidade na sequência interna deste gene, levando a descrição de 4 diferentes variantes (I, II, III e IV) e diferentes alelos (Brochet *et al.*, 2006; Santi *et al.*, 2007; 2009), que podem se correlacionar com fonte de isolamento e/ou sorotipo. Uma dessas variantes, a variante IV, apesar de inicialmente descrita como um alelo do gene *bibA*, se revelou ser na verdade um outro gene, o gene *hvgA* (abreviatura do inglês *GBS hypervirulent adhesin*). Este gene é exclusivamente associado com amostras do ST17, ocupando o locus *gbs2018* nestas cepas e atuando como um

marcador do clone hipervirulento de GBS (Tazi *et al.*, 2010). Sugere-se que a proteína HvgA, também presente na parede celular, esteja envolvida na aderência de GBS a células do epitélio intestinal, a células epiteliais coróides e a células do endotélio vascular; assim, esta proteína seria a responsável pelo tropismo de ST17 pelas meninges favorecendo a translocação do intestino e da barreira hematoencefálica pelo microrganismo (Tazi *et al.*, 2010). Curiosamente, as variantes de *bibA* detectadas entre amostras de origem bovina parecem apresentar alta similaridade genética com o gene *hvgA*, destacando mais uma vez a íntima relação genética que o clone hipervirulento em humanos (ST17) apresenta com clones de circulação em bovinos (Lamy *et al.*, 2006).

1.5.4 Outras proteínas produzidas por GBS

Dentre as proteínas presentes na superfície celular bacteriana, incluem-se a proteína de ligação à laminina (Lmb), proteínas de ligação ao fibrinogênio e a fibronectina (FbsA, FbsB, CspA), sendo ambas importantes para mediar a aderência de GBS à matriz extracelular (MEC).

Já as proteínas ricas em serina (Srr-1 e Srr-2) permitem a aderência à queratina humana presente em tecidos do pulmão, pele e vagina (Gutekunst, Eikmanns e Reinscheid, 2004; Lindahl, Stalhammar-Carlénalm e Areschoug, 2005; Maisey, Doran e Nizet, 2008; Nobbs, Lamont e Jenkinson, 2009; Parker *et al.*, 2016).

A proteína ScpB (ou C5a peptidase) atua clivando e inativando o fator C5a do sistema complemento, o qual é responsável pelo recrutamento de neutrófilos ao sítio de infecção (Herbert, Beveridge e Saunders, 2004; Maisey, Doran e Nizet, 2008).

A família de proteínas Alp (do inglês *alpha-like proteins*) inclui as proteínas C α , Rib, R e Alp 1 a 4 (Wastfelt *et al.*, 1997; Lachenauer *et al.*, 2000; Bolduc *et al.*, 2002; Maisey, Doran e Nizet, 2008), que se ligam a células epiteliais humanas e induzem a produção de anticorpos protetores específicos.

A proteína C β também está localizada na superfície da célula bacteriana, e se liga à porção Fc de IgAs e apresenta propriedades ligantes ao fator H do sistema complemento, sugerindo um papel importante na evasão do sistema imune (Heden, Frithz e Lindahl, 1991; Gravekamp *et al.*, 1999; Berner *et al.*, 2002; Jarva *et al.*, 2003; Lindahl, Stalhammar-Carlénalm e Areschoug, 2005; Maisey, Doran e Nizet, 2008).

Entre as enzimas secretadas por GBS, pode-se destacar a hialuronidase, que tem atividade hidrolítica sobre o ácido hialurônico presente na MEC de tecidos animais, do cordão

umbilical, fluido sinovial, cartilagem, cérebro, entre outros, permitindo, assim, a disseminação do microrganismo pelo rompimento da barreira física tecidual (Hynes e Walton, 2000; Teixeira, Pinto e Merquior, 2015). Além disso, outra enzima importante é a hemolisina, responsável pela característica beta-hemolítica de GBS e é uma citolisina formadora de poros em membranas de diferentes células, sendo não imunogênica e estável em relação ao oxigênio (Nizet, 2002). Esta enzima está associada à infecção pulmonar por contribuir para a penetração através das barreiras epiteliais e pulmonares (Doran, Liu e Nizet, 2003; Hensler *et al.*, 2005), e promoção da infiltração de leucócitos no fluido cérebro-espinhal (Doran *et al.*, 2002). O fator CAMP é caracterizado pela ligação a imunoglobulinas IgG e IgM pela porção Fc, levando a formação de poros nas membranas celulares do hospedeiro e consequente lise celular (Christie, Atkins e Munch-Petersen, 1944; Lang e Palmer, 2003). Por ser uma característica comum a todas as amostras de GBS, a produção de fator CAMP é um dos atributos usados na identificação laboratorial (Hensler *et al.*, 2008).

A maioria das espécies de estreptococos orais possuem antígenos da família I/II, que estão envolvidos na autoagregação celular, formação de biofilme e interação com células eucarióticas e matriz extracelular do hospedeiro (Zhang *et al.* 2006; Nobbs, Lamont e Jenkinson, 2009; Brady *et al.* 2010; Maddocks *et al.* 2011; Franklin *et al.* 2013; Chuzeville *et al.* 2015). Recentemente, análises *in silico* mostraram a presença de genes codificantes de proteínas desta família em GBS e a possibilidade de aquisição do gene pelo GBS através de elementos conjugativos e integrativos (Chuzeville, *et al.*, 2015, Rego, *et al.*, 2016). Em GBS esse gene foi associado com interação com *Candida albicans* com adesão ao epitélio vaginal (Pidwill, *et al.*, 2017) e adesão ao endotélio cerebral (Deng *et al.*, 2019).

1.5.5 Produção de biofilme

A formação de comunidades em biofilmes pode facilitar a sobrevivência, a proliferação microbiana e ainda aumentar a resistência a antimicrobianos, já que organismos dentro de biofilmes podem subverter a privação de nutrientes, mudanças de pH, componentes do sistema imune do hospedeiro, ação de produtos químicos e ação de antimicrobianos. Além disso, a proximidade entre as células bacterianas dentro de um biofilme favorece a troca de material genético entre elas, o que pode favorecer também a disseminação de determinantes de resistência antimicrobiana e de patogenicidade (Costerton, Stewart e Greenberg, 1999; Stewart e Costerton, 2001; Parsek e Singh, 2003; Jefferson, 2004; Lewis, 2005; Hall-Stoodley

e Stoodley, 2005; Manetti *et al.*, 2007; Dufour, Leung e LaVesque, 2010; Rosini e Margariti, 2015).

Um biofilme é definido como uma comunidade microbiana séssil caracterizada por células ligadas fortemente a um substrato, uma interface e/ou umas às outras, embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, composta de polissacarídeos, proteínas e/ou DNA extracelular, os quais são produzidos por essa comunidade (Costerton, Stewart, Greenberg, 1999; Donlane Costerton, 2002). Estima-se que mais de 65% das infecções bacterianas em humanos envolvam a produção de biofilmes (Lewis, 2007).

As primeiras evidências da participação de *S. agalactiae* em biofilmes foram propostas por Marrie e Costerton em 1983, os quais encontraram biofilmes com *S. agalactiae* em dispositivos intrauterinos (Marrie e Costerton, 1983). A partir da década de 2000, uma crescente atenção tem sido voltada para esse tema, e alguns estudos têm demonstrado que a habilidade de produção de biofilme por essa bactéria *in vitro* pode estar associada a outros fatores de virulência. Alguns autores demonstraram que a formação de biofilme pode ser associada ao tipo de pilus (Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009; Margarit *et al.*, 2009; Rinaudo *et al.*, 2010; Parker *et al.*, 2016; Ferreira, 2017), ou ao tipo capsular (Xia *et al.*, 2015; Ferreira, 2017).

No entanto, as informações disponíveis ainda são majoritariamente restritas a amostras de *S. agalactiae* recuperadas de colonização e infecção humana, sendo ainda poucos os trabalhos que demonstram o envolvimento de amostras de *S. agalactiae* de origem animal com a formação de biofilme. Apesar disso, com base na aparência histopatológica e ultraestrutural das bactérias dentro dos tecidos das glândulas mamárias bovinas, acredita-se que os biofilmes bacterianos estejam comumente envolvidos também com essa doença (Costerton, Stewart e Greenberg, 1999). Os estudos publicados nesse sentido apontam que há uma tendência de amostras de origem animal se apresentarem como melhores produtoras de biofilme quando comparadas com amostras de origem humana (Ebrahimi *et al.*, 2013; Parker *et al.*, 2016; Pang *et al.*, 2017; Kaczorek *et al.*, 2017; Ferreira, 2017). Na glândula mamária de animais, as comunidades semelhantes a biofilme podem facilitar a sobrevivência microbiana aumentando a resistência a antibióticos e a proteção contra mecanismos de defesa do hospedeiro (Melchior, Fink-Gremmels, Gaastra, 2006; Rosini e Margarit, 2015). Além disso, foi encontrada uma correlação positiva entre a formação de biofilme e a aderência às células epiteliais mamárias de bovinos (BMECs). A capacidade de aderência às BMECs é importante para as bactérias colonizarem a glândula mamária lactante, apesar do fluxo de leite, que

resulta na excreção de células bacterianas planctônicas (Leigh, 1999). Portanto, é razoável especular que a aderência eficiente e a forte formação de biofilme permitem com que as cepas adaptadas aos bovinos colonizem e persistam na glândula mamária bovina, onde são capazes de sobreviver por longos períodos de tempo levando a um quadro crônico (Pang *et al.*, 2017)

1.5.6 Capacidade de autoagregação celular

A colonização e a infecção dos tecidos-alvo por *S. agalactiae* são dependentes da capacidade de aderir e persistir nas superfícies epiteliais das mucosas do hospedeiro. Portanto, a aderência tem um papel fundamental na patogênese do microrganismo, seja aderindo em células do hospedeiro, na matriz extracelular ou em superfícies inertes. Além disso, muitas bactérias tem a capacidade de se aderir a outras células bacterianas da mesma espécie. Essa capacidade é denominada de autoagregação (Trunk, Khalil e Leo, 2018).

Autoagregação é um dos primeiros passos na formação de biofilme, já anteriormente relatado neste trabalho. A autoagregação está normalmente associada a proteínas de superfície celular, incluindo pilus e fimbria, mas também pode estar associada a exopolissacarídeos, DNA extracelular, ou efeitos eletrostáticos (Martinez, 1983; Jonsson e Wadström, 1984; O'Toole e Kolter, 1998; Misawa e Blaser, 2000; Farrell e Quilty, 2002; Das *et al.*, 2010; Arenas *et al.*, 2014; Formosa-Dague *et al.*, 2016; Trunk, Khalil e Leo, 2018).

A autoagregação pode ser dada de duas maneiras: as bactérias planctônicas podem se aderir a uma superfície do substrato como células únicas e, em seguida, recrutar mais células planctônicas por agregação para formar uma única microcolônia, ou células planctônicas agregadas em suspensão podem se instalar na superfície do substrato (O'Toole e Kolter, 1998; Beloin *et al.*, 2008; Dunne 2002; Kragh *et al.*, 2016; Shabayek e Spellerberg, 2018; Trunk, Khalil e Leo, 2018). Além disso, autoagregação também pode estar associada a vantagens competitivas quando há redução da quantidade de nutrientes, na resistência a toxinas ou antibióticos e na sobrevivência ao sistema imune (Galdiero *et al.*, 1988; Hahn, Moore e Höfle, 2000; Fexby *et al.*, 2006; Blom *et al.*, 2010; Corno *et al.*, 2016; Kragh *et al.*, 2016; Trunk, Khalil e Leo, 2018).

1.5.7 Capacidade de sobreviver em sangue humano

Diversos patógenos desenvolveram mecanismos para sobreviver dentro de macrófagos, evitando assim a resposta imune do hospedeiro. Os patógenos são englobados pelos macrófagos e outros fagócitos através de um processo chamado fagocitose (Thi,

Lambertz e Reiner, 2012). A maioria das bactérias que entram na corrente sanguínea são eliminadas através da ativação do sistema complemento pela ação das proteínas na superfície bacteriana ou pelo processo chamado opsonofagocitose. O sistema complemento consiste em conjunto de proteínas solúveis presentes no sangue, com o papel de opsonizar ou lisar células invasoras. A opsonização refere-se ao revestimento do patógeno por anticorpos e/ou proteínas do complemento, de modo que ele se torne mais facilmente capturado e destruído pelas células fagocíticas (Nonaka, 2014; Thau e Mahajan, 2018). No entanto, quando esses mecanismos não são ativados corretamente ou quando as bactérias possuem mecanismos de evasão imunológica, o indivíduo fica sujeito a infecções graves, como bacteremia e meningite, associadas a alta morbimortalidade (Maten *et al.*, 2017).

Em um estudo para analisar as alterações no transcriptoma que ocorrem durante a cultura de curto prazo no sangue humano utilizando uma cepa de *S. aureus*, foi demonstrado que além de diversas mudanças metabólicas, a expressão de aproximadamente 25% de todos os genes de *S. aureus* que codificam mecanismos de defesa e fatores de virulência conhecidos e putativos é alterada, e que a expressão de 15% desses genes é aumentada, incluindo aqueles que codificam a proteína de adesão intercelular B (icaB), a proteína de ligação ao fibrinogênio extracelular (efb), o precursor da proteína A de ligação à imunoglobulina G (spa), dentre outros (Malachowa e DeLeo, 2011).

Os mecanismos que capacitam o GBS a sobreviver no sangue ainda não foram completamente elucidados, porém já foi demonstrado que este microrganismo é capaz de sobreviver intracelularmente em fagócitos (Valentin-weigand *et al.*, 1996, Sagar *et al.*, 2013). Rorir e colaboradores (2016) demonstraram que cepas de GBS do ST-17 sobreviveram intracelularmente por mais tempo que cepas de outros STs, e que cepas do sorotipo III são mais capazes de sobreviver às condições de estresse dentro do fagossomo em relação a outros sorotipos (Rorir *et al.*, 2016). Estudos já mostraram que alguns fatores de virulência desta espécie podem contribuir para essa capacidade de sobrevivência em sangue humano, dentre eles as preoteínas de superfície BibA, C β , e ScpB (Bohnsack *et al.*, 1997; Santi *et al.*, 2007; Maisey, Doran e Nizet, 2008; Santi *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Streptococcus agalactiae é um importante agente de mastite em bovinos e de infecções invasivas neonatais em humanos, o que demonstra a ampla gama de infecções que pode ser associada a esta espécie. Fatores de virulência associados à capacidade de aderência e de evasão do sistema imune podem contribuir para a patogenicidade do microrganismo nos diferentes hospedeiros. Em estudo recente do grupo, foi demonstrado que amostras de GBS de origens humana e animal isoladas no Brasil são, em sua maioria, fortemente produtoras de biofilme (Alvim, 2019); característica esta que pode estar envolvida tanto com a aderência quanto com a evasão do sistema imune do hospedeiro.

No entanto, a habilidade das amostras de GBS em causar doença é de natureza multifatorial, e outros aspectos como a variante de pilus, a presença de BibA, o tipo capsular, a capacidade de autoagregação e a sobrevivência em sangue humano podem ser características importantes para a patogênese das infecções causadas por GBS. Contudo, ainda há poucos estudos sobre a ocorrência de alguns desses fatores de virulência entre diferentes amostras de GBS, especialmente entre amostras circulantes no Brasil.

Dessa forma, nosso estudo visa contribuir para o melhor entendimento desses aspectos e sua relação com características epidemiológicas e moleculares entre amostras de GBS circulantes no Brasil, agregando conhecimento sobre a distribuição de genótipos e fenótipos potencialmente envolvidos na virulência de amostras obtidas de humanos e animais em nosso meio nos últimos 40 anos, ajudando a entender os fatores que contribuem para a disseminação do microrganismo e ampliando as possibilidades de sua prevenção.

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar alguns aspectos envolvidos na virulência de GBS, incluindo a ocorrência de genes envolvidos com a produção de pilus e da proteína BibA e a capacidade de autoagregação celular e de sobrevivência em sangue humano, entre amostras isoladas de humanos e animais no Brasil, tendo como estratégias:

- Avaliar a ocorrência e distribuição de genes das variantes de pili;
- Avaliar a ocorrência e distribuição do gene *bibA*;
- Avaliar a capacidade de autoagregação celular *in vitro*;
- Avaliar a capacidade de sobrevivência em sangue humano *in vitro*;
- Correlacionar os resultados obtidos com os resultados de fenótipo de produção de biofilme determinados previamente para avaliar uma possível associação entre eles.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras bacterianas

Neste estudo foram incluídas 149 amostras de *Streptococcus agalactiae* isoladas no Brasil entre 1978 e 2019, sendo 33 de origem animal (mastite bovina e caprina) e 116 de origem humana (casos de infecção ou colonização assintomática). Todas as amostras pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Cocos Patogênicos e Microbiota (LCPM), encontrando-se estocadas em solução de skim-milk com 10% de glicerol a -80 °C. As amostras foram isoladas, identificadas e parcialmente caracterizadas durante a execução e desenvolvimento de trabalhos prévios (Duarte *et al.*, 2005; Fernandes, 2011; Pinto *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2014; Ferreira, 2017; Botelho *et al.*, 2018; Alvim, 2019). A tabela 2 ilustra o número de amostras avaliadas por fonte de isolamento.

Tabela 2. Distribuição das amostras de *Streptococcus agalactiae* incluídas no presente estudo de acordo com a fonte de isolamento.

Fonte clínica de isolamento	Número de amostras
Mastite animal (bovina e caprina)	33
Colonização vaginal/anal humana	43
Colonização de orofaringe humana	10
Infecção urinária humana	37
Infecção invasiva humana ¹	10
Outros ²	16
Total	149

¹Foram consideradas amostras recuperadas de fluidos e sítios originalmente estéreis, como sangue, líquido, líquido ascítico, placenta e líquido amniótico.

²Foram consideradas amostras recuperadas de feridas cirúrgicas obstétricas, lavado broncoalveolar, esperma, canal auditivo externo, próstata, umbigo de neonato e de fontes desconhecidas.

4.2 Obtenção de DNA bacteriano

Para obtenção de DNA das amostras de GBS analisadas, foi utilizada a resina Chelex 100 (Bio-Rad, EUA) conforme descrito por Pinto e colaboradores (2013). Um volume de 200 µL de solução contendo Chelex a 5% e proteinase K (0,2 mg/mL) foi utilizado para a preparação de uma suspensão bacteriana densa (suficiente para encher uma alça calibrada de 1 µL) a partir de um cultivo recente. Estas suspensões foram incubadas a 56 °C por uma hora e, após homogeneização, incubadas a 95 °C por 10 minutos. O material foi centrifugado (10000 g/ 3 minutos) e o sobrenadante utilizado como fonte de DNA molde para todas as reações de

amplificação gênica por PCR descritas a seguir. O DNA foi quantificado utilizando o equipamento Qubit® fluorometer (Invitrogen, EUA) e armazenado a -20°C até seu uso.

4.3 Detecção de genes codificadores das variantes de pili

Todas as 149 amostras de GBS foram incluídas nesta etapa do trabalho. Cada um dos genes codificadores das variantes de pilus (PI-1, PI-2a, PI-2b) foi detectado por PCR uniplex convencional utilizando protocolo e iniciadores descritos por Otaguiri e colaboradores (2013) (Tabela 3). A mistura para a reação de amplificação teve um volume final de 25 µL contendo 1U de Taq DNA polimerase (Sinapse inc, EUA) e seu respectivo tampão 1X, 200 µM de cada deoxinucleosídeo trifosfatado (Invitrogen, EUA), 0,5 µM de cada iniciador, 2 mM de MgCl₂ e 50 ng de DNA.

A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 1 minuto, extensão de 45 segundos a 72 °C e extensão final de 5 minutos a 72°C. Um total de 5 µL de cada produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%. O marcador molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) foi utilizado para estimar o tamanho do amplicon. Para corar o gel foram usados 37,5 µL do corante Unisafe dye (Uniscience, EUA) em 500 mL de água destilada, e a presença da banda do tamanho esperado (Tabela 3) foi evidenciada com a ajuda de um transiluminador com luz UV e aceita como resultado positivo. Foram utilizadas como controles positivos das variantes PI-1, PI-2a e PI-2b as amostras de *S. agalactiae* CL 9567, 7256 e CL 5604, respectivamente; todas pertencentes à nossa coleção de culturas.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes codificadores das variantes de pilus entre as amostras de *S. agalactiae*

Variante de pilus	Sequência dos iniciadores ^a	Tamanho do amplicon ^b
PI-1	F: AACCACTAGCAGGCGTTGTCTTTG R: TGAGCCCCGAAATTCTGATATGCC	147 pb
PI-2a	F: GCCGTTAGATGTTGTCTTCGTACT R: TTTACTGCGGTCCCAAGAGCTTC	117 pb
PI-2b	F: AAGTCTTGACCAAGGATACGACGC R: ATCGTGTTACTTGCCCTGCGTA	152 pb

^aF: forward; R: reverse; ^bpb: pares de base

4.4 Detecção de gene envolvido na produção de BibA

Todas as 149 amostras de GBS foram incluídas nesta etapa do trabalho. O gene codificador de BibA foi amplificado por PCR convencional de acordo com protocolo e iniciadores descrito por Santi e colaboradores (2009), utilizando os iniciadores forward: 5'AATCGAAAACAACGTTGGAAAG e reverse: 5'AAACCAGGCTTCATCAGTCATT. A mistura para a reação de amplificação teve um volume final de 20 µL contendo 4 µL de MasterMix 5x (Sinapse inc, Brasil), 0,2 µM de cada iniciador e 50 ng de DNA.

A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 2 minutos e extensão final de 4 minutos a 72°C. Um total de 5 µL de cada produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%. O marcador molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) foi utilizado para estimar o tamanho do amplicon. Para corar o gel foram usados 37,5 µL do corante Unisafe dye (Uniscience, EUA) em 500 mL de água destilada, e a presença da banda evidenciada com a ajuda de um transiluminador com luz UV foi aceita como resultado positivo. Como controle positivo foi utilizada a amostra de *S. agalactiae* CL 7017, pertencente a nossa coleção de culturas.

4.5 Avaliação da capacidade de autoagregação celular *in vitro*

Foram incluídas nesta etapa do trabalho 22 amostras de GBS (tabela 5), selecionadas de forma a representar a variedade de fontes de isolamento, sorotipos, variantes de pilus e de *bibA* encontrada no estudo. Para análise da capacidade de autoagregação celular, foi realizado o ensaio com base no protocolo descrito por Pope e colaboradores (2011) com algumas modificações.

As amostras de GBS foram semeadas em placas de ágar sangue e incubadas a 37° C em atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) por 24 horas. A partir do crescimento, 5 a 10 colônias foram inoculadas em 5 mL de THB e incubadas a 37° C em atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) por 24 horas. Após o período de incubação, o tubo contendo o crescimento foi centrifugado a 14000 g por 10 minutos e o meio sobrenadante descartado. O sedimento foi homogeneizado em 10 mL de salina em um tubo estéril, o qual foi apoiado sobre uma superfície, onde ficou imóvel em temperatura ambiente por 60 minutos.

Nos tempos inicial (0) e final (60 min), foram coletados da parte superior da suspensão (0,5 cm abaixo da interface ar-líquido) 100 µL, os quais foram depositados em uma placa de

microtitulação de poliestireno de 96 poços com fundo chato (NEST, China), que foi então submetida à leitura da densidade ótica a 600 nanômetros (DO_{600nm}) em leitor de placas de microtitulação (*SpectraMax Plus 384 Absorbance Microplate*). Ao final foi calculado o fator de agregação celular, que consistiu na média de redução dos valores de DO_{600nm}, sendo a redução considerada o resultado da subtração do valor de DO_{600nm} final a partir do inicial.

Foram incluídos na placa também poços contendo apenas salina estéril (controle branco). Cada amostra foi avaliada em triplicata e em três ensaios independentes. Como controle positivo da capacidade autoagregação celular foi utilizada a amostra de *Streptococcus mutans* ATCC 20556; e foram consideradas incapazes de autogregar as amostras de GBS que apresentaram fatores de agregação significativamente menores do que o da amostra controle.

4.6 Avaliação da capacidade de sobrevivência em sangue humano *in vitro*

Foram incluídas nesta etapa do trabalho 10 amostras de GBS (tabela 6), selecionadas de forma a representar a variedade de fontes de isolamento, sorotipos, variantes de pilus e de *bibA* encontradas no estudo. Para análise da capacidade de sobrevivência em sangue humano total, foi realizado o ensaio conforme o protocolo descrito por Corrêa e colaboradores (2010), o qual encontra-se esquematizado na figura 1.

As amostras de GBS foram semeadas em placas de ágar sangue e incubadas a 37° C em atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) por 24 horas. A partir do crescimento foi preparada uma suspensão a turbidez de 0,5 na escala de McFarland, da qual foi retirado 1 µL e adicionado em um eppendorf com 99 µL de salina, ao qual então foram adicionados 200 µL de sangue humano total fresco (recém coletado). Essa suspensão foi diluída a 10 e 100 vezes, e 10 µL de cada diluição foram inoculados de forma confluyente em placas de ágar sangue. Essa primeira semeadura correspondeu ao tempo inicial do experimento. A seguir, os tubos contendo GBS e sangue humano foram incubados a 37°C sob leve agitação (35 oscilações por minuto) durante 3 horas e, após esse período, novas diluições (10 e 100 vezes) foram preparadas e inoculadas de forma confluyente em placas de ágar sangue. Essa segunda semeadura correspondeu ao tempo final do experimento. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, foram contadas as colônias nos tempos inicial e final para calcular a taxa de sobrevivência, conforme a seguinte fórmula: $(UFC \text{ por ml tempo final} * \text{diluição} / UFC \text{ por ml tempo inicial} * \text{diluição}) * 100$.

Cada amostra foi avaliada em triplicata e em três ensaios independentes. O sangue foi coletado de três doadores voluntários, jovens adultos e saudáveis, utilizando tubos de coleta com heparina (BD Vacutainer, EUA). Foram utilizados os mesmos doadores em cada ensaio.

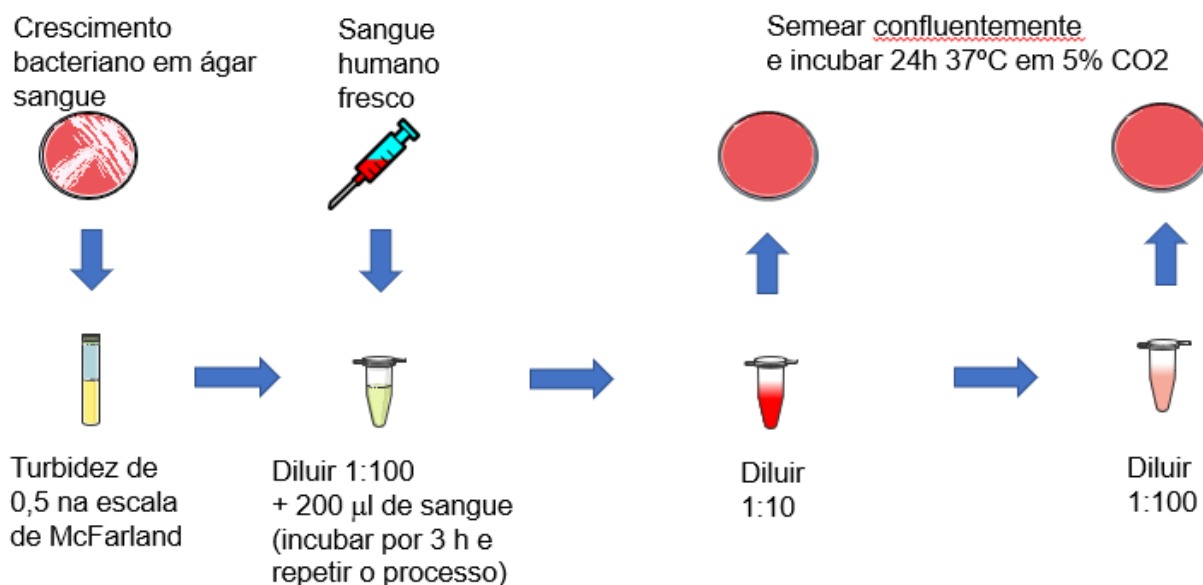


Figura 1. Esquema demonstrando as etapas do ensaio de sobrevivência em sangue humano total realizado no presente estudo.

4.7 Análises estatísticas

Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do software Prism v5.0 (GraphPad, EUA), utilizando o teste t de Student não pareado (quando comparados dois grupos apenas) ou o método de one-way ANOVA com comparações múltiplas pelo teste de Tukey (quando comparados três ou mais grupos entre si). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Ocorrência e distribuição de genes codificadores das variantes de pili

Todas as 149 amostras albergavam ao menos um dos genes codificadores de variante de pilus, apresentando um dos seguintes cinco perfis: PI-1 (n=13), aquelas que apresentaram somente o gene PI-1; PI-2a (n=55), aquelas que apresentaram somente o gene PI-2a; PI-2b (n=19), aquelas que apresentaram somente o gene PI-2b; PI-1 e PI-2a (n=43), aquelas que apresentaram o gene PI-1 juntamente com o gene PI-2a; PI-1 e PI-2b (n=19), aquelas que apresentaram o gene PI-1 juntamente com o gene PI-2b.

O perfil PI-2a foi o mais frequente (37%) entre as 149 amostras analisadas, mas a distribuição dos perfis variou de acordo com a fonte de isolamento (Figura 2). De forma geral, PI-2a (com ou sem PI-1) foi a variante mais frequente (78%) em amostras de fontes humanas enquanto PI-2b (com ou sem PI-1) foi o mais frequente (73%) entre amostras de mastite animal.

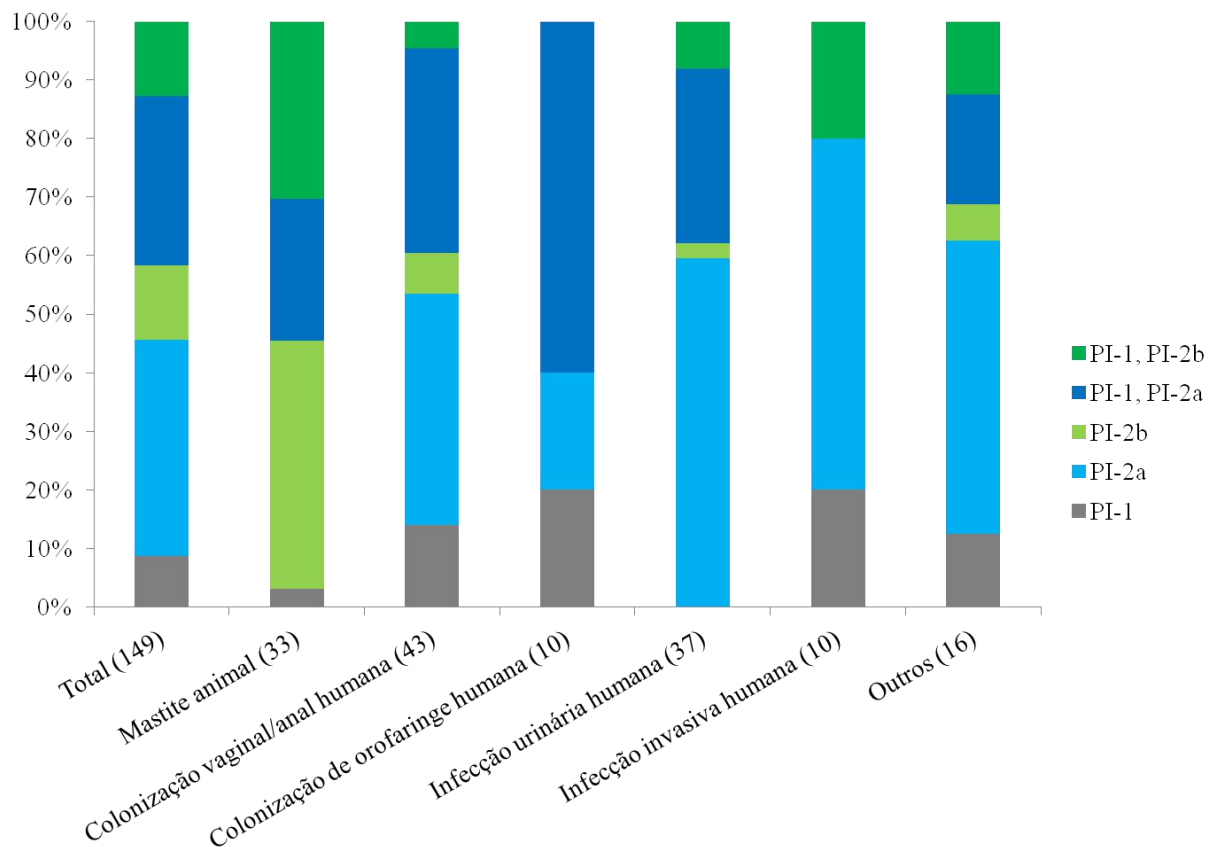


Figura 2. Distribuição dos genes das variantes de pilus de acordo com a fonte de isolamento entre 149 amostras de *S. agalactiae*.

Quando analisada a distribuição das variantes de pilus de acordo com o fenótipo de produção de biofilme (forte ou fraca produção) previamente determinado por Alvim (2019) e as diferentes fontes de isolamento, foi observado que a forte produção de biofilme foi mais associada à presença da variante PI-2a (com ou sem PI-1) entre as amostras de origem humana e da variante PI-2b (com ou sem PI-1) entre as amostras de mastite animal (Figura 3).

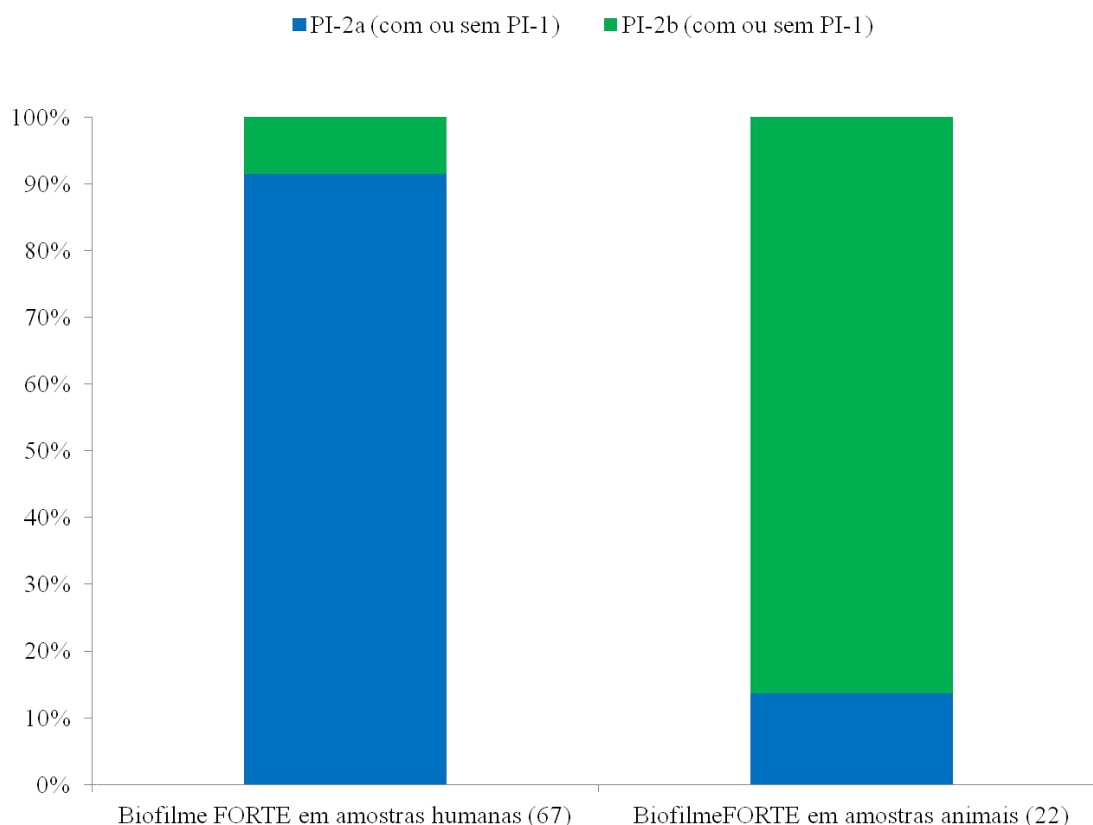


Figura 3. Distribuição dos genes das variantes de pilus entre 89 amostras de *S. agalactiae* fortemente produtoras de biofilme (conforme previamente determinado por Alvim, 2019) de acordo com a fonte de isolamento.

5.2 Ocorrência e distribuição de gene codificador de BibA

Entre as 149 amostras analisadas, 141 (94,6%) apresentavam o gene *bibA*; e entre elas foram observados três diferentes tamanhos de produtos de amplificação: entre 400 e 600 pb (81 amostras), entre 700 e 900 pb (57 amostras) ou 2000 pb (3 amostras).

Notou-se que os tamanhos estimados dos produtos de amplificação apresentaram distribuição diferente de acordo com a fonte de isolamento (Figura 4). Enquanto amplicons de 700-900 pb foram mais frequentes em amostras de mastite animal, amplicons de 400-600 pb

foram os mais comuns nas amostras de diferentes fontes humanas, exceto entre amostras de colonização de orofaringe, entre as quais 60% apresentaram amplicons de 700-900 pb.

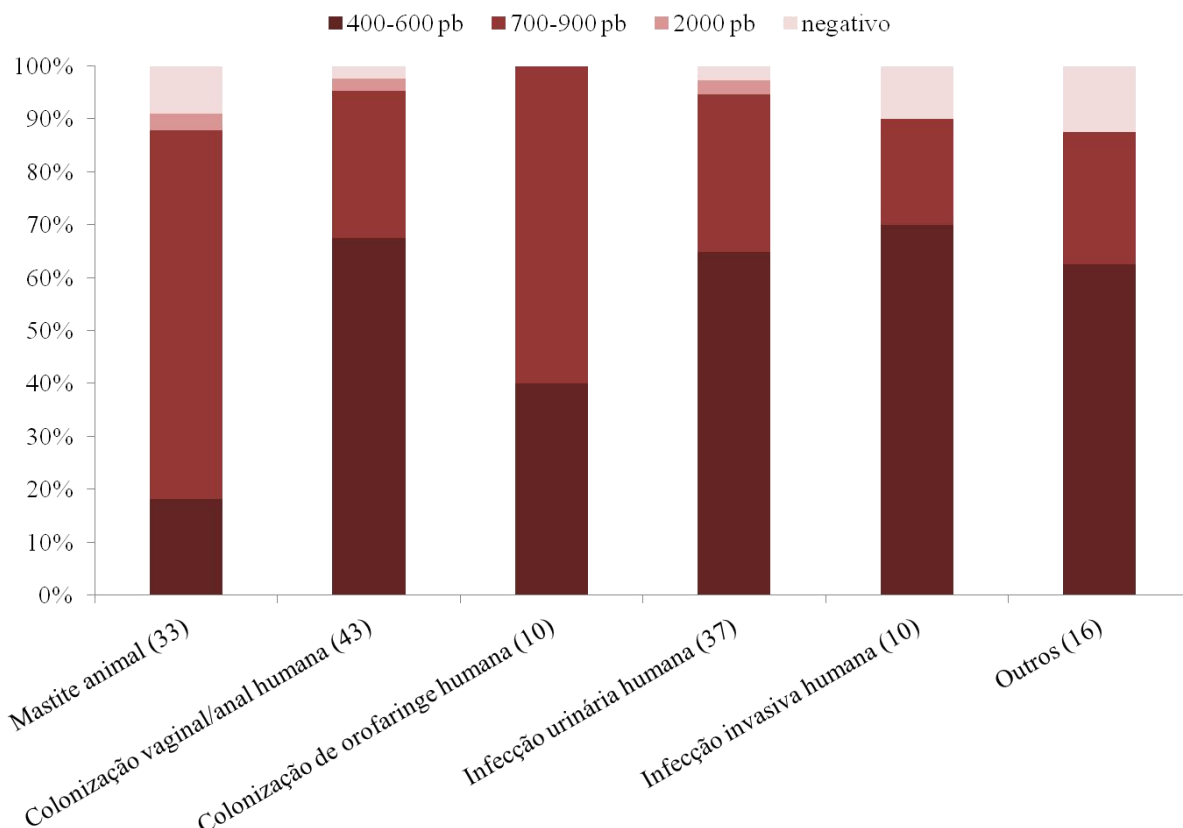


Figura 4. Distribuição dos diferentes tamanhos de produtos de amplificação do gene *bibA* entre 149 amostras de *S. agalactiae* de acordo com a fonte de isolamento.

Além disso, em amostras de origem humana, a geração de amplicons entre 700 e 900 pb foi proporcionalmente maior (50%) em amostras apresentando somente a variante de pilus PI-1, em comparação aos outros perfis de diferentes variantes de pilus (Tabela 4). Já entre as amostras de mastite animal, amplicons de 700-900 pb foram os mais comuns independente do perfil de pilus (Tabela 4). Amplicons de 2000 pb, por sua vez, foram encontrados somente em amostras albergando a variante de pilus PI-2a (com ou sem PI-1) independente de fonte de isolamento.

As oito amostras negativas para o gene *bibA* foram representadas por três amostras de mastite animal e cinco amostras de fontes humanas diversas, incluindo sangue, secreção vaginal, umbigo de neonato e urina, além de uma amostra cuja fonte é desconhecida. Todas

elas, exceto a obtida de urina humana, apresentavam a variante de pilus PI-2b (com ou sem PI-1).

Tabela 4. Distribuição dos diferentes tamanhos de produtos de amplificação do gene *bibA* entre 149 amostras de *S. agalactiae* de acordo com a fonte de isolamento e o perfil de variantes de pilus.

Fonte de isolamento	Perfil de pilus (N)	400-600 pb % (N)	700-900 pb % (N)	2000 pb % (N)	<i>bibA</i> -negativo % (N)
Fontes humanas (116 amostras)	PI-1 sozinho (12)	50% (6)	50% (6)	0	0
	PI-2a ± PI-1 (90)	68% (61)	29% (26)	2% (2)	1% (1)
	PI-2b ± PI-1 (14)	50% (7)	21% (3)	0	27% (4)
	Total	74	35	2	5
Mastite animal (33 amostras)	PI-1 sozinho (1)	0	100% (1)	0	0
	PI-2a ± PI-1 (8)	25% (2)	63% (5)	12% (1)	0
	PI-2b ± PI-1 (24)	17% (4)	71% (17)	0	12% (3)
	Total	6	23	1	3

Quando analisada a distribuição dos amplicons de *bibA* de 400-600 pb e 700-900 pb de acordo com o fenótipo de produção de biofilme (previamente estabelecido por Alvim, 2019), observou-se que a maioria das amostras de origem humana fortemente produtoras de biofilme (62,5%) apresentavam amplicons de 400-600 pb enquanto que a grande maioria das amostras de mastite animal fortemente produtoras de biofilme (78%) geravam amplicons de 700-900 pb (Figura 5).

Todas as três amostras apresentando produtos de amplificação de 2000 pb eram fortemente produtoras de biofilme. Entre as oito amostras negativas para o gene *bibA*, todas as três de mastite animal e mais uma de origem humana (obtida de urina) foram classificadas como fortemente produtoras de biofilme; as outras quatro eram fracamente produtoras de biofilme.

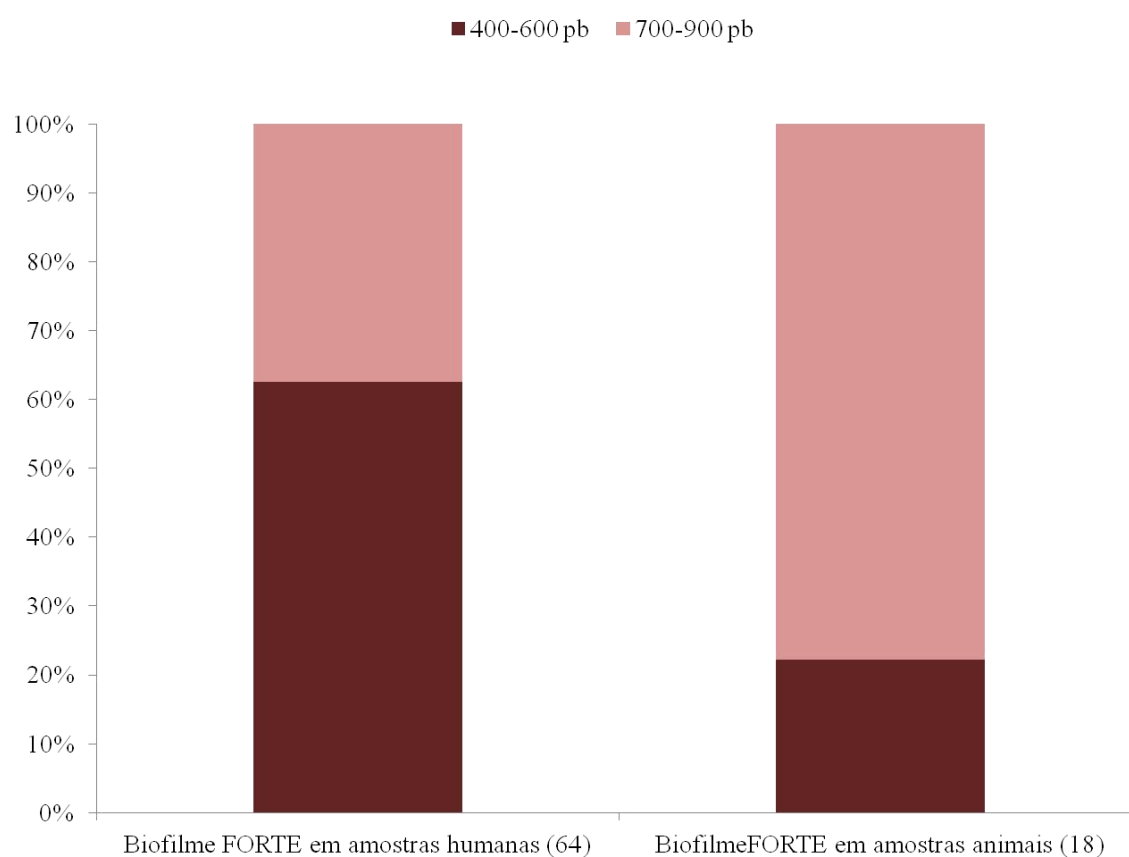


Figura 5. Distribuição dos diferentes tamanhos de produtos de amplificação do gene *bibA* entre 82 amostras de *S. agalactiae* fortemente produtoras de biofilme (conforme previamente determinado por Alvim, 2019) de acordo com a fonte de isolamento.

5.3 Capacidade de autoagregação celular

Entre as 22 amostras de GBS avaliadas nesta etapa do estudo, apenas quatro (18%) foram classificadas como não autoagregativas, apresentando fatores de autoagregação celular significativamente menores ($p < 0,0001$) do que o observado para a amostra controle *S. mutans* ATCC 20556, que foi de 0,084 (Figura 6).

Ao avaliar os fatores de autoagregação agrupando as amostras analisadas de acordo com a fonte de isolamento, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre eles ($p > 0,05$), foi observado que os maiores valores foram associados com amostras obtidas de colonização de orofaringe seguidas por aquelas de infecções invasivas (Figura 7).

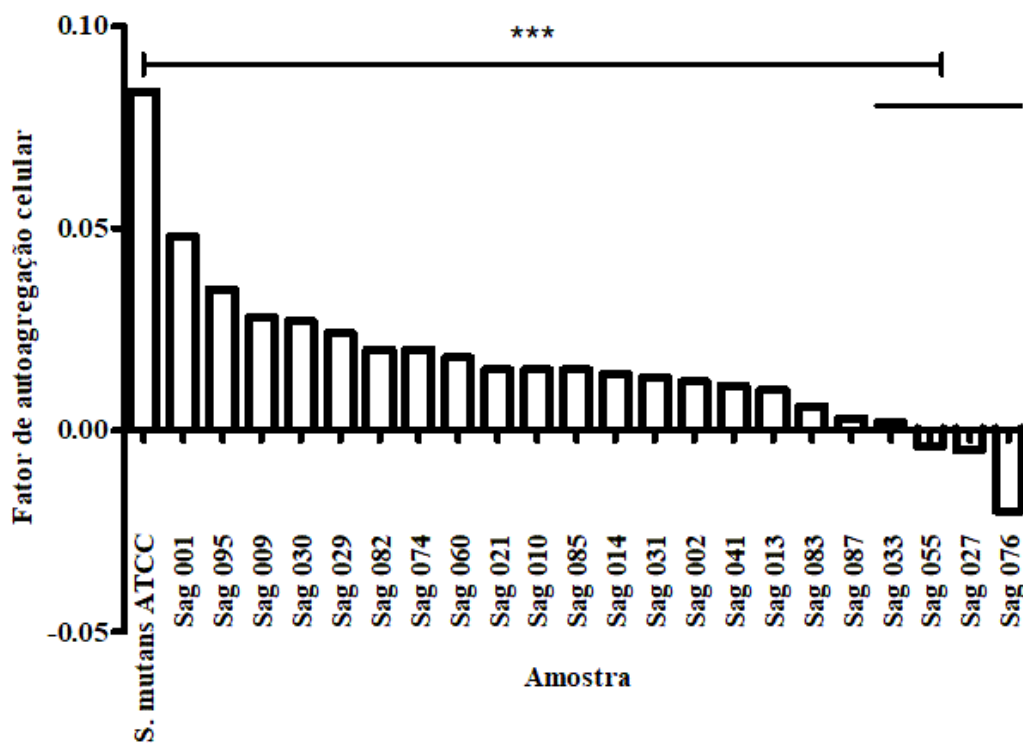


Figura 6. Médias dos fatores de autoagregação celular *in vitro* de 22 amostras de *S. agalactiae* e a amostra utilizada como controle positivo (*S. mutans* ATCC 20556). *** $p < 0,0001$

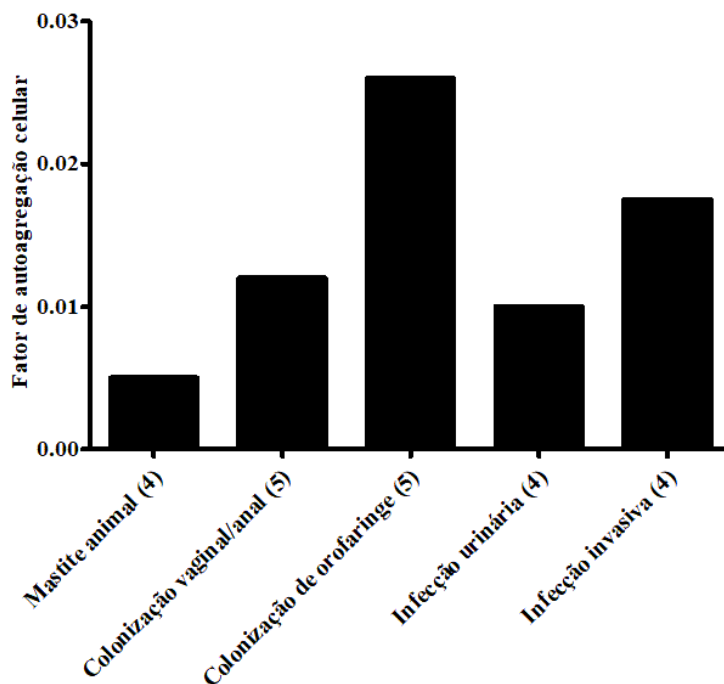


Figura 7. Médias dos fatores de autoagregação celular *in vitro* de 22 amostras de *S. agalactiae* agrupadas de acordo com a fonte de isolamento.

Quando avaliadas as amostras de acordo com o fenótipo de produção de biofilme, notou-se que a média dos fatores de autoagregação de amostras classificadas como fracamente produtoras de biofilme (0,022) foi o dobro da média obtida para aquelas consideradas fortemente produtoras de biofilme (0,011), apesar de não ter sido a diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Já quando avaliados os fatores de autoagregação de acordo com o perfil das variantes de pilus, foi detectada uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0205$) nas médias de valores entre amostras que albergavam apenas uma variante (PI-1 ou PI-2a ou PI-2b) e amostras que albergavam duas variantes simultaneamente (PI-1 + PI-2a ou PI-2b), sendo as primeiras superiores neste sentido (Figura 8).

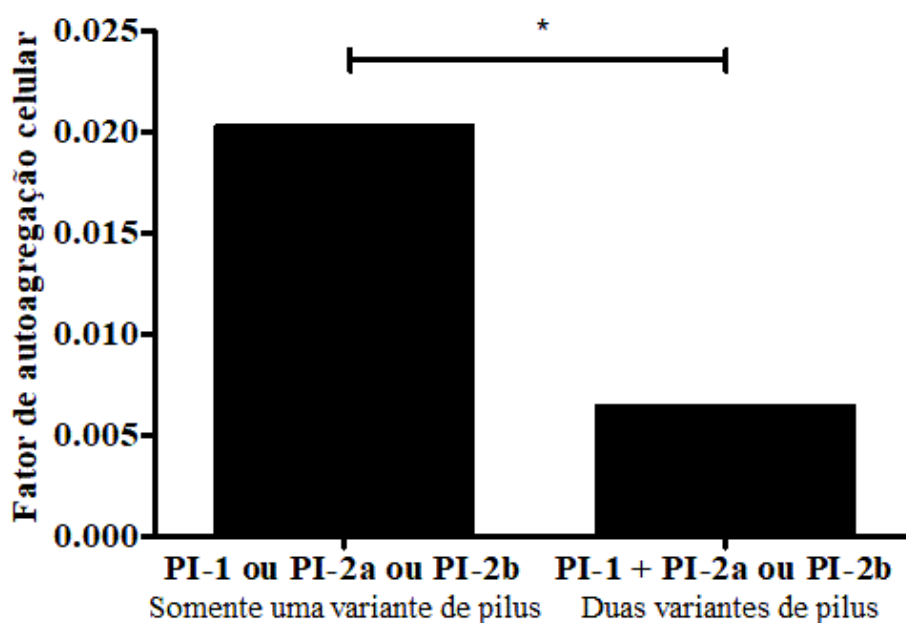


Figura 8. Médias dos fatores de autoagregação celular *in vitro* de 22 amostras de *S. agalactiae* agrupadas de acordo com o perfil de genes variantes de pilus. * $p=0,0205$

Foi também observado que amostras gerando amplicons de 400 pb para o gene *bibA* apresentaram, de forma geral e sem relevância estatística ($p>0,05$), fatores de autoagregação menores do que aquelas com que amplificaram fragmentos de 800-900 pb ou que não amplificaram o gene (Figura 9).

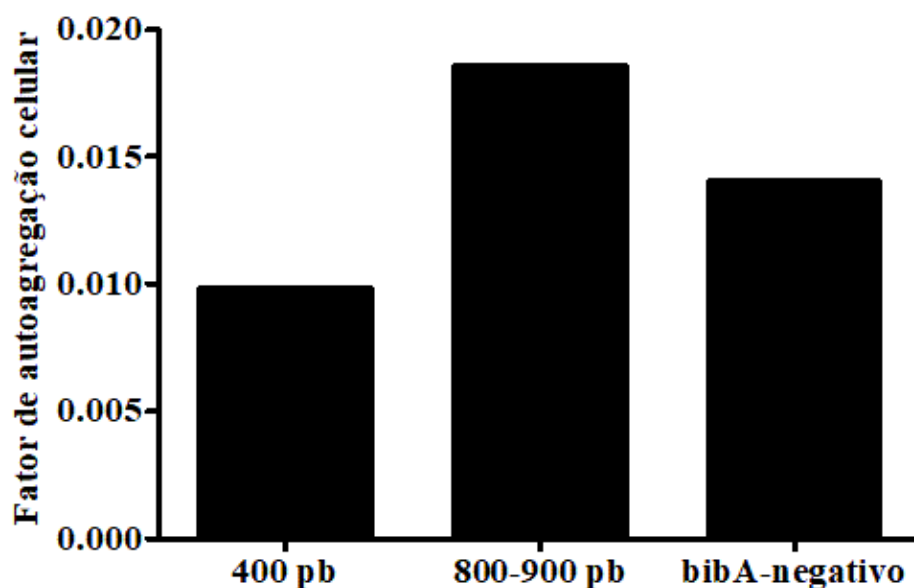


Figura 9. Médias dos fatores de autoagregação celular *in vitro* de 22 amostras de *S. agalactiae* agrupadas de acordo com o tamanho dos produtos de amplificação do gene *bibA*.

Na tentativa de facilitar a interpretação dos resultados dos ensaios de autoagregação celular em estudos futuros, o presente estudo traz como proposta uma forma de classificar amostras de GBS de acordo com o fenótipo de autoagregação celular em fortemente ou fracamente autoagregativas, a espelho do que já é praticado para a classificação dos fenótipos de produção de biofilme. Dessa forma, foram consideradas fracamente autoagregativas aquelas cujos fatores de agregação foram menores ou iguais à média dos fatores de autoagregação de todas as 22 amostras analisadas (0,014 no caso deste estudo); enquanto que foram consideradas fortemente autoagregativas aquelas que apresentaram fatores de agregação maiores que esta média. Com isso, além das quatro amostras (18%) consideradas não autoagregativas, onze amostras (50%) foram classificadas como fortemente autoagregativas enquanto que sete amostras (32%) foram classificadas como fracamente autoagregativas (Tabela 5).

Tabela 5. Características das 22 amostras de *S. agalactiae* avaliadas nos ensaios de autoagregação celular dispostas em ordem decrescente do fator de autoagregação celular.

Amostra	Fonte	Sorotipo	Pilus	<i>bibA</i> (em pb)	Fenótipo de biofilme ^a	Fator de autoagregação	Fenótipo de autoagregação
Sag 001	Orofaringe	II	PI-2a	900	Fraco	0,048	Forte
Sag 095	Urina	Ib	PI-2a	800	Fraco	0,035	Forte
Sag 009	Colonização vaginal/anal humana	II	PI-1	400	Forte	0,028	Forte
Sag 030	Orofaringe	Ia	PI-1	800	Forte	0,027	Forte
Sag 029	Orofaringe	Ia	PI-1, PI-2a	400	Forte	0,024	Forte
Sag 074	Leite bovino	Ia	PI-2b	400	Forte	0,020	Forte
Sag 082	Colonização vaginal/anal humana	IV	PI-1	800	Forte	0,020	Forte
Sag 060	Sangue	III	PI-1, PI-2b	negativo	Fraco	0,018	Forte
Sag 021	Líquor	III	PI-1	800	Fraco	0,015	Forte
Sag 010	Orofaringe	Ia	PI-2a	800	Forte	0,015	Forte
Sag 085	Sangue	Ia	PI-2a	800	Forte	0,015	Forte
Sag 014	Leite bovino	III	PI-1, PI-2b	negativo	Forte	0,014	Fraco
Sag 031	Líquor	III	PI-1, PI-2b	400	Fraco	0,013	Fraco
Sag 002	Orofaringe	Ib	PI-1, PI-2a	800	Forte	0,012	Fraco
Sag 041	Colonização vaginal/anal humana	Ia	PI-2a	400	Forte	0,011	Fraco
Sag 013	Leite bovino	III	PI-1, PI-2b	negativo	Forte	0,010	Fraco
Sag 083	Urina	Ia	PI-2a	400	Forte	0,006	Fraco
Sag 087	Colonização vaginal/anal humana	II	PI-1	400	Fraco	0,003	Fraco
Sag 033	Urina	Ia	PI-1, PI-2a	400	Forte	0,002	Não agregativa
Sag 055	Colonização vaginal/anal humana	III	PI-1, PI-2a	400	Forte	-0,004	Não agregativa
Sag 027	Urina	II	PI-1, PI-2b	400	Forte	-0,005	Não agregativa
Sag 076	Leite bovino	Ia	PI-1, PI-2b	800	Forte	-0,020	Não agregativa

^aConforme previamente determinado por Alvim (2019).

5.4 Capacidade de sobrevivência em sangue humano

Todas as dez amostras analisadas foram capazes de sobreviver em sangue humano total *in vitro* pelo período de 3 horas, porém apresentando diferentes potenciais para tal (Tabela 6). Três amostras (Sag 082, Sag 055 e Sag 074) tiveram destaque nesse ensaio, apresentando taxas de sobrevivência maiores do que a média obtida a partir de todas as amostras avaliadas; contudo, elas não compartilhavam nenhuma característica em comum entre as avaliadas neste estudo.

No entanto, ao analisar os resultados agrupando as amostras de acordo com a fonte de isolamento, foram detectadas taxas de sobrevivência em sangue estatisticamente maiores ($p=0,0020$) entre as amostras obtidas de colonização vaginal/anal humana em relação a outras fontes (Figura 10).

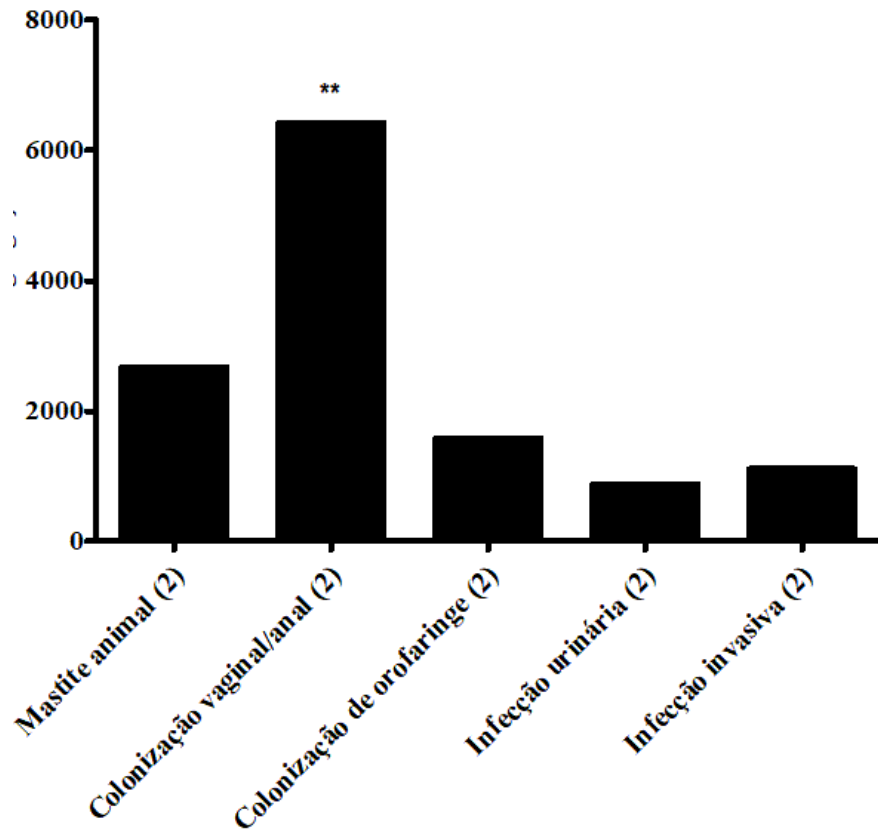


Figura 10. Médias das taxas de sobrevivência em sangue humano total *in vitro* de 10 amostras de *S. agalactiae* agrupadas de acordo com a fonte de isolamento. ** $p=0,0020$

Diferente do que foi observado para a capacidade de autoagregação, diferentes perfis de variantes de pilus não foram associados com diferentes capacidades de sobreviver em

sangue humano *in vitro* ($p>0,05$). As médias das taxas de sobrevivência em sangue foram similares entre amostras albergando apenas uma variante de pilus (média=2643,8%) e amostras albergando duas variantes de pilus (média=2406,4%).

Já em relação aos diferentes tamanhos de amplicons do gene *bibA*, apesar de não ter sido detectada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$), notou-se que amostras que não amplificaram o gene apresentaram, em geral, menor capacidade de sobrevivência em sangue enquanto que amostras que geraram amplicons de 800 pb apresentaram a maior capacidade de sobreviver em sangue humano total *in vitro* (Figura 11).

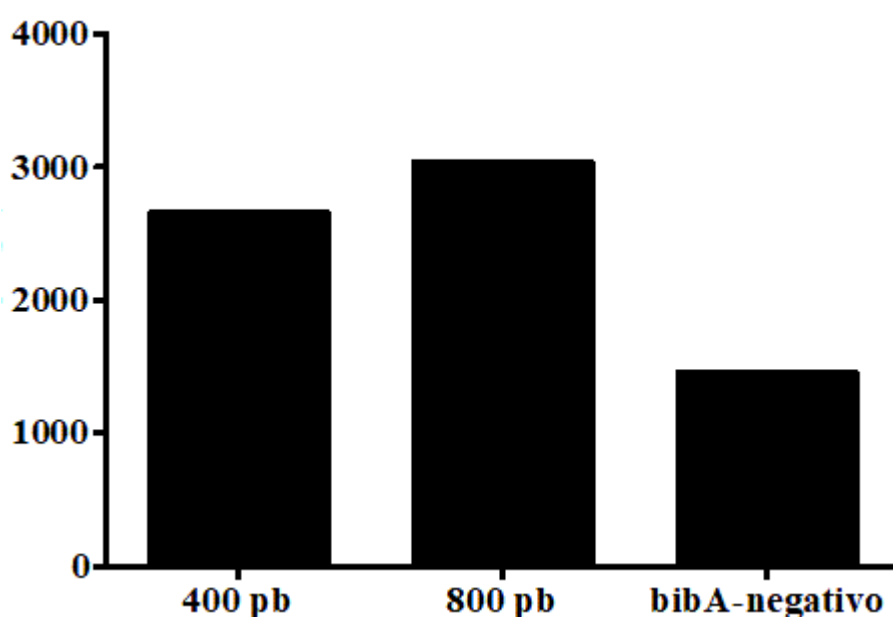


Figura 11. Médias das taxas de sobrevivência em sangue humano total *in vitro* de 10 amostras de *S. agalactiae* agrupadas de acordo com o tamanho dos produtos de amplificação do gene *bibA*.

Também não foi revelada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) nos taxas de sobrevivência em sangue entre amostras apresentando diferentes fenótipos de autoagregação, uma vez que as médias das taxas de sobrevivência em sangue foram similares entre amostras classificadas como fortemente autoagregativas (média=2600,5%) e amostras classificadas como fracamente ou não autoagregativas (média=2412%). Além disso, não foi possível analisar a capacidade de sobrevivência em sangue humano em relação ao fenótipo de produção de biofilme, uma vez que 9 das 10 amostras escolhidas eram fortemente produtoras (conforme previamente determinado por Alvim, 2019).

Tabela 6. Características das 10 amostras de *S. agalactiae* avaliadas nos ensaios de sobrevivência em sangue humano total, dispostas em ordem decrescente da taxa de sobrevivência em sangue humano.

Amostra	Fonte	Sorotipo	Pilus	<i>bibA</i> (em pb)	Fenótipo de autoagregação	Taxa de sobrevivência em sangue humano
Sag 082	Colonização vaginal/anal humana	IV	PI-1	800	Forte	6631%
Sag 055	Colonização vaginal/anal humana	III	PI-1, PI-2a	400	Não agregativa	6202%
Sag 074	Leite bovino	Ia	PI-2b	400	Forte	3626%
Sag 013	Leite bovino	III	PI-1, PI-2b	neg	Fraco	1703%
Sag 029	Orofaringe	Ia	PI-1, PI-2a	400	Forte	1686%
Sag 010	Orofaringe	Ia	PI-2a	800	Forte	1456%
Sag 033	Urina	Ia	PI-1, PI-2a	400	Não agregativa	1245%
Sag 060	Sangue	III	PI-1, PI-2b	neg	Forte	1196%
Sag 085	Sangue	Ia	PI-2a	800	Forte	1008%
Sag 083	Urina	Ia	PI-2a	400	Fraco	498%

6. Discussão

Streptococcus agalactiae é um importante agente de infecções em humanos, especialmente em mulheres grávidas e em recém-nascidos, podendo apresentar casos clínicos leves como infecção urinária ou até se manifestar em casos mais graves, como meningite e pneumonia. *S. agalactiae* é também um dos principais agentes causadores de mastite em animais leiteiros como vacas e cabras, levando a perdas econômicas para os produtores e para a indústria de laticínios em todo o mundo. Este microrganismo também pode ser encontrado em adultos não gestantes, em sítios como orofaringe, trato geniturinário, trato respiratório superior e outros, tanto como colonizador quanto como agente infeccioso (Teixeira, Pinto e Merquior, 2015; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2017). Tendo em vista a importância clínica de GBS na medicina humana e veterinária, é essencial que sejam realizados estudos visando a melhor compreensão de fatores ou mecanismos que possam estar associados ao seu potencial de virulência. Dessa forma, o presente estudo soma-se a esforços globais neste sentido e adiciona conhecimentos sobre a ocorrência e distribuição de genes envolvidos com a virulência e avaliação e classificação de fenótipos *in vitro* que também podem estar associados perfis de maior patogenicidade de amostras de GBS que circulam em nosso meio.

Em concordância ao que é encontrado na literatura, neste estudo todas as 149 amostras apresentaram ao menos um gene codificador de alguma variante de pilus (Rosini *et al.*, 2006; Margarit *et al.*, 2009). Além disso, foi observada a correlação entre os diferentes genes codificadores das variantes de pilus e as fontes de isolamento das amostras, PI-2a (com ou sem PI-1) foi a variante mais comum entre as amostras de origem humana, a variante PI-2b (com ou sem PI-1) foi a mais frequente entre as amostras de origem animal. Esses dados concordam com o que já foi descrito na literatura (Martins *et al.*, 2013; Parker *et al.*, 2016; Pang *et al.*, 2017), sugerindo que o pilus pode ter um papel na especificidade de amostras de GBS com os diferentes hospedeiros.

Em relação à ocorrência e distribuição do gene *bibA*, poucos são os estudos disponíveis na literatura que abordam este assunto até o momento, e a grande maioria das amostras analisadas geralmente são de origem humana. No entanto, os resultados sobre ocorrência deste gene entre as amostras incluídas neste estudo (em torno de 95%) corroboram os poucos dados disponíveis referentes a outros locais, que indicam uma ampla distribuição deste gene entre amostras de GBS independente de qualquer outra característica (Brochet *et al.*, 2006; Santi *et al.*, 2007; 2009).

Um achado interessante do presente estudo foi a associação de diferentes tamanhos de amplicons do gene *bibA* com a fonte de isolamento das amostras; algo ainda não relatado na literatura. Uma vez que diversos estudos, incluindo o presente, demonstram que existem diferentes variantes de pilus associadas a amostras de diferentes origens (humana versus bovina), é razoável especular que o mesmo possa acontecer para outras proteínas de superfície, como BibA, uma vez que são essas estruturas que provavelmente estão envolvidas com a interação inicial e fundamental da bactéria com o organismo de cada hospedeiro. Além disso, esses perfis específicos de genes de proteínas, incluindo pilus e BibA, parecem ser fundamentais para permitir que a amostra forme biofilme de forma eficiente e bem-sucedida em cada hospedeiro. Dessa forma, pode-se sugerir que amostras de GBS contendo genes para pilus PI-2a e variantes de *bibA* de 400-600 pb apresentam o perfil que indica sucesso na colonização e sua manutenção dentro do hospedeiro humano, enquanto que amostras de GBS que albergam genes para pilus PI-2b e variantes de *bibA* de 700-900 pb apresentam o perfil que indica sucesso no hospedeiro bovino.

Não foi vista relação entre a distribuição dos diferentes tamanhos de amplicons de *bibA* e a produção de biofilme, uma vez que a distribuição dos diferentes tamanhos foi semelhante entre amostras fracamente produtoras e fortemente produtoras (dados não mostrados).

Entre as oito amostras que foram consideradas negativas para a presença do gene codificador de BibA, seis pertencem ao sorotipo III e albergam a variante de pilus PI-2b; características essas que são frequentemente associadas ao ST17 (Davies *et al.*, 2004; Teatero *et al.*, 2014; Lazzarin *et al.*, 2017). De fato, duas delas foram recentemente identificadas como pertencentes ao ST17 durante a execução de outros trabalhos do grupo (dados ainda não publicados). Levando em conta que os genes *bibA* e *hvgA* estão presentes no mesmo locus (*gbs2018*) e portanto são mutuamente exclusivos (Tazi *et al.*, 2010), é razoável especular que algumas amostras consideradas negativas para *bibA* neste estudo, principalmente aquelas potencialmente associadas ao ST17, podem na verdade albergar o gene *hvgA* em seu lugar (Tazi *et al.*, 2010).

Apesar de sua potencial associação com a virulência bacteriana, a capacidade de autoagregação celular é uma característica ainda pouco explorada entre amostras de GBS. A maioria dos estudos de autoagregação disponíveis na literatura é realizado com espécies de estreptococos orais, como *S. mutans*, que demonstram alta habilidade nesse quesito (Zhang *et al.*, 2006; Nobbs, Lamont e Jenkinson, 2009; Brady *et al.*, 2010; Maddocks *et al.*, 2011;

Franklin *et al.* 2013; Chuzeville *et al.* 2015). No presente estudo, mais de 80% das amostras de GBS avaliadas demonstraram alguma capacidade de autoagregação celular, sugerindo que talvez esta seja uma característica também comum em amostras de GBS. A autoagregação pode ser usada como estratégia de sobrevivência em diversas situações adversas, como redução da quantidade de nutrientes, na resistência a toxinas ou antibióticos e na sobrevivência ao sistema imune (Galdiero *et al.*, 1988; Hahn, Moore e Höfle, 2000; Fexby *et al.*, 2006; Blom *et al.*, 2010; Corno *et al.*, 2016; Kragh *et al.*, 2016; Trunk, Khalil e Leo, 2018). Apresentar esta habilidade pode ser favorável para a sobrevivência do GBS nos diferentes sítios, uma vez que pode ser encontrado no sangue, líquido amniótico, orofaringe, trato geniturinário, trato gastrointestinal e outros (Chrenien *et al.*, 1979; Chaiwarith *et al.*, 2011; Falagas *et al.*, 2006; Kwatra *et al.*, 2016; Russell *et al.*, 2017; Roloff *et al.*, 2018; Clouse *et al.*, 2019; Collin *et al.*, 2019); e diferentes hospedeiros em que ele pode ser encontrado, como humanos, bovinos, peixes, caprinos e outros (Yildirim *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2010; Delannoy *et al.*, 2013; Morach *et al.*, 2017; Tavella *et al.*, 2018).

Neste estudo, a maior capacidade de autoagregação foi observada entre amostras de GBS obtidas de colonização de orofaringe, sítio este habitado também pelos estreptococos orais, sugerindo que a habilidade de autoagregar possa contribuir para que certa bactéria tenha sucesso na colonização e na permanência neste ambiente. Essas amostras recuperadas de orofaringe humana se destacaram não somente pela alta capacidade de autoagregação, mas também se diferenciaram quando comparadas às amostras de GBS obtidas de outras fontes humanas por serem mais associadas a amplicons de *bibA* de 700 pb e apresentar a maior ocorrência de genes da variante PI-1. Esses dados indicam mais uma vez que, apesar de associado a diferentes manifestações clínicas em diferentes hospedeiros, as cepas de GBS tendem a se especializar apresentando perfis únicos de fatores e mecanismos de virulência que garantem sucesso em cada um dos sítios de cada tipo de hospedeiro.

Foi observada relação com relevância estatística entre capacidade de autoagregação e a presença de apenas uma variante de pilus entre as amostras analisadas, assim, a presença de mais de um gene de pilus parece diminuir a capacidade de autoagregação das amostras. Isto também foi visto por estudos que correlacionavam as variantes de pilus com a capacidade de formação de biofilme (Parker *et al.*, 2016; Ferreira, 2017).

Além disso, neste estudo, propomos uma forma de avaliar a capacidade de autoagregar em amostras de GBS, classificando-as em fortemente autoagregativas, fracamente autoagregativas ou não autoagregativas. Tal proposta tem inspiração no que já é aplicado para

avaliação de produção de biofilme em GBS, e pode e deve ser utilizada em estudos futuros semelhantes no intuito de avaliar sua aplicabilidade. Novas amostras serão avaliadas em estudos futuros para que essa proposta de avaliação possa ser consolidada.

Embora a autoagregação celular seja considerada o passo inicial da formação de biofilme nas espécies de estreptococos orais (O'Toole e Kolter, 1998; Beloin *et al.*, 2008; Dunne, 2002; Kragh *et al.*, 2016; Shabayek e Spellerberg, 2018; Trunk, Khalil e Leo, 2018), no presente estudo não foi observada relação entre forte capacidade de autoagregação e forte produção de biofilme entre as amostras de GBS analisadas.

Igualmente, poucos são os dados na literatura sobre a capacidade de GBS de sobreviver em sangue humano total *in vitro*. Neste estudo, todas as 10 amostras de GBS avaliadas foram capazes de resistir e se multiplicar em contato com o sangue humano total *in vitro*.

Curiosamente, as amostras com maiores taxas de sobrevivência foram as recuperadas de colonização vaginal/anal, tendo uma média de taxa de sobrevivência de 6417%. Apesar de curioso, é razoável especular que esses resultados demonstram uma relação direta dessas cepas com a capacidade de causar infecções invasivas neonatais, uma vez que a principal fonte desse tipo de infecção é o trato retovaginal materno colonizado pelo microrganismo. Além disso, ao se levar em consideração que devido o sítio onde o GBS é mais comumente encontrado é o trato vaginal (Patras e Nizet, 2018; Shabayek e Spellerberg, 2018), essas cepas podem ser mais adaptadas aos ataques do sistema imune, uma vez que, pela mucosa vaginal, essas cepas estariam em constante contato com elementos de defesa, como anticorpos e o sistema complemento. Além disso, as amostras recuperadas dos sítios estéreis eram de infecções em neonatos, que são indivíduos com o sistema imune ainda em formação, logo não haveria uma seleção por cepas altamente resistentes ao sistema imune.

Além disso, exceto pelas amostras de colonização vaginal/anal, as amostras obtidas de mastite animal apresentaram taxas de sobrevivência em sangue humano maiores do que os observados para as amostras recuperadas de fontes humanas. Esses dados corroboram Corrêa e colaboradores (2010), que demonstraram que amostras recuperadas de leite mastítico apresentavam uma melhor capacidade de sobrevivência em sangue humano do que amostras de fontes humanas.

Diversos fatores de virulência estão associados à sobrevivência da bactéria ao ataque imunológico do sangue humano (Lang e Palmer, 2003; Liu *et al.*, 2004; Lindahl, Stalhammar-Carlén e Areschoug, 2005; Maisey, Doran e Nizet, 2008; Mereghetti *et al.*, 2008; Santi *et*

al., 2009). Neste estudo, entre os fatores avaliados, foi observado que aquelas amostras de GBS que não apresentaram o gene *bibA* foram as que apresentaram também a menor capacidade de sobreviver a este ataque. Apesar de BibA já ter sido associada à habilidade de evasão do sistema imune do hospedeiro, sabe-se que a capacidade de sobreviver em sangue humano é de natureza multifatorial (Mee-Marquet *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010).

Os resultados do presente estudo adicionam dados inéditos quanto à caracterização de amostras de GBS circulantes no Brasil tanto em humanos quanto em animais, caracterizando de forma pioneira alguns aspectos envolvidos com a virulência bacteriana em cepas recuperadas de fontes clínicas variadas, o que pode levar ao melhor entendimento da biologia desta espécie bacteriana e contribuir para aprimorar medidas de controle e prevenção das infecções associadas a GBS em humanos e animais.

7. Conclusões

Todas as 149 amostras avaliadas albergavam ao menos uma das variantes de pilus pesquisadas, sendo a variante PI-2a associada com amostras de fontes humanas e a variante PI-2b com amostras de fontes animais.

A grande maioria (cerca de 95%) das 149 amostras analisadas apresentava o gene *bibA*, sendo amplicons de 400-600 pb associados com amostras de fontes humanas e amplicons de 700-900 pb associados com amostras de fontes animais.

Mais de 80% das 22 amostras de GBS selecionadas quanto a capacidade de autoagregação foram capazes de autoagregar *in vitro*. A forte capacidade de autoagregação celular foi associada com amostras albergando somente uma variante de pilus (PI-1, PI-2a ou PI-2b), e não foi associada a produção forte de biofilme. Uma proposta de classificação dos fenótipos de autoagregação celular foi desenvolvida e precisa ser melhor avaliada utilizando mais amostras.

Todas as 10 amostras selecionadas quanto a capacidade de sobrevivência em sangue foram capazes de sobreviver em sangue humano total *in vitro*, e a maior capacidade de sobrevivência foi associada com amostras obtidas de colonização vaginal/anal humana.

A presença de genes de pilus, de *bibA* e a capacidade de autoagregar e sobreviver em sangue parece ser uma característica comum na espécie *S. agalactiae*, assim como é a produção de biofilme, embora diferentes perfis contemplando esses quatro aspectos pareçam ser específicos a alguns sítios ou hospedeiros.

8. Referências bibliográficas

- Alhhazmi, A., Hurteau, D., Tyrrella, G.J. (2016). Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in Alberta, Canada, from 2003 to 2013. *54(7)*, 1774–1781.
- Almeida, A., Alves-Barroco, C., Sauvage, E., Bexiga, R., Albuquerque, P., Tavares, F., e Glaser, P. (2016). Persistence of a dominant bovine lineage of group B *Streptococcus* reveals genomic signatures of host adaptation. *Environmental Microbiology*, 18(11), 4216–4229.
- Arenas, J., Nijland, R., Rodriguez, F.J. e Bosma, T.N., Tommassen, J. (2012). Involvement of three meningococcal surface-exposed proteins, the heparin-binding protein NhbA, the α -peptide of IgA protease and the autotransporter protease NalP, in initiation of biofilm formation. *Mol Microbiol* 87: 254–268
- Arora, H.S., Asmar, B.I., Salimnia, H., Agarwal, P., Chawla, S., e Abdel-Haq, N. (2017). Enhanced identification of group B *Streptococcus* and *Escherichia coli* in young infants with meningitis using the biofire filmarray meningitis/encephalitis panel. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(7), 685–687.
- Baker, C.J. e Kasper, D.L. (1976). Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group b streptococcal infection. *N Engl J Med*. 294:753–756.
- Baker, C.J. e Edwards, M.S. (2003). Group b streptococcal conjugate vaccines. *Arch Dis Child*, 88:375–378.
- Banerjee, A, Kim, B.J., Carmona, E.M., Cutting, A.S., Gurney, M.A., Carlos, C., Feuer, R, Prasadarao N.V., e Doran KS. (2011). Bacterial pili exploit integrin machinery to promote immune activation and efficient blood-brain barrier penetration. *Nat Commun.*,2:462.
- Beloin, C., Houry, A., Froment, M., Ghigo, J.M. e Henry, N. (2008). A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. *PLoS Biol* 6: e167
- Bellais, S., Six, A., Fouet, A., Longo, M., Dmytruk, N., Glaser, P., Trieu-Cuot, P. e Poyart, C. (2012). Capsular switching in group B *Streptococcus* CC17 hypervirulent clone : a future challenge for polysaccharide vaccine development. *206*, 1745–1752.
- Berner, R., Ruess, M., Bereswill, S., e Brandis, M. (2002) Polymorphisms in the cell wall-spanning domain of the C protein b-antigen in clinical *Streptococcus agalactiae* isolates are caused by genetic instability of repeating DNA sequences. *Pediatr. Res.*, 51, 106–111.
- Binghuai, L., Yanli, S., Shuchen, Z., Fengxia, Z., Dong, L., e Yanchao, C. (2014). Use of MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of group B *Streptococcus* on chromID Strepto B agar. *International Journal of Infectious Diseases*, 27, 44–48.
- Bisharat, N., Crook, D.W., Leigh, J., Harding, R.M., Ward, P.N., e Coffey, T.J. (2004). Hyperinvasive neonatal group B *Streptococcus* has arisen from a bovine ancestor. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2161–2167.
- Bi, Y.L., Wang, Y.J., Qin, Y., Vallverdu, R.G., Garcia, J.M., Sun, W., Li, S., e Cao, Z. (2016). Prevalence of bovine mastitis pathogens in bulk tank milk in China. *PLoS One*, 11: 13.
- Blom, J.F., Zimmermann, Y.S., Ammann, T. e Pernthaler, J. (2010). Scent of danger: floc formation by a freshwater bacterium is induced by supernatants from a predator-prey coculture. *Appl Environ Microb* 76: 6156–6163.

- Bohnsack, J.F., Widjaja, K., Ghazizadeh, S., Rubens, C.E., Hillyard, D.R., Parker, C.J., Albertine, K.H. e Hill, H.R. (1997). A role for C5 and C5a-ase in the acute neutrophil response to group B streptococcal infections. *J Infect Dis*, 175(4):847–55.
- Bolduc, G.R., Baron, M.J., Gravekamp, C., Lachenauer, C.S., e Madoff, L.C. (2002) The alpha C protein mediates internalization of group B *Streptococcus* within human cervical epithelial cells. *Cell Microbiol.*, 4, 751-758.
- Bonofiglio, L., Galletti, P., García Gabarrot, G., Kaufman, S., Mollerach, M., Toresani, I., Vigliarolo, L., von Specht, M., e Lopardo, H.A. (2018). Susceptibility to β -lactams in β -hemolytic streptococci. *Ver Argent Microbiol.*, pii: S0325-7541(17) 30181-30185.
- Botelho, A.C.N., Oliveira, J.G., Damasco, A.P., Santos, K.T.B., Ferreira, A.F.M., Rocha, G.T., Marinho, P.S., Bornaia, R.B.G., Pinto, T.C.A., Américo, M.A. (2018). *Streptococcus agalactiae* carriage among pregnant women living in Rio de Janeiro, Brazil, over a period of eight years. *PLoS One*. 13:e0196925.
- Brady, L.J., Maddocks, S.E., Larson, M.R., Forsgren, N., Persson, K., Deivanayagam C.C., Jenkinson, H.F. (2010). The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. *Mol Microbiol*; 77(2): 276-86.
- Brittan, J.L. e Nobbs, A.H. (2015). Group B *Streptococcus* pili mediate adherence to salivar glycoproteins. *Microbes and Infection*, 17(5), 360–368.
- Brochet, M., Couve, E., Zouine, M., Vallaey, T., Rusniok, C., Lamy, M.C., Buchrieser, C., Trieu-Cuot, P., Kunst, F., Poyart, C. e Glaser, P. (2006). Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microbes Infect.* 8, 1227–1243.
- Carneiro, A.V., Stock, L.A., Oliveira, V.M., Zoccal, R., Carvalho, G.R., Martins, P.C. e Yamaguchi, L.C.T. (2004). Mastite clinica: prevalência e custo de tratamento em rebanho leiteiro. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/sites/default/files/mastite_clinica_prevalencia_e_custo_de_tratamento_em_rebanho_leiteiro.pdf>. Acesso em: 04 de junho de 2019.
- Carroll, K.C. (2014). Estreptococos, enterococos e outros gêneros relacionados. In: *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg (AMGH)*, 26. ed. Porto Alegre, 216- 217.
- CDC (1996). Centers For Disease Control And Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. *MMWR Recomm. Rep.*, 45, 1-24.
- CDC (2000). Centers For Disease Control And Prevention. early-onset group B streptococcal disease -United States, 1998—1999. *MMWR*. 49, 793-796.
- CDC (2002). Centers For Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR*. 51(RR11):1-22.
- CDC (2010). Centers For Disease Control And Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease, revised guidelines from CDC. *M.M.W.R.*, 59, 1-23.
- Chaiwarith, R., Jullaket, W., Bunchoo, M., Nuntachit, N., Sirisanthana, T., e Supparatpinyo, K. (2011). *Streptococcus agalactiae* in adults at chiang mai university hospital: a retrospective study. *BMC Infectious Diseases*, 11(1).
- Chrenien, J.H., McGinnis, C.G., Thompson, J., Delaha, E. e Garagusi, V. (1979) Group B Beta-Hemolytic

Streptococci Causing Pharyngitis. *J Clin Microbiol.*:163–266

Christie, L.K., Atkins, N.E. e Munch-Petersen, E. (1944). A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med Sci.*, 22, 197-200.

Chuzeville, S., Dramsi, S., Madec, J.-Y., Haenni, M., e Payot, S. (2015). Antigen I/II encoded by integrative and conjugative elements of *Streptococcus agalactiae* and role in biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, 88, 1–9.

Clouse, K., Shehabi, A., Suleimat, A. M., Faouri, S., Khuri-Bulos, N., Al Jammal, A., Chappell, J., Fortner, K.B., Chamby, A.B., Randis, T.M., Ratner, A.J., Aronoff, D.M. e Halasa, N. (2019). High prevalence of Group B *Streptococcus* colonization among pregnant women in Amman, Jordan. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 19(1).

Cobo-Ángel, C., Jaramillo-Jaramillo, AS., Lasso-Rojas, L. M., Aguilar-Marin, S.B., Sanchez, J., Rodriguez-Lecompte, J.C. e Zadoks, R.N. (2018). *Streptococcus agalactiae* is not always na obligate intramammary pathogen: Molecular epidemiology of GBS from milk, feces and environment in Colombian dairy herds. *PLOS ONE*, 13(12), e0208990.

Collin, S.M., Shetty, N., Guy, R., Nyaga, V.N., Bull, A., Richards, M.J., van der Kooi, T.I.I., Koek, M.B.G., De Almeida, M., Roberts, S.A. e Lamagni, T. (2019). Group B *Streptococcus* in surgical site and non-invasive bacterial infections worldwide: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*.

Cooper, K., Abbott, F., e Gould, I.M. (2016). Reduced penicillin susceptibility of group B *Streptococcus*: an assessment of emergence in Grampian Scotland. *Br J Biomed Sci*, 73:25-7.

Corno, G., Coci, M., Giardina, M., Plechuk, S., Campanile, F., Stefani, S. (2014). Antibiotics promote aggregation within aquatic bacterial communities. *Front Microbiol* 5: 297.

Corrêa, A.B.A., Silva, G.L., Pinto, T.C.A., Oliveira, I.C.M., Fernandes, F.G., Costa, N.S., Mattos, M.C., Fracalanza, S.E.L, Benchetrit, L.C. (2011). The genetic diversity and phenotypic characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106:1002–1006.

Costa H. (2011). Prevenção da doença perinatal pelo estreptococco do grupo B. *Manual da Sociedade Brasileira de Pediatria*, 1–18.

Costerton, J.W., Stewart, P.S. e Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science.*, 284, 1318-1322.

Da Cunha, V., Davies, M.R., Douarre, P.E., Rosinski-Chupin, I., Margarit, I., e Spinali, S. (2014). *Streptococcus agalactiae* clones infecting humans were selected and fixed through the extensive use of tetracycline. *Nat. Commun.* 5:4544.

Dahesh, S. (2008). Point mutation in the group B streptococcal pbp2x gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 52:2915–2918.

Delannoy, C.M., Crumlish, M., Fontaine, M.C., Pollock, J., Foster, G., Dagleish, M.P., Turnbull, J.F. e Zadoks, R.N. (2013). Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. *BMC Microbiology*, 13(1), 41.

Do Nascimento, C.S., dos Santos, N.F.B., Ferreira, R.C.C., e Taddei, C.R. (2019). *Streptococcus agalactiae* in pregnant women in Brazil: prevalence, serotypes, and antibiotic resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*.

Doare, K.L. e Heath, P.T. (2013). An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine*, 31, 7-12.

Donlan, R.M. e Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 167-193.

Doran, K.S., Chang, J.C., Benoit, V.M., Eckmann, L., e Nizet, V. (2002). Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *J Infect Dis*, 185, 196-203.

Doran, K.S., Liu G.Y. e Nizet, V. (2003). Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *J. Clin. Invest.*, 112, 736-744.

Dramsı, S., Caliot, E., Bonne, I., Guadagnini, S., Prevost, M. C., Kojadinovic, M., Lalioui, L., Poyart, C. e Trieu-Cuot, P. (2006). Assembly and role of pili in group B streptococci. *Mol. Microbiol.*, 60,1401–141.

Duarte, R.S., Bellei, B.C., Miranda, O.P., Brito, M.A., Teixeira, L.M. (2005). 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.

Dufour, D., Leung, V., e LaVesque, C.L.M. (2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodont. Top*. 22(1), 2–16.

Dunne, W.M. Jr. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15: 155–166.

Dutra, V.G., Alves, V.M., Olendzki, N.A., Dias, C.A., De Bastos, A.F., Santos, G.O., De Amorim, E.L., Sousa, M.A., Santos, R., Ribeiro, P.C., Fontes, C.F., Andrey, M., Magalhães, K., Araujo, A.A., Paffadore, L.F., Marconi, C., Murta, E.F., Fernandes, P.C. Jr., Raddi, M.S., Marinho, P.S., Bornia, R.B., Palmeiro, J.K., Dalla-Costa, L.M., Pinto, T.C., Botelho, A.C., Teixeira, L.M. e Fracalanza, S.E. (2014). *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *BMC Infect Dis*. 14:323.

Dzanibe, S., e Madhi, S.A. (2018). Systematic review of the clinical development of group B *Streptococcus* serotype-specific capsular polysaccharide-based vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 17(7), 635–651.

Ebrahimi, A., Moatamedi, A., Lotfalian, S., e Mirshokraei P. (2013). Biofilm formation, hemolysin production and antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus agalactiae* isolated from the mastitis milk of dairy cows in Shahrekord district, Iran. *Veterinary Research Forum.*, 4, 269 – 27.

Elhaig, M.M., e Selim, A. (2014). Molecular and bacteriological investigation of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in domestic bovids from Ismailia, Egypt. *Tropical Animal Health and Production*, 47(2), 271–276.

Elliott, S. D. (1962). Teichoic Acid and the Group Antigen of Group D Streptococci. *Nature*, 193(4820), 1105–1106.

Erskine, R.J., Bartlett, P.C., VanLente, J.L., e Phipps, C.R. (2002). Efficacy of Systemic Ceftiofur as a Therapy for Severe Clinical Mastitis in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2571–2575.

Euzeby, J.P. (2019) List of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Streptococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/streptococcus.html>. Acesso em: 03 de novembro de 2019.

Falagas, M.E., Rosmarakis, E.S., Avramopoulos, I. e Vakalis, N. (2006). *Streptococcus Agalactiae* Infections in Non-Pregnant Adults: Single Center Experience of a Growing Clinical Problem. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, vol. 12, nº 11, novembro de 2006, p. CR447-451.

Faro, S., Brehm, B., Smith, F., Mouzoon, M., Greisinger, A., Wehmanen, O., e Turrentine, M.A. (2010). Screening for group B *Streptococcus*: a private hospital's experience. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 1–4.

Fernandes, F.G. (2011) Aspectos fenotípicos e genotípicos relacionados a cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de leite bovino e caprino em rebanhos do estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

Fexby, S., Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Roos, V., Høiby, N., Givskov, M. e Klemm, P. (2006). Biological Trojan horse: Antigen 43 provides specific bacterial uptake and survival in human neutrophils. *Infect Immun* 75: 30–34.

Ferreira, A.F.M. (2017). Caracterização de amostras de *Streptococcus agalactiae* obtidas de fontes humanas e animais: avaliação da produção de biofilme, da presença de genes de pili e associação com sorotipos e genótipos. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Florindo, C., Damiao, V., Silvestre, I., Farinha, C., Rodrigues, F., Nogueira, F. (2014). Epidemiological surveillance of colonising group B *Streptococcus epidemiology* in the Lisbon and Tagus Valley regions, Portugal (2005 to 2012): emergence of a new epidemic type IV/clonal complex 17 clone. *Euro. Surveill.* 19:20825.

Franklin, L., Nobbs, A.H., Bricio-Moreno, L., Wright, C.J., Maddocks, S.E., Sahota, J.S., Ralph, J., O'Connor, M., Jenkinson, H. F., Kadioglu, A. (2013). The AgI/II family adhesin AspA is required for respiratory infection by *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One*; 8(4): e62433.

Furfaro L.L., Nathan E.A., Chang B.J., e Payne M.S. (2019). Group B *Streptococcus* prevalence, serotype distribution and colonization dynamics in Western Australian pregnant women. *Journal of Medical Microbiology* 68: 728-740.

Furyk, J.S., Swann, O. e Molyneux, E. (2011). Systematic review: neonatal meningitis in the developing world. *Trop Med Int Health*, 16(6):672–9

Galdiero F, Carratelli CR, Nuzzo I, et al. (1988) Phagocytosis of bacterial aggregates by granulocytes. *Eur J Epidemiol* 4: 456–460.

Gao, K., Guan, X., Zeng, L., Qian, J., Zhu, S., Deng, Q., e Liu, H. (2018). An increasing trend of neonatal invasive multidrug-resistant group B *Streptococcus* infections in southern China, 2011–2017. *Infection and Drug Resistance*, Volume 11, 2561–2569.

Gibbs, R.S., Schrag, S. e Schuchat, A. (2004). Perinatal infections due to group B streptococci. *Obstet. Gynecol.*, 104, 1062-1076.

Gomes, F., e Henriques, M. (2015). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology*, 72(4), 377–382.

Gravekamp, C., Kasper, D.L., Paoletti, L.C., e Madoff, L.C. (1999). Alpha C protein as a carrier for type III capsular polysaccharide and as a protective protein in group B streptococcal vaccines. *Infect Immun.*, 67(5):2491-6.

Guimarães, J.L.B., Brito, M.A.V.P., Lange, C.C., Silva, M.R., Ribeiro, J.B., Mendonça, L.C., e Souza, G.N. (2017). Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. *Preventive Veterinary Medicine*, 142, 46–50.

Gutekunst, H., Eikmanns, B.J. e Reinscheid, D.J. (2004). The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion in to epithelial cells. *Infect. Immun.*, 72, 3495-3504.

Hahn, M.W., Moore, E.R.B., Höfle, M.G. (2000). Role of microcolony formation in the protistan grazing defense of the aquatic bacterium *Pseudomonas* sp. MWH1. *Microb Ecol* 39: 175–185.

Hall, J., Adams, N.H., Bartlett, L., Seale, A.C., Lamagni, T., Bianchi-Jassir, F., Lawn, J.E., Baker, C.J., Cutland, C., Heath, P.T., Ip, M., Le Doare, K., Madhi, S.A., Rubens, C.E., Saha, S.K., Schrag, S., Sobanjo-Ter Meulen, A., Vekemans, J. e Gravett, M.G. (2017). Maternal disease with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clinical Infectious Diseases*, 65(suppl_2)

Hall-Stoodley, L. e Stoodley, P. (2005). Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol*, 13(1):7–10.

Hansen, S.M., Uldbjerg, N., Kilian, M., e Sorensen, U.B.S. (2004). Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 83-89.

Hedén, L.-O., Frithz, E., e Lindahl, G. (1991). Molecular characterization of an IgA receptor from group B streptococci: sequence of the gene, identification of a proline-rich region with unique structure and isolation of N-terminal fragments with IgA-binding capacity. *European Journal of Immunology*, 21(6), 1481–1490.

Hensler, M.E., Liu, G.Y., Sobczak, S., Benirschke, K., Nizet, V. e Heldt, G.P. (2005). Virulence role of group B *Streptococcus* beta-hemolysin/cytolysin in a neonatal rabbit model of early-onset pulmonary infection. *J. Infect. Dis.*, 191, 1287-1291.

Hensler, M.E., Quach, D., Hsieh, C.J., Doran, K.S., e Nizet, V. (2008). CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B *Streptococcus*. *Microb. Pathog.*, 44, 84-88.

Herbert, M.A., Beveridge, C.J. e Saunders, N.J. (2004). Bacterial virulence factors in neonatal sepsis: group B *Streptococcus*. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 3, 225-229.

Héry-Arnaud, G., Bruant, G., Lanotte, P., Brun, S., Picard, B., e Rosenau, A. (2007). Mobile genetic elements provide evidence for a bovine origin of clonal complex 17 of *Streptococcus agalactiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4668–4672.

Hillier, D.F., Parry, G.J., Shannon, M.W., Stack, A.M. (2009). The effect of hospital bed occupancy on throughput in the pediatric emergency department. *Ann Emerg Med.* 53, 767-776.

Hynes, W.L. e Walton, S.L. (2000). Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *Fed. Eur. Microb. Soc.*, 183, 201-207.

Jarva, H., Jokiranta, T.S., Würzner, R., e Meri, S. (2003). Complement resistance mechanisms of streptococci. *Mol. Immunol.*, 40, 95-107.

Jefferson, K.K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* 236:163–173.

Johri, A. K., Lata, H., Yadav, P., Dua, M., Yang, Y., Xu, X., Hommae, A., Barocchid, M.A., Bottomley, M.J., Saulf, A., Klugman, K.P. e Black, S. (2013). Epidemiology of group B *Streptococcus* in developing countries. *Vaccine*, 31(S4), D43–D45.

Jones, N., Bohnsack, J.F., Takahashi, S., Oliver, K.A., Chan, M.S., e Kunst, F. (2003). Multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2530–2536.

Jonsson, P., Wadström, T. (1984). Cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* measured by the salt aggregation test (SAT). *Curr Microbiol* 10: 203–210.

Jorgensen, H.J., Nordstoga, A.B., Sviland, S., Zadoks, R.N., Solverod, L., Kvitle, B., e Mork, T. (2016) *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds – Rewriting the textbooks? *Vet Microbiol*, 184: 64–72.

Kaczorek, E., Malaczewska, J., Wójcik, R., e Siwicki, K.A. (2017). Biofilm production and other virulence factors in *Streptococcus* spp. isolated from clinical cases of bovine mastitis in Poland. *BMC Veterinary Research*, 13, 398.

Kalmus, P., Aasmae, B., Kaerssin, A., Orro, T., e Kask, K. (2011). Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet Scand*, 53.

Keefe, G.P. (1997). *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can. Vet.*, 38, 429-437.

Keefe, G. P. (2012). Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28(2), 203–216.

Kimura, K., Satowa, S., Jun-Ichi, W., Hiroshi, K., Kunikazu, Y., Naohiro, S., Noriyuki, N., Haru, K., Shibayama, K., e Arakawa, Y. (2008). First molecular characterization of group B streptococci with reduce penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2890- 2897.

Klaas, I.C., e Zadoks, R.N. (2017). An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 166–185.

Klimienė, I., Ružauskas, M., Špakauskas, V., Matusevičius, A., Mockeliūnas, R., Pereckienė, A., Butrimaitė-Ambrozėvičienė C. e Virgailis, M. (2011). Antimicrobial resistance patterns to beta-lactams of gram-positive cocci isolated from bovine mastitis in Lithuania. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14(3).

Konto-Ghiorghi, Y., Mairey, E., Mallet, A., Duménil, G., Caliot, E., Trieu-Cuot, P., e Dramsi, S. (2009). Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog.*, 5, 1-13.

Korir, M.L., Laut, C., Rogers, L.M., Plemmons J.A., Aronoff, D.M. e Manning, S.D., (2016). Differing mechanisms of surviving phagosomal stress among group B *Streptococcus* strains of varying genotypes. *Virulence* 2016:1-14

Kragh, K.N., Hutchison, J.B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A.E., Irie, Y., Jensen, P.Ø., Diggle, S.P., Allen, R.J., Gordon, V. e Bjarnsholt, T. (2016). Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *MBio* 7: e00237-16.

- Krishnan, V., Gaspar, A.H., Ye, N., Mandlik, A., Ton-That, H., e Narayana, S.V.L. (2007). An IgG- like Domain in the Minor Pilin GBS52 of *Streptococcus agalactiae* Mediates Lung Epithelial Cell Adhesion. *Structure*, 15(8), 893–903.
- Krömker, V. e Leimbach, S. (2017). Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 21–29.
- Kwatra, G., Cunnington, M.C., Merrall, E., Adrian, P.V., Ip, M., Klugman, K.P., Tam, W.H. e Madhi, S.A. (2016). Prevalence of maternal colonisation with group B *Streptococcus*: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(9), 1076–1084
- Kwatra, G., Adrian, P.V., Shiri, T., Buchmann, E.J., Cutland, C.L. e Madhi, S.A. (2015). Natural acquired humoral immunity against serotype-specific group B *Streptococcus* rectovaginal colonization acquisition in pregnant women. *Clin Microbiol Infect.* 21:568.e13–568.e21.
- Lachenauer, C.S., Creti, R., Miche, J.L.L., e Madoff, L.C. (2000). Mosaicism in the alpha-like protein genes of group B streptococci. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 9630-9635.
- Lakew, B.T., Fayera, T., e Ali, Y.M. (2019). Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*.
- Lambertsen, L., Ekelund, K., Skovsted, I. C., Liboriussen, A., e Slotved, H.C. (2010). Characterisation of invasive group B streptococci from adults in Denmark 1999 to 2004. *European Journal of Clinical Microbiology; Infectious Diseases*, 29(9), 1071–1077.
- Lamy, M. C., Dramsi, S., Billoët, A., Réglie-Poupet, H., Tazi, A., Raymond, J., Guérin F., Couvé E., Kunst F., Glaser P., Trieu-Cuot, P. e Poyart, C. (2006). Rapid detection of the “highly virulent” group B *Streptococcus* ST-17 clone. *Microbes and Infection*, 8(7), 1714–1722.
- Lancefield, R.C. (1934). A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (Group B). *J. Exp. Med.*, 59, 441-458.
- Lang, S., e Palmer, M. (2003) Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. *J. Biol. Chem.*, 278, 38167-38173.
- Lazzarin, M., Mu, R., Fabbrini, M., Ghezzi, C., Rinaudo, C.D., Doran, K.S., e Margarit, I. (2017). Contribution of pilus type 2b to invasive disease caused by a *Streptococcus agalactiae* ST-17 strain. *BMC Microbiol.*, 17(1):148.
- Le Doare, K., O’Driscoll, M., Turner, K., Seedat, F., Russell, N.J., Seale, A.C., Heath, P.T., Lawn, J.E., Baker, C.J., Bartlett, L., Cutland, C., Gravett, M.G., Ip, M., Madhi, S.A., Rubens, C.E., Saha, S.K., Schrag, S., Sobanjo-Ter Meulen, A., Vekemans, J., Kampmann, B. e GBS Intrapartum Antibiotic Investigator Group (2017). Intrapartum Antibiotic Chemoprophylaxis Policies for the Prevention of Group B Streptococcal Disease Worldwide: Systematic Review. *Clinical Infectious Diseases*, 65(suppl_2), S143–S151.
- Leigh, J.A. (1999). *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet J.*;157:225–238.
- Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochem*, 70(2):267–74.
- Lewis, K. (2010) Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.*, 64, 357-372.

- Lier, C., Baticle, E., Horvath, P., Haguenoer, E., Valentin, A.-S., Glaser, P., Mereghetti, L. e Lanotte, P. (2015). Analysis of the type II-A CRISPR-Cas system of *Streptococcus agalactiae* reveals distinctive features according to genetic lineages. *Front. Genet.* 6:214.
- Lindahl, G., Stålhammar-Carlemalm, M. e Areschoug, T. (2005) Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18, 102-127.
- Lipkens, Z., Piepers, S., De Visscher, A., e De Vlieghe, S. (2019). Evaluation of test-day milk somatic cell count information to predict intramammary infection with major pathogens in dairy cattle at drying off. *Journal of Dairy Science*.
- Liu, G.Y., Doran, K.S., Lawrence, T., Turkson, N., Puliti, M., Tissi, L. e Nizet, V., (2004). Sword and shield: Linked group B streptococcal b-hemolysin-cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14491–14496.
- Lopez-Sanchez, M.-J., Sauvage, E., Da Cunha, V., Clermont, D., RatsimaHariniaina, E., Gonzalez-Zorn, B., et al. (2012). The highly dynamic CRISPR system of *Streptococcus agalactiae* controls the diversity of its mobilome. *Mol. Microbiol.* 85, 1057–1071.
- Maddocks, S.E., Wright, C.J., Nobbs, A.H., Brittan, J.L., Franklin, L., Stromberg, N., Kadioglu, A., Jepson, M.A. e Jenkinson, H.F. (2011). *Streptococcus pyogenes* antigen I/II-family polypeptide AspA shows differential ligand-binding properties and mediates biofilm formation. *Mol Microbiol*; 81(4): 1034-49.
- Madrid, L., Seale, A.C., Kohli-Lynch, M., Edmond, K.M., Lawn, J.E., Heath, P.T., Madhi, S.A., Baker, C.J., Bartlett, L., Cutland, C., Gravett, M.G., Ip, M., Le Doare, K., Rubens, C.E., Saha, S.K., Sobanjo-Ter Meulen, A., Vekemans, J., Schrag, S. e Infant GBS Disease Investigator Group (2017). Infant group B streptococcal disease incidence and serotypes worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clinical Infectious Diseases*, 65(suppl_2), S160–S172
- Maisey, H.C., Hensler, M., Nizet, V., e Doran, K.S. (2007). Group B Streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J. Bacteriol*, 189, 1464–1467.
- Maisey, H.C., Doran, K.S. e Nizet, V. (2008). Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert. Rev. Mol. Med.*, 10, 1-18.
- Malachowa, N., e DeLeo, F. R. (2011). Staphylococcus aureus survival in human blood. *Virulence*, 2(6), 567–569.
- Manetti, A.G., Zingaretti, C., Falugi, F., Capo, S., Bombaci, M., Bagnoli, F., Gambellini, G., Bensi, G., Mora, M., e Edwards, A.M. (2007). *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol. Microbiol*, 64, 968–983.
- Manning, S.D., Lewis, M., Springman, A.C., Lehotzky, E., Whittam, T.S., e Davies, H. D. (2008). Genotypic diversity and serotype distribution of group B *Streptococcus* isolated from women before and after delivery. *Clin Infect Dis*, 46(12):1829–37.
- Margarit, I., Rinaudo, C.D., Galeotti, C.L., Maione, D., Ghezzi, C., Buttazzoni, E., Rosini, R., Runci, Y., Mora, M., Buccato, S., Pagani, M., Tresoldi, E., Berardi, A., Creti, R., Baker, C.J., Telford, J.L. e Grandi, G. (2009) Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the group B *Streptococcus* paradigm. *J. Infect. Dis.*, 199, 108–115.
- Marrie, T.J., e Costerton, J.W. (1983). A scanning and transmission electron microscopic study of the surfaces of intrauterine contraceptive devices. *Am. J. Obstet. Gynecol*, 146:384–394.

- Martinez, R. (1983). Plasmid-mediated and temperature-regulated surface properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 41: 921–930.
- Martins, E.R., Andreu, A., Melo-Cristino, J., Ramirez, M. (2013). Distribution of pilus islands in *Streptococcus agalactiae* that cause human infections: insights into evolution and implication for vaccine development. *Clin Vaccine Immunol.* 20:313–316.
- Melin, P. e Efstratiou, A. (2013) Group B streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries. *Vaccine*, 31, 31-42.
- Mdegela, R.H., Ryoba, R., Karimuribo, E.D., Phiri, E.J., Loken, T., Reksen, O. e Urrio, N.A. (2009). Prevalence of clinical and subclinical mastitis and quality of milk on smallholder dairy farms in Tanzania. *Journal of the South African Veterinary Association*, 80(3).
- Mereghetti, L., Sitkiewicz, I., Green, N. M. e Musser, J. M. (2008). Extensive Adaptive Changes Occur in the Transcriptome of *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*) in Response to Incubation with Human Blood. *3(9)*, 1–10.
- Morach, M., Stephan, R., Schmitt, S., Ewers, C., Zschöck, M., Reyes-Velez, J. e Jöhler, S. (2017). Population structure and virulence gene profiles of *Streptococcus agalactiae* collected from diferentes hosts worldwide. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(3), 527–536.
- Morozumi, M., Chiba, N., Igarashi, Y., Mitsuhashi, N., Wajima, T., Iwata, S., e Ubukata, K. (2015). Direct identification of *Streptococcus agalactiae* and capsular type by real-time PCR in vaginal swabs from pregnant women. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 21(1), 34–38.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., e Pfaller, M.A. (2017). *Microbiologia Médica*. 8 ed, Rio de Janeiro: Elsevier.
- Mweu, M.M., Nielsen, S.S., Halasa, T., e Toft, N. (2012) Annual incidence, prevalence and transmission characteristics of *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy herds. *Prev Vet Med*, 106: 244–250.
- Nagano, N., Nagano, Y., Toyama, M., Kimura, K., Shibayama, K., e Arakawa, Y. (2014). Penicillin-susceptible group B streptococcal clinical isolates with reduced cephalosporin susceptibility. *J Clin Microbiol*, 52:3406-3410.
- Nagano, N., Nagano, Y., Toyama, M., Kimura, K., Tamura, T., Shibayama, K., e Arakawa, Y. (2012) Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. *J Antimicrobial Chemother*, 67, 848-856.
- Nie, S., Lu, X., Hu, Y.W., Zheng, L., e Wang, Q. (2018). Influence of environmental and genotypic factors on biofilm formation by clinical isolates of group B streptococci. *MicrobPathog*, 121:45-50.
- Nizet, V. (2002) Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends Microbiol.*, 10, 575-580.
- Nobbs, A.H., Lamont, R.J. e Jenkinson, H.F. (2009). *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol. Mol. Biol. Ver.*, 73, 407-450.
- Nonaka, M. (2014). *Evolution of the Complement System. Subcellular Biochemistry*, 31–43
- O’Toole, G., Kaplan, H.B. e Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, 49–79.

Palmeiro, J.K., Dalla-Costa, L.M., Fracalanza, S.E.L., Botelho, A.C.N., Nogueira, K.S., Scheffer, M.C., Torres, R.S.L.A., Carvalho, N.S., Cogo, L.L., e Madeira, H.M.F. (2010). Phenotypic and Genotypic characterization of group B streptococcal isolates in Southern Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, 48, 4397-4403.

Pang, M., Sun, L., He, T., Bao, H., Zhang, L., Zhou, Y., Zhang, H., Wei, R., Liu, Y. e Wang, R. (2017). Molecular and virulence characterization of highly prevalent *Streptococcus agalactiae* circulated in bovine dairy herds. *Vet Res.*, 48, 65.

Paoletti, L.J., Bradford, J. e Paoletti, L.C. (1999) A Serotype VIII Strain among Colonizing Group B Streptococcal Isolates in Boston, Massachusetts *J. Clin. Microbiol.*, 37, 3759–3760.

Parker, E.R., Laut, C., Gaddy, A.J., Zadoks, N.R., Davies, D. e Manning, D.S. (2016) Association between genotypic diversity and biofilm production in group B *Streptococcus*. *BMC Microbiology*, 16, 86.

Parsek, M.R e Singh, P.K. (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 677-701.

Patras, K.A., Rösler, B., Thoman, M.L. e Doran, K.S. (2015). Characterization of host immunity during persistent vaginal colonization by Group B *Streptococcus*. *Mucosal Immunol.* 8:1339–1348.

Pearlman, M.D., Pierson, C.L. e Faix, R.G. (1998) Frequent resistance of clinical group B streptococci isolates to clindamycin and erythromycin. *Obstet Gynecol* 92, 258-261.

Pereira, U.P., Mian, G.F., Oliveira, I.C.M., Benchetrit, L.C., Costa, G.M., e Figueiredo, H.C.P. (2010). Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 140(1-2), 186–192.

Pezzicoli, A., Santi, I., Lauer, P., Rosini, R., Rinaudo, D., Grandi, G., Telford, J. L., e Soriani, M. (2008). Pilus backbone contributes to group B *Streptococcus* paracellular translocation through epithelial cells. *J. Infect. Dis.*, 198, 890–898.

Pinto, T.C.A., Costa, N.S., Souza, A.R.V., Silva, L.G., Corrêa, A.B.A., Fernandes, F.G., Oliveira, I.C.M., Mattos, M.C., Rosado, A.S., e Benchetrit, L.C. (2013). Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. *Braz J Infect Dis*, 17:131–136.

Poyart, C., Réglie-Poupet, H., Tazi, A., Billoët, A., Dmytruk, N., Bidet, P., Bingen, E., Raymond, J., e Trieu-Cuot, P. (2008). Invasive group B streptococcal infections in in-fants. France. *Emerg. Infect Dis.* 14, 1647–1649.

Radostits, O.M; Gay, C.C; Blood, W.C. e Hemcheliff, K.W. (2000). *Clínica Veterinária – Um tratado de doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 541-621.

Rato, M. G., Bexiga, R., Florindo, C., Cavaco, L. M., Vilela, C. L., e Santos-Sanches, I. (2013). Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 161, 286–294.

Rinaudo, C D., Rosini, R., Galeotti, C.L., Berti, F., Necchi, F., Reguzzi, V., Ghezzi, C., Telford, J.L., Grandi, G., e Maione, D. (2010) Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B *Streptococcus*. *PLoS One.*, 5, 9216.

Roberson, J.R. (2012). Treatment of clinical mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28(2), 271–288.

Roloff, K., Stepanyan, G., e Valenzuela, G. (2018). Prevalence of oropharyngeal group B *Streptococcus* colonization in mothers, family, and health care providers. PLOS ONE, 13(9), e0204617

Rosa-Fraile, M., e Spellerberg, B. (2017). Reliable Detection of Group B *Streptococcus* in the Clinical Laboratory. Journal of Clinical Microbiology, 55(9), 2590–2598

Rosan, B., e Argenbright, L. (1982). Antigenic determinant of the Lancefield group H antigen of *Streptococcus sanguis*. Infection and immunity, 38(3), 925–931.

Rosini, R. e Margarit, I. (2015). Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. Front Cell Infect Microbiol, 5:6.

Rosini, R., Rinaudo, C.D., Soriani, M., Lauer, P., Mora, M., Maione, D., Taddei, A., Santi, I., Ghezzi, C., Brettoni, C., Buccato, S., Margarit, I., Grandi, G. e Telford, J.L. (2006). Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. Mol. Microbiol., 61, 126–14.

Rubhun, W.C. Doenças do Gado Leiteiro, São Paulo: Roca, 2000, p. 339-370.

Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. Journal of Dairy Science, 100(12), 10381–10397.

Russell, N. J., Seale, A. C., O’Driscoll, M., O’Sullivan, C., Bianchi-Jassir, F., Gonzalez-Guarin, J., Lawn J. E., Baker C. J. Bartlett L., Cutland C., Gravett M. G., Heath P. T., Le Doare K., Madhi S. A., Rubens C. E., Schrag S. Sobanjo-Ter Meulen A., Vekemans J., Saha S. K., Ip M. e GBS Maternal Colonization Investigator Group (2017). Maternal colonization with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. clinical infectious diseases, 65(suppl_2), S100–S111.

Sagar, A., Klemm, C., Hartjes, L., Mauerer, S., van Zandbergen, G. e Spellerberg, B. (2013). The β -hemolysin and intracellular survival of *Streptococcus agalactiae* in human macrophages. PloS one, 8(4), e60160.

Santi, I., Scarselli, M., Mariani, M., Pezzicoli, A., Masignani, V., Taddei, A. (2007). BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood. Mol. Microbiol. 63, 754–767.

Santi, I., Maione, D., Galeotti, C. L., Grandi, G., Telford, J. L., e Soriani, M. (2009). BibA induces opsonizing antibodies conferring in vivo protection against group B *Streptococcus*. J. Infect. Dis. 200, 564–570.

SBP (2018). Sociedade Brasileira de Pediatria. Acesso em <http://www.sbp.com.br/publicacoes/>.

Schrag, S.J., Zywicki, S., Farley, M.M., Reingold, A.L., Harrison, L.H., Lefkowitz, L.B., Hadler, J.L., Danila, R., Cieslak, P.R., Schuchat, A. (2000). Group B Streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. N Engl J Med., 342(1):15–20.

Schrag, S.J., Gorwitz, R., Fultz-Butts, K. e Schuchat, A. (2002) Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. MMWR Recomm Rep. 51(RR-11), 1-22.

Schrag, S.J. e Verani, J.R. (2013) Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine. Vaccine, 31, 20-26.

Schuchat, A. e Wenger, J.D. (1994). Epidemiology of group B streptococcal disease: Risk factors, prevention strategies, and vaccine development. Epidemiol Rev, 16(2):374–402.

Shabayek, S., e Spellerberg, B. (2018). Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. *Frontiers in Microbiology*, 9.

Simões, J.A., Alves, V.M., Fracalanza, S.E.L., Camargo, R.P., Mathias, H.M., e Brolazo, E.M. (2007). Phenotypical characteristics of group B *Streptococcus* in parturients. *Braz J Infect Dis*, 11:261–266.

Slotved, H.C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S., Gilbert, G.L. (2007). Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J Clin Microbiol*, 9:2929–2936.

Sorensen U.B., Poulsen K., Ghezzi C., Margarit I., e Kilian M. (2010). Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. *mBio*. 1:3.

Soto, S. M. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4(3), pp. 223-229.

Springman, A.C., Lacher, D.W., Waymire, E.A., Wengert, S.L., Singh, P., e Zadoks, R.N. (2014). Pilus distribution among lineages of group B *Streptococcus*: an evolutionary and clinical perspective. *BMC Microbiol*. 14:159.

Stewart, P.S., e Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet.*, 358(9276), pp. 135-138.

Sukhnanand, S., Dogan, B., Ayodele, M.O., Zadoks, R.N., Craver, M.P., Dumas, N.B., Schukken, Y.H., Boor, K.J., e Wiedmann, M. (2005). Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates. *J Clin Microbiol*.43(3):1177–1186.

Svennesen, L., Nielsen, S. S., Mahmmud, Y. S., Krömker, V., Pedersen, K., e Klaas, I. C. (2018). Association between teat skin colonization and intramammary infection with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in herds with automatic milking systems. *Journal of Dairy Science*.

Taddei, C.R. e Martinez, M.B. (2015). Fatores de virulência I: adesão, invasão e sideróforos. *Microbiologia*. 6 ed. Atheneu, pp 143-147

Tavella, A., Bettini, A., Cocchi, M., Idrizi, I., Colorio, S., Viel, L., e Zanolari, P. (2018). Isolation of *Streptococcus agalactiae* in a female llama (*Lama glama*) in South Tyrol (Italy). *BMC Veterinary Research*, 14(1).

Tazi, A., Disson, O., Bellais, S., Bouaboud, A., Dmytruk, N., Dramsi, S., Mistou, M., Khun, H., Mechler, C., Tardieux, I., Trieu-Cuot, P. Lecuit, M. e Poyart, C. (2010). The surface protein HvgA mediates group B *Streptococcus* hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *207(11)*, 2313–2322.

Teatero, S., McGeer, A., Low, D. E., Li, A., Demczuk, W., Martin, I., e Fittipaldi, N. (2014). Characterization of invasive group B *Streptococcus* strains from the greater Toronto area, Canada. *Journal of clinical microbiology*, 52(5), 1441–1447.

Teatero, S., Neemuchwala, A., Yang, K., Gomes, J., Athey, T.B.T., Martin, I., Demczuk, W., McGeer, A., e Fittipaldi, N. (2017). Genetic evidence for a novel variant of the pilus island 1 backbone protein in group B *Streptococcus*. *J Med Microbiol*, 66(10):1409-1415.

Teixeira, L. M., Pinto, T. C. A. e Merquior, V. L. C. (2015). *Streptococcus*, *Enterococcus* e gêneros relacionados. In: *Microbiologia*, ALTERTHUM (Atheneu), 195-199.

- Tenhagen, B.A., Koster, G., Wallmann, J. e Heuwieser, W. (2006) Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci.*, 89, 2542-2551.
- Thau, L., Mahajan, K., (2018). *Physiology, Opsonization*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan.
- Thi, E.P., Lambertz, U., e Reiner, N.E., (2012). Sleeping with the enemy: how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002551
- Trunk, T., Khalil, H.S., e Leo, J.C. (2018). Bacterial autoaggregation. 4(March), 140–164.
- Tsolia, M., Psoma, M., Gavriili, S., Petrochilou, V., Michalás, S., Legakis, N., e Karpathios, T. (2003). Group B *Streptococcus* colonization of Greek pregnant women and neonates: prevalence, risk factors and serotypes. *Clin. Microbiol. Infect.*, 9, 832-838.
- Valentin-weigand P, Benkel P, Rohde M, Chhatwal GS. (1996). Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. *Infect Immun*; 64:2467–73.
- Wastfelt, M., Stalhammar-Carlemalm, M., Delisse, A.M., Cabezon, T. e Lindahl, G. (1997) The Rib and alpha proteins define a family of group B streptococcal surface proteins that confer protective immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 418, 619-622.
- Xia, F.D., Mallet, A., Caliot, E., Gao, C., Trieu-Cuot, P., e Dramsi, S. (2015). Capsular polysaccharide of Group B *Streptococcus* mediates biofilm formation in the presence of human plasma. *Microbes Infect*, 17(1):71-6.
- Yadeta, T.A., Worku, A., Egata, G., Seyoum, B., Marami, D., e Berhane, Y. (2018). Vertical transmission of group B *Streptococcus* and associated factors among pregnant women: a cross-sectional study, Eastern Ethiopia. *Infect Drug Resist*, 11:397-404.
- Yang, Y., Liu, Y., Ding, Y., Yi, L., Ma, Z., Fan, H., e Lu, C. (2013). Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Eastern China. *PLoS One*, 8(7): e67755.
- Yildirim, A. A., La, M. L. E.R., C., Wei, R., e Kopp, P. (2002). Pheno- and genotypic properties of streptococci of serological group B of canine and feline origin. *FEMS Microbiology Letters*, 212(2), 187–192.
- Zadoks, R.N., Middleton, J.R., McDougall, J., Katholm, e Schukken, Y.H. (2011). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16:357–3
- Zhang, S., Green, N.M., Sitkiewicz, I., Lefebvre, R.B., Musser, J.M. (2006) Identification and characterization of an antigen I/II family protein produced by group A *Streptococcus*. *Infect Immun*; 74(7): 4200-13.