

Ana Clarisse Mercês

*Streptococcus agalactiae*: caracterização fenotípica e genotípica  
de amostras isoladas de espermocultura



**Monografia apresentada no Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito  
para obtenção de grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas: Microbiologia e Imunologia**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GOÉS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
NOVEMBRO/2022

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob orientação do Professor Dr. Sérgio Eduardo L. Fracalanza e coorientação da Dra. Natália Silva da Costa Granato.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

## CIP - Catalogação na Publicação

M554s Mercês, Ana Clarisse  
Streptococcus agalactiae: Caracterização fenotípica e genotípica de amostras isoladas de espermocultura / Ana Clarisse Mercês. -- Rio de Janeiro, 2022.  
73 f.

Orientador: Sergio Eduardo Longo Fracalanza.  
Coorientadora: Natália Silva da Costa Granato.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Streptococcus agalactiae. 2. Caracterização. 3. Prostatite. 4. Susceptibilidade. 5. Biofilme. I. Longo Fracalanza, Sergio Eduardo, orient. II. Silva da Costa Granato, Natália, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me permitir saúde e determinação para ultrapassar todos os obstáculos ao longo do curso.

A minha querida mãe por acreditar nos meus sonhos, pelo carinho, amor e por ter me ajudado na medida do possível. Gostaria de agradecer também a minha amada sobrinha Amanda Mercês, por ter acreditado em mim e não ter me deixado desistir, obrigado pelos momentos acolhedores foram muito importantes.

Ao meu querido e amado Orientador, Sergio Eduardo L. Fracalanza, durante esses 2 e meio sendo orientada por você, eu pude aprender técnicas e aprimorar meu pensamento científico, a experiência e aprendizado que obtive são de valor imensurável. Não tenho palavras para lhe agradecer por ter confiado a mim esse trabalho e por me acolher. Espero que, como forma de agradecimento, eu possa continuar contribuindo com esse projeto tão importante. A sua dedicação ao ensino é uma inspiração para mim, saiba que me sinto muito privilegiada por ser sua aluna, espero que um dia, eu possa lhe encher de orgulho.

As minhas amadas co-orientadoras, Ana Caroline e Natália Silva, agradeço pela paciência, apoio e por compartilharem comigo seus conhecimentos, a ajuda de vocês foi muito importante para a conclusão deste trabalho. Agradeço, pois, sem vocês eu não teria conseguido realizar todo esse trabalho em um período tão curto. Obrigado por terem me dado um voto de confiança e pela disponibilidade de tempo que foi gasto comigo, saiba que valorizei cada aprendizado e vou leva-los comigo para sempre.

Com muito carinho, agradeço aos meus valiosos amigos que este curso me deu, meus queridos amigos desde do primeiro período, Camilla, Laenne, Marcelle, Marcos e Tainne, agradeço por me ouvirem, aturarem e ficarem do meu lado nos momentos de angústia, a graduação não se faz sozinho e graças a Deus eu tive vocês. Obrigada pelos conselhos, gargalhadas, surtos e confidências, tenho certeza que minhas frustrações foram amenizadas pois vocês sempre estiveram comigo. Agradeço também a Mariana e Isabella, obrigada pelos surtos de reativações de amostras, saiba que a contribuição de vocês neste trabalho foi muito importante. Encerro essa etapa agradecida por ter conhecido vocês.

As minhas amigas Adriane e Victoria pela amizade e apoio em momentos de tensão, agradeço pelos conselhos e pelos momentos de descontração, admiro muito vocês e para mim vocês são

inspiração, me sinto agradecida por ter conhecidos pessoas tão boas e inteligentes, amo vocês e espero que nossa amizade siga além da graduação.

Aos meus colegas do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica, pelos aprendizados e ajuda que obtive. Em especial à professora Karla Rodrigues pelos conselhos, ao Marco Antônio por ter me auxiliado e me treinado. Ao meu querido amigo Vinicius, por ter sido um confidente, te admiro muito, você é força e uma inspiração para mim.

Aos alunos da professora Tati do 028, agradeço por me ajudarem no PCR e biofilmes, muito obrigada!!

Agradeço com muito carinho a banca examinadora deste trabalho, por se disponibilizarem para analisar e contribuir com perspectivas para esse projeto.

À CNPQ pelo apoio financeiro.

## FICHA DE APROVAÇÃO

**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: Ana Clarisse Mercês  
 DRE: 119016514

BANCA EXAMINADORA: Profa. Karla Rodrigues Miranda (Presidente)  
 Dra. Laura Maria Andrade de Oliveira  
 M.Sc. Leandro Corrêa Simões  
 Profa. Joana Montezano Marques (Suplente)

Título da Monografia: **“*Streptococcus agalactiae*: Caracterização fenotípica e genotípica de amostras isoladas de espermocultura”**

Local: Sala D-27/ IMPPG / CCS / UFRJ  
 Data e hora de início: 18 de novembro de 2022 às 13:30h

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 10,0 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, 18 de novembro de 2022.

NOTA  
10,0  
40  
10,0  
10,0

Banca Examinadora:

Karla Rodrigues Miranda  
 Profa. Karla Rodrigues Miranda

Dra. Laura Maria Andrade de Oliveira  
Leandro Corrêa Simões  
 M.Sc. Leandro Corrêa Simões

Joana M. Marques  
 Profa. Joana Montezano Marques

Aluno:

Ana Clarisse Mercês  
 Ana Clarisse Mercês

Orientador:

Prof. Sérgio Eduardo Longo Procopianzza  
 Prof. Sérgio Eduardo Longo Procopianzza  
 Coorientador: Dra. Natália Silva da Costa Granato Rocha  
 Dra. Natália Silva da Costa Granato Rocha

Coordenador  
 de TCC

Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho  
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## RESUMO

Ana Clarisse Merces

Orientadores: Sergio Eduardo longo Fracalanza e Natália Silva da Costa Granato

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* (“Group B *Streptococcus*”, GBS) inicialmente foi reconhecido como causador de mastite bovina e é um importante patógeno causador de infecções em humanos. A detecção de *S. agalactiae* em espermocultura de pacientes com prostatite bacteriana crônica gerou interesse, pois pouco se sabe da associação desse microrganismo com quadros de prostatite e epididimite. Por isso, o objetivo deste estudo foi caracterizar amostras de GBS, isoladas a partir de espécimes clínicos de espermoculturas por métodos fenotípicos e genotípicos. Este estudo incluiu 49 cepas de GBS, provenientes de sêmen, isoladas em um laboratório particular, entre os anos de 2019 e 2022. Inicialmente foi realizada uma identificação presuntiva dos isolados pelos métodos de coloração de Gram, teste de fator CAMP e teste da hidrólise do hipurato de sódio. A confirmação da identificação foi realizada utilizando-se a técnica de MALDI-TOF. A determinação do tipo capsular foi realizada utilizando-se o método de aglutinação em látex, com auxílio do kit *Immulex Strep-B* (SSI Diagnóstica, Dinamarca) e a determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada através da técnica de disco-difusão, seguindo as recomendações do CLSI. Os genes envolvidos na produção dos pili PI-1, PI-2a e PI-2b foram detectados através da metodologia de PCR uniplex. Todas as amostras foram avaliadas quanto à capacidade de produção de biofilme em placas de poliestireno. As amostras de GBS se apresentaram como cocos gram positivos, CAMP positivas, capazes de hidrolisar o hipurato de sódio e com escores de confiabilidade ( $\geq 2,0$ ) por MALDI-TOF. A distribuição dos tipos sorológicos entre as amostras demonstrou predominância do sorotipo V (28,6%), seguido dos sorotipos Ia (22,4%), Ib (14,3%), IV (14,3%), III (10,2%) e II (4,1%). Três amostras foram não tipáveis (NT= 6%). Quanto ao perfil de susceptibilidade, todas as amostras foram sensíveis a penicilina e vancomicina, enquanto a resistência a tetraciclina, levofloxacina, eritromicina e clindamicina foi observada, respectivamente, em 81,6%, 8,2%, 44,8% e 16,3% das amostras. Ainda, 4 amostras (8%) demonstraram multirresistência após apresentarem perfil de resistência a levofloxacina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e cloranfenicol. Todas as amostras apresentaram, ao menos um tipo dos pili avaliados, sendo o pilus mais prevalente o PI-2a (50%) e a combinação PI-1 + PI-2a a predominante (30%). Um total de 93,9% das amostras demonstrou a capacidade de formar biofilme, sendo que 55,1% foram consideradas fortes produtores. Esses resultados trazem subsídios importantes por se tratar de um trabalho com dados inéditos quanto a caracterização fenotípica e genotípica de amostras de GBS provenientes de esperma no Brasil. Além disso, os dados aqui reportados, como as altas taxas de resistência, a multirresistência e a ampla distribuição de importantes estruturas de virulência entre as amostras analisadas, nos alertam para a necessidade de uma maior vigilância sobre as amostras de GBS nesse contexto em nossa região.

**Palavras chaves:** *Streptococcus agalactiae*, virulência, prostatite, resistência antimicrobiana, biofilme.

## ABSTRACT

Ana Clarisse Mercedes

Orientadores: Sergio Eduardo Longo Fracalanza e Natália Silva da Costa Granato

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* (“Group B *Streptococcus*”, GBS) was initially recognized as causing human infections. The detection of *S. agalactiae* in clinical strains of patients with bacterial prostatitis generated interest, as little is known about the association of this microorganism with cases of epididymitis prostatitis. Therefore, the aim of this study is characterized by phenotypic and genotypic methods isolated from clinical studies of sperm cultures. This study included GBS 49 isolated from semen processed in a private laboratory, in the years 2019 and 2022. Initially, presumptive identification of the isolates was carried out by the selection of Gram, CAMP factor test, and sodium hypurate hydrolysis test. Identification confirmation was performed using the MALDI-TOF. Capsular type determination was performed using the latex agglutination method, with the aid of the *Immulex Strep-B* kit (SSI Diagnóstica, Denmark). The determination of antimicrobial susceptibility was performed using the profile diffusion technique, following the recommendations of the CLSI. The genes involved in the production pili PI-1, PI-2a and PI-2b were detected using the uniplex PCR methodology. All strains were evaluated for biofilm production capacity. All of them were established in positive cocci format, positive CAMP, and all were able to hydrolyze hippurate. All isolates were identified as *S. agalactiae* with a reliability score ( $\geq 2.0$ ) by MALDI-TOF. A distribution of serological types among isolated types pre-dominance of serotypes V (28,6%), followed by Ia (22,4%), Ib (14,3%), IV (14,3%), III (10,2 %) and II (4,1%). Three isolated were non-typable (NT= 6%). As for the susceptibility profile, all isolates were susceptible to penicillin and vancomycin, while the resistant to levofloxacin, erythromycin, and clindamycin were observed, respectively, in 81,6%, 8,2%, 44,8%, 16,3% of the isolates. Furthermore, 4 strains demonstrate multi-resistance after presenting a resistance profile to tetracycline, levofloxacin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, and chloramphenicol. All strains showed at least one type of pili, evaluated, the most prevalent pilus being PI-2a (50%) and the combination PI-1 + PI-2A the predominant (30%). A total of 93.9% of the isolates demonstrated the ability to be biofilm forming, of which 55.1% were strong biofilm producers. These results provide support to the literature as it is a work with unpublished data regarding the phenotypic and genotypic characterization of GBS from sperm of circulating strains in Brazil. Furthermore, the data reported here, such as resistance rates, broad multidrug resistance and the distribution of virulence structures, call attention to the need for greater surveillance of GBS strains in this context in our region

**Keywords:** *Streptococcus agalactiae*, virulence, prostatitis, antimicrobial resistance, biofilm.



## RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS

Você já ouviu falar da bactéria *Streptococcus agalactiae*? Venha aprender um pouco sobre essa bactéria tão importante. Inicialmente essa bactéria foi reconhecida como causadora de uma inflamação na glândula mamária das vacas que é chamada de mastite bovina, depois surgiu como causador de infecções em humanos, principalmente em mulheres grávidas e recém-nascidos, também podendo causar doenças em pessoas com o sistema imune enfraquecido. Atualmente, essa bactéria está sendo encontrada em material de esperma de pacientes com suspeita de prostatite, porém nenhum dos estudos encontrados na literatura, realizou uma análise mais detalhada. Por isso, o objetivo deste trabalho foi realizar uma caracterização por meios de vários testes, como: saber a capacidade de se agruparem (formação de biofilme), resistência aos antibióticos e pesquisa de proteínas que podem contribuir para a capacidade desta bactéria de causar uma doença dentro do corpo humano. Como resultados, o presente estudo mostrou que a maioria das amostras foi capaz de se agrupar formando biofilme e com isso, sendo capaz de persistir no hospedeiro. Além disso, todas as amostras foram resistentes a alguma classe de antibiótico. E mais ainda, em relação às proteínas de virulência, essa bactéria mostrou-se capaz de produzir proteínas que ajudam a entrar no organismo hospedeiro e colonizar, podendo causar infecções. São necessários mais estudos sobre esse microrganismo, para saber seu real papel e impacto em infecções no trato urinário do homem.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 - <math>\beta</math>-hemólise de <i>Streptococcus agalactiae</i> em ágar sangue.</b> Obtida no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (imagem autoral).....	18
<b>Figura 2 - Representação da estrutura de GBS.</b> A composição do carboidrato C presente na parede celular permite a diferenciação sorológica em grupos, onde os estreptococos do grupo B apresentam na composição química desse carboidrato a galactose, N-acetilglucosamina e ramnose. <i>S. agalactiae</i> também podem ser divididos em sorotipos, baseado na composição do polissacarídeo capsular.....	19
<b>Figura 3 - Fatores que contribuem para a colonização por <i>Streptococcus agalactiae</i>.</b> Figura adaptada de Patras e Nizet (2018), produzida na versão gratuita no programa BioRender.....	22
<b>Figura 4 - Teste do Fator CAMP.</b> Obtida no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (imagem autoral).....	44
<b>Figura 5 - Distribuição dos tipos capsulares através da aglutinação em látex</b> utilizando o kit Immulex Strep-B (SSI Diagnóstica, Dinamarca) de amostras de espermocultura.....	45
<b>Figura 6 - Susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de espermocultura</b> analisadas.....	46
<b>Figura 7 - Observação do fenótipo <math>MLS_B</math> induzido pelo teste D.....</b>	47
<b>Figura 8 - Distribuição dos Pili entre as amostras avaliadas no estudo.....</b>	47
<b>Figura 9 - Classificação dos pili de acordo com a distribuição de sorotipos.....</b>	48
<b>Figura 10 - Classificação das amostras, quanto a produção de biofilme, distribuídas</b> nos diferentes sorotipos.....	49

<b>Figura 11</b> - Classificação das amostras de acordo com os genes envolvidos na produção dos Pili em relação aos fenótipos do biofilme apresentados em amostras de espermocultura.....	50
<b>Figura 12</b> - Classificação das cepas de espermocultura fortes produtoras de biofilme em relação a distribuição dos Pili.....	51
<b>Figura 13</b> - Classificação das amostras de acordo com o perfil de resistência em relação aos fenótipos do biofilme apresentados em amostra de espermocultura.....	52
<b>Figura 14:</b> <i>Neighbor Joining tree</i> gerada a partir de espectros obtidos pelo espectrofotômetro de massa do MALDI-TOF MS entre 49 amostras incluídas neste estudo. As cores dos nódulos representam o perfil dos pili e está nomeado de acordo com os sorotipos.....	53

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1** - Tamanho esperado dos produtos da amplificação, iniciadores utilizados e suas respectivas referências para detecção dos genes envolvidos na produção dos pili em *Streptococcus agalactiae* em amostras de material clínico de espermocultura..... 42
- Tabela 2** - Classificação dos biofilmes em placas de poliestireno de acordo com a densidade ótica (DO570nm) do biofilme..... 43
- Tabela 3** - Tabela 3: Dados dos isolados de espermocultura de *Streptococcus agalactiae* obtidas de pacientes com suspeita de PBC, abaixo está exposto ano, idade dos pacientes, tipo capsular, susceptibilidade aos antimicrobianos, pilus e produção de biofilme..... 72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alp	família de proteínas “Alpha-like”
ANOVA	análise de variância
ATCC	do inglês, “American Type Culture Collection”
ATP	Adenosina trifosfato
$\beta$ -h/c	Beta-hemolisina/citolisina
BHI	do inglês, “Brain Heart Infusion”
BibA	adesina imunogênica de <i>Streptococcus</i> do grupo B
BsaB ou FbsC	adesina de superfície de <i>Streptococcus</i> do grupo B
CAMP	fator CAMP, descrito por Christie, Atkins e Munch-Petersen
CDC	do inglês, “Centers for Disease Control and Prevention”
CLSI	do inglês, “Clinical Laboratory Standards Institute”
<i>cylE</i>	gene cromossômico que codifica a beta-hemolisina
CspA	adesina imunogênica de <i>Streptococcus</i> do grupo B
CovR/S ou CsrR/S	sistema de 2 componentes que controla o operon <i>cyl</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidade Óptica
Fbs	proteínas ligadoras de fibrinogênio
GBS	do inglês, “Group B <i>Streptococcus</i> ”
Galp	Galactose
GlcP	Glucose
GlcPnac	N-acetilglucosamina
HCCA	ácido $\alpha$ ciano-4-hidroxicinâmico
HvlB	hialuronidase
HvgA	adesina hipervirulenta de <i>Streptococcus</i> do grupo B
<i>hyl</i>	gene que codifica a hialuronidase
IL	interleucina
ITU	Infecções no trato urinário
Lmb	proteína ligadora de laminina
MALDI-TOF MS	do inglês, “Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”

NeupNAc	ácido N-acetilneuramínico
NIH	do inglês, “National Institute of Health”
PBA	prostatite bacteriana aguda
PBC	prostatite crônica bacteriana
PCR	do inglês, “Polymerase Chain Reaction”
PI	do inglês, “Pilus Island”
ScpA/B	C5a peptidase de <i>Streptococcus</i> do grupo B
Srr	proteínas ricas em serina
TGU	trato geniturinário
THB	do inglês, “Todd-Hewitt broth”
TLR	do inglês, “receptor Toll-Like”
TNF	do inglês, “fator de necrose tumoral”
UFC	unidade formadora de colônia

## Índice

<b>RESUMO</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS</b>	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
1.1 <i>Streptococcus agalactiae</i> : características e classificação .....	17
1.2 Tipos capsulares de estreptococos do grupo B .....	18
1.3 Fatores de virulência .....	20
1.4 Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	24
1.5 Importância clínica de <i>Streptococcus agalactiae</i> em infecções em animais .....	26
1.6 Importância clínica de <i>S. agalactiae</i> em infecções humanas .....	28
1.7 Infecções bacterianas no trato urinário (ITU) do homem e vias de contaminação .....	29
1.8 Classificação dos quadros de prostatite e etiologia.....	30
1.9 Epidemiologia e faixa etária de aparecimento de sintomas em prostatite .....	32
1.10 Papel da espermiocultura no diagnóstico da prostatite e tratamento .....	33
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	35
<b>3. OBJETIVOS</b>	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	37
4.1 Cepas bacterianas .....	37
4.2 Identificação fenotípica das amostras bacterianas.....	37
4.3 Identificação por MALDI-TOF MS .....	38
4.4 Determinação do tipo capsular.....	38
4.5 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos .....	39
4.6 Obtenção de DNA bacteriano .....	40
4.7 Detecção de genes envolvidos na produção dos pili .....	41
4.8 Avaliação da formação de biofilme em poliestireno .....	42
4.9 Análises <i>in silico</i> .....	43
<b>5. Resultados</b>	44
5.1 Teste fenotípicos para identificação presuntiva .....	44
5.2 Confirmação da identificação .....	44
5.3 Determinação do tipo capsular.....	45

5.4 Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	45
5.5 Ocorrência dos Pili.....	47
5.6 Avaliação da formação do biofilme .....	48
5.7 Análise dos espectros gerados pelo MALDI-TOF MS.....	52
<b>6. Discussão</b>	<b>54</b>
<b>7. Conclusão</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>62</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>72</b>



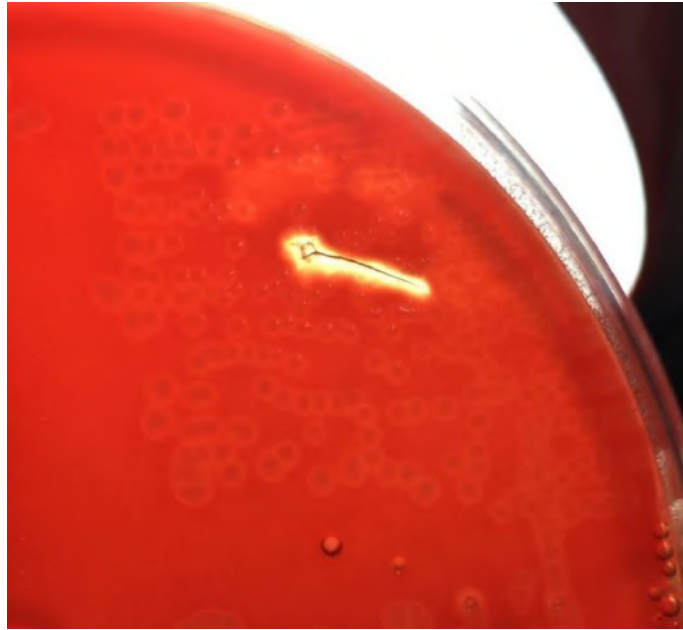
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Streptococcus agalactiae*: características e classificação

*Streptococcus agalactiae*, também conhecido como estreptococo do grupo B (EGB ou GBS, do inglês “Group B *Streptococcus*”) é uma bactéria pertencente ao filo Firmicutes, ordem *Lactobacillales*, família *Streptococcaceae*, gênero *Streptococcus*, e possui características morfológicas e fisiológicas comuns a outras espécies do gênero. São microrganismos que se apresentam como células esféricas ou ovóides, Gram-positivas, com arranjo em cadeias ou pares e pertencentes ao grupo dos estreptococos piogênicos (Euzeby, 2021). São catalase-negativos, imóveis, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e nutricionalmente exigentes, necessitando, então, de meios de cultura complexos para o seu crescimento (Hardie & Whiley, 1997; Dermer *et al.*, 2004; Spellerberg e Brandt, 2015). Assim como outras espécies do gênero *Streptococcus*, exibem crescimento ótimo em temperatura de 35°C a 37°C em atmosfera normal. Esse grupo bacteriano não forma ATP através da via clássica de transporte de elétrons; assim, para a produção de energia e precursores para a síntese do material celular é necessário a fermentação de vários carboidratos envolvendo diversas enzimas não constitutivas que levam a produção de ácido láctico (Hardie & Whiley, 1997).

Como nos outros membros do gênero, a parede celular de GBS é constituída por peptidoglicana, variados carboidratos, incluindo ácido teicóico, e proteínas. Estes compostos de parede apresentam-se em um arranjo semelhante a uma estrutura em camadas, na qual não são bem delimitadas, onde a peptidoglicana constitui a camada mais interna e significativa. A composição da peptidoglicana tem açúcares aminados, glicosamina, ácido murâmico, e também a presença de açúcares redutores como glicose, galactose e ramnose (Pritchard, Gray & Dillon, 1984).

A espécie *S. agalactiae* apresenta variabilidade no que diz respeito às características hemolíticas observadas quando cultivada em meio ágar sangue, porém a maioria das amostras apresenta hemólise total, como pode ser observado na **Figura 1**, sendo, então, considerada pertencente ao grupo dos  $\beta$ -hemolíticos. Entretanto, a ausência de  $\beta$ -hemólise em amostras de GBS isoladas de animais é comumente descrita, sugerindo a existência de linhagens distintas de amostras  $\beta$ -hemolíticas e não  $\beta$ -hemolíticas (Elliot *et al.*, 1990; Spellerberg e Brandt, 2015).



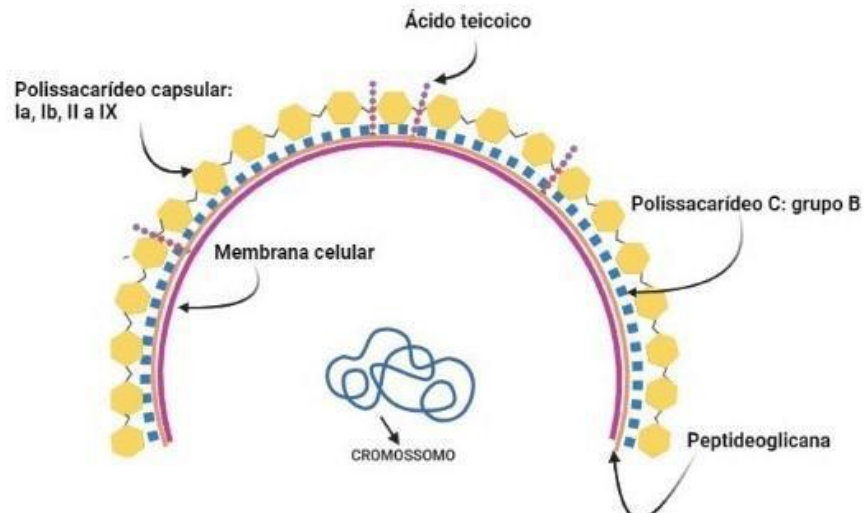
**Figura 1.**  $\beta$ -hemólise de *Streptococcus agalactiae* em ágar sangue. Obtida no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (imagem autoral).

A cápsula polissacarídica dispõe de uma composição variável, e é utilizada como base para a tipificação sorológica, além de ser importante para estudos epidemiológicos e de patogenicidade da espécie (Wessels *et al*, 1989; Nobbs *et al.*, 2009). No que diz respeito a composição química e antigênica do carboidrato C da parede celular, os estreptococos hemolíticos podem ser divididos em grupos sorológicos, classificados de acordo com as letras do alfabeto A-H e K-V (Lancefield, 1933; Chen, 2019), sendo os mais importantes para infecções humanas os grupos A, B, C, E, F e G (Teixeira, Pinto & Merquior, 2015). A espécie *S. agalactiae* expõe constituintes específicos que caracterizam o antígeno de grupo B do sistema de classificação de Lancefield (Lancefield, 1933). Este polissacarídeo tem na composição de sua estrutura principal: galactose, ramnose e N-acetilglucosamina que são ligados a posição 4 de uma ramnose na estrutura principal da molécula (Pritchard, Gray & Dillon, 1984).

## 1.2 Tipos capsulares de estreptococos do grupo B

*S.agalactiae* pode ser dividido em tipos sorológicos baseado na composição de seu polissacarídeo capsular (**Figura 2**), que está localizado na região externa da parede celular. Atualmente, 10 sorotipos são reconhecidos denominados como Ia, Ib e II a IX (Furfaro, Chang & Payne, 2018; Lin *et al*, 2021). Os sorotipos mais encontrados entre as amostras isoladas de quadros infecciosos são Ia, Ib, II, III e V, porém a frequência do sorotipo V aumentou nos

últimos anos, enquanto o sorotipo IV emergiu como causa de doenças em adultos e neonatos (Berti *et al.*, 2014; Botelho *et al.*, 2018a).



**Figura 2. Representação da estrutura de GBS.** A composição do carboidrato C presente na parede celular permite a diferenciação sorológica em grupos, onde os estreptococos do grupo B apresentam na composição química desse carboidrato a galactose, N-acetilglucosamina e ramnose. *S. agalactiae* também pode ser dividido em sorotipos, baseado na composição do polissacarídeo capsular. (Imagem autoral, produzida na versão gratuita do programa BioRender).

Diversas bactérias que são encapsuladas possuem genes conservados entre os diversos sorotipos que flanqueiam genes que são codificadores de enzimas únicas para um sorotipo capsular específico. Em GBS, o que ocorre é que em um grupo central de genes para polimerases e glicosiltransferases sorotipo-específicas, um lado é flanqueado por genes codificando enzimas que sintetizam e ativam ácido siálico, que é o açúcar terminal sobre a cadeia lateral de todos os 10 sorotipos e do outro lado dos genes das glicosiltransferases se encontra um grupo de genes que podem estar envolvidos na exportação da cápsula polissacarídica. Os monossacarídeos Galactose (Galp), Glucose (Glc), N-acetilglucosamina (GlcNac) e ácido N-acetilneuramínico (NeupNac) são conservados nos sorotipos, entretanto o padrão da ligação glicosídica é único para cada sorotipo. É sugerido que a evolução de GBS ocorreu através da substituição em bloco de genes de glicosiltransferases individuais com sequências de DNA que codificam enzimas com novas especificidades de ligação (Cieslewicz *et al.*, 2000; Berti *et al.*, 2014).

A distribuição dos sorotipos varia geograficamente e estudos mostram que nos EUA e Europa os sorotipos Ia, Ib, II, III e V são encontrados em 98% de todas amostras clínicas, enquanto os sorotipos IV, VI, VII, VIII e IX são raramente encontrados (Furfaro, Chang & Payne, 2018). Ainda, estudos mostram que no Japão os sorotipos VI e VIII são encontrados com maior frequência, enquanto no Brasil os sorotipos mais predominantes são Ia, II, Ib e V (Brimil *et al.*, 2006; Dutra *et al.*, 2014). De forma geral, o sorotipo Ia é o mais prevalente mundialmente e o mais associado às doenças maternas, enquanto o Ib é o menos prevalente em doenças maternas e consideravelmente mais associado à colonização materna na América do Sul do que em outros países. O sorotipo II é o quarto mais prevalente em doenças maternas e o quinto em doenças neonatais no mundo. O sorotipo III é bem reconhecido por sua associação com doenças, sendo o segundo sorotipo mais prevalente em doenças maternas e o principal sorotipo em doenças neonatais invasivas. O sorotipo IV é menos prevalente, porém foi detectada a emergência desse sorotipo no Canadá e nos Estados Unidos. O sorotipo V é reconhecido como o terceiro sorotipo associado a doenças maternas nos Estados Unidos, França e Reino Unido. Em adição, os sorotipos III e V são os mais comumente encontrados em adultos, sendo o sorotipo III fortemente relacionado com meningite e artrite séptica, enquanto o sorotipo V foi o mais relacionado a infecções do trato urinário (ITU). O sorotipo VI é considerado um dos sorotipos mais raros, sendo mais relatado em países Asiáticos, no Japão e Malásia. O VII é bem menos representado em todo o mundo, mas curiosamente foi considerado comum no sul de Gana. O sorotipo VIII é fortemente associado ao Japão, sendo encontrado em alta frequência em mulheres grávidas. O sorotipo IX é o sorotipo mais recentemente descrito, em 2007, e um estudo feito no sul de Gana observou o sorotipo IX como o segundo mais frequente (Russel *et al.*, 2017; Furfaro, Chang & Payne, 2018. (Paveenkittiporn, Ungcharoen & Kerdsin, 2020).

### 1.3 Fatores de virulência

*S. agalactiae* possui diversos fatores de virulência que influenciam na sua eficiência de colonização e invasão no hospedeiro. Tais fatores de virulência relacionados a aderência e invasão na célula podem promover a resistência do patógeno e fuga do sistema imune do hospedeiro (Furfaro, Chang & Payne, 2018; Patras & Nizet, 2018).

A cápsula é um importante fator de virulência pois tem função antifagocítica o que favorece a evasão do sistema imune através da inibição da fagocitose e inativação do sistema complemento (Hauge, Jespersgaard & Kuluan, 1995; Furfaro, Chang & Payne, 2018). Além disso, foi descrito que a cápsula também induz a produção de citocinas pró-inflamatórias que

podem deixar a célula do hospedeiro mais suscetível como também pode levar ao aumento da infecção (Teixeira, Pinto & Merquior, 2015).

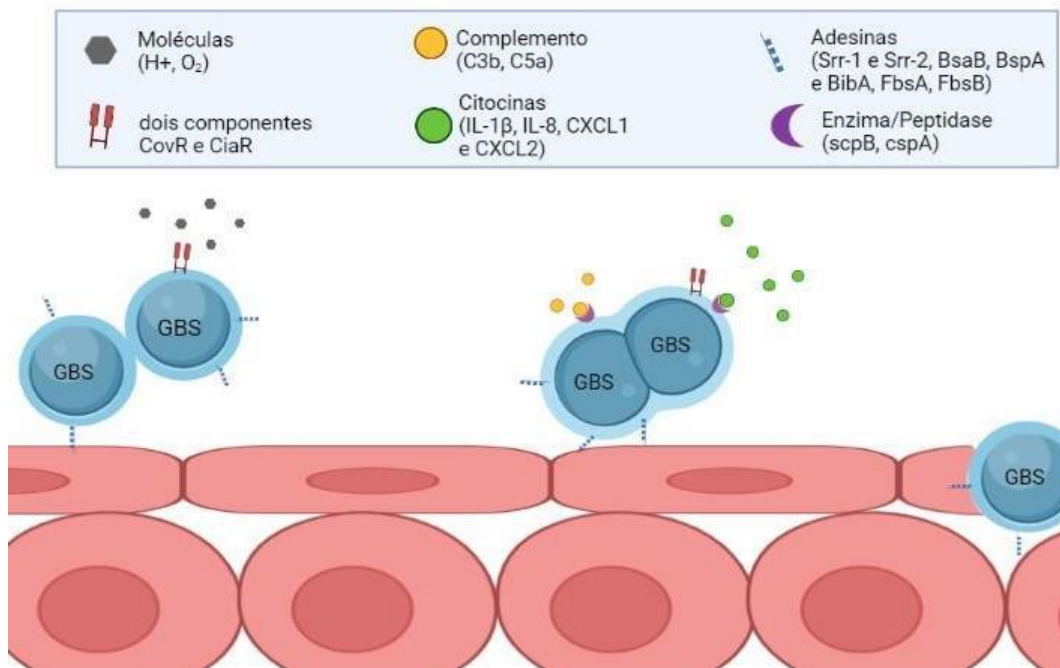
Outros fatores importantes são as proteínas formadoras de poros como a  $\beta$ -hemolisina e fator CAMP, que estão envolvidos na sobrevivência intracelular do microrganismo e na sua disseminação pelo organismo. A  $\beta$ -hemolisina, também denominada citolisina ( $\beta$ -h/c), é uma proteína extracelular estável, não imunogênica, formadora de poros em células e responsável pela ação beta-hemolítica de GBS. Esta proteína é codificada pelo gene cromossômico *cylE* que está presente no locus *cyl*. A sua atividade hemolítica pode ser correlacionada com a produção de pigmentos por amostras dessa espécie, o que sugere a associação genética entre essas duas características. O pigmento ornitina ramnolípido é produzido pelos genes do operon *cyl*. A transcrição de genes *cyl* e, portanto, produção do pigmento e da hemolisina são regulados negativamente pelo sistema de dois componentes CovR/S (também conhecido como CsrR/S). Consequentemente, a deleção de *covR/S* torna o GBS hiper hemolítico e hiperpigmentado (Vornhagen, Adams Waldorf & Rajagopal, 2017; Siemens *et al.*, 2019). A  $\beta$ -hemolisina contribui para a penetração através das barreiras epiteliais e pulmonares, e pode ser associada a infecção pulmonar (Rajagopal, 2009). Já foi observado que essas proteínas possuem atividade citotóxica em algumas células como células epiteliais e macrófagos, e também foi demonstrado que a produção de citocinas e óxido nítrico também está relacionado a essa toxina (Nizet *et al.*, 1996; Nizet, 2002).

O fator CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen) é uma proteína que intensifica a instabilidade da membrana, pré-induzida por um esfingomielinase C, levando à lise. A produção dessa proteína por amostras de GBS independe do padrão de hemólise. Diversos autores têm sugerido o possível papel do fator CAMP na patogênese de *S. agalactiae*, devido à sua capacidade em se ligar às imunoglobulinas G e M humanas e de animais, via fração Fc, além de sua capacidade de formar poros na membrana (Jurgens, Sterzik & Fehrenbach, 1987; Rajagopal, 2009). Além disso, a presença do fator CAMP é útil para fins de identificação das amostras de GBS, permitindo diferenciar presuntivamente GBS de outros *Streptococcus* beta-hemolíticos (Teixeira, Pinto & Merquior, 2015).

Outra enzima importante é a hialuronidase (HylB), codificada pelo gene *hyl*, que tem ação hidrolítica sobre o ácido hialurônico. Essa hidrólise leva à degradação do ácido hialurônico na matriz extracelular da célula do hospedeiro e facilita a disseminação no tecido infectado, devido ao aumento da permeabilidade tecidual (Hynes & Walton, 2000). Além disso, é importante em etapas como a migração e sinalização celular, regulação da inflamação e

prevenção de infecções ascendentes, a partir da degradação do ácido hialurônico em componentes dissacarídeos imunossupressores. A Hy1B bloqueia os receptores TLR2/TLR4, e isso faz com que diminua a quantidade de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 favorecendo, então, a disseminação do microrganismo (Vornhagen, Adams Waldorf e Rajagopal, 2017; Hynes *et al* 2000).

Para a colonização, GBS utiliza fatores de adesão que são importantes para a ligação a proteínas da matriz extracelular (**Figura 3**) como o fibrinogênio e fibronectina (FbsA, FbsB, CspA e ScpB), as proteínas de ligação à laminina (Lmb), proteínas ricas em serina (Srr-1 e Srr-2) adesinas de superfícies (BsaB ou FbsC), as proteínas *alpha-like* (Alp) e proteínas de pili (Landwehr-Kenzel & Henneke, 2014). As Lmb, FbsA, FbsB, CspA e ScpB são importantes para mediar a adesão de GBS à matriz celular, as Srr-1 e Srr-2 permitem a adesão à queratina humana em tecidos da pele, vagina e pulmão, e utilizam o mecanismo "*dock, lock, and latch*" que pode levar à uma série de alterações conformacionais na célula eucariótica, o que leva à uma maior aderência (Maisey, Doran & Nizet, 2008; Parker *et al.*, 2016; Vornhagen, Adams Waldorf & Rajagopal, 2017). A proteína ScpB ou C5a peptidase que possui um duplo papel de virulência, pois atua como adesina e também clivando e inativando o sistema complemento, enquanto a BsaB atua na adesão e auxilia na formação de biofilme (Emaneini *et al.*, 2015; Vornhagen, Adams Waldorf & Rajagopal, 2017; Patras & Nizet, 2018; Armistead *et al.*, 2019; Bobadilla *et al.*, 2021).



**Figura 3 - Fatores que contribuem para a colonização por *Streptococcus agalactiae*.** GBS utiliza o sistema de dois componentes para detectar as condições do ambiente e regular os fatores de virulência por meio de reguladores de resposta como CovR e CiaR. Além disso, utiliza mecanismos de escape do sistema imune do hospedeiro, como bloqueando a deposição do complemento C3b ou através da degradação de C5a por ScpB. GBS se liga às células epiteliais do hospedeiro e proteínas da matriz extracelular através de adesinas de superfície que são Srr1, Srr2, BsaB, BspA, BibA, FbsA e FbsB que auxiliam na sua entrada na célula do hospedeiro. Após essa interação com o epitélio ocorre a indução da resposta de citocinas do hospedeiro como as IL-1 $\beta$ , IL-8, CXCL1, CXCL2 e essas duas últimas podem ser degradadas pela serina protease CspA. Figura adaptada de Patras e Nizet (2018), produzida na versão gratuita no programa BioRender.

A família das proteínas *alpha-like* que inclui  $\alpha$ , Rib, R, Alp 1 a 4 e epsilon contém elementos repetitivos codificadas por genes em mosaico, estáveis, sugerindo que seja por causa da transferência lateral de genes ou outros eventos de recombinação (Maeland *et al.*, 2015). Essas proteínas são encontradas na maioria das amostras *S. agalactiae*, entre elas, destaca-se a proteína  $\alpha$ , que pode efetuar deleções internas como meio para evadir a resposta imune do hospedeiro. Além disso, uma caracterização adicional epidemiológica de amostras de GBS pode ser feita pela determinação das principais proteínas de superfície, as proteínas  $\alpha$ , epsilon, Alp 2-4 e Rib (Brimil *et al.*, 2006; Maeland *et al.*, 2015). Algumas amostras de GBS que pertencem ao grupo complexo clonal 17 expressam a proteína HvgA que promove uma adesão à célula do hospedeiro mais eficaz, facilitando então, a invasão do tecido hospedeiro (Armistead *et al.*, 2019). Ainda, o pilus é uma outra estrutura que pode estar envolvida na adesão ao epitélio do hospedeiro e à matriz extracelular, além da formação de biofilme, de facilitar na translocação

através da barreira hematoencefálica e da evasão do sistema imune (Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009; Landwehr-Kenzel & Henneke, 2014). Os pili são estruturas protéicas codificadas por ilhas genômicas denominadas PI (do inglês “pilus islets” e são reconhecidas três variantes de pili em GBS até o momento, a PI-1, a PI-1b, a PI-2a e a PI-2b, onde ao menos uma dessas variantes costuma ser encontrada em amostras de *S. agalactiae*, logo, os pili constituem potenciais candidatos para a vacinação (Alvim *et al.*, 2019; Paoletti & Kasper, 2019; Shipitsyna *et al.*, 2020). Tais PI codificam para as proteínas que compõem os pili: a proteína BP (do inglês “backbone protein”), que constitui o suporte principal do pilus, e duas proteínas auxiliares AP1 e AP2; além de duas proteínas sortases necessárias para a montagem do pilus. A distribuição das PI pode determinar a capacidade de GBS de colonizar ou causar infecções, além disso, a variabilidade dessas ilhas pode ajudar a compreender o perfil patogênico do microrganismo (Rosini *et al.*, 2006; Landwehr-Kenzel & Henneke, 2014).

Os biofilmes bacterianos também são muito importantes para a sobrevivência do patógeno no sistema imune do hospedeiro, pois conferem à comunidade maior capacidade de sobrevivência e proliferação (Boonyayatra *et al.*, 2016). A formação da comunidade bacteriana se inicia quando células planctônicas se aderem umas às outras, levando à formação de uma matriz de exopolissacarídeos. Nessa comunidade as bactérias ficam em seu estado sésil com atividade metabólica baixa, além disso, as bactérias vivem de forma cooperativa (Martinez-Gutierrez *et al.*, 2013; Boonyayatra *et al.*, 2016). Além dos biofilmes serem eficientes na proteção das células contra agentes antimicrobianos, também podem induzir à recorrência e levando a uma segunda infecção. Estudos demonstram que a formação do biofilme está relacionada ao pilus ou fímbrias que estão envolvidas na adesão bactéria-bactéria que resulta na formação da comunidade bacteriana. Além de ser capaz de produzir biofilmes em humanos e animais, também são capazes de produzir biofilmes em superfícies abióticas (Ghiorghi *et al.*, 2009; Alvim *et al.*, 2019; Shadbad *et al.*, 2020a).

#### 1.4 Susceptibilidade aos antimicrobianos

A descoberta dos antibióticos foi um grande marco na história da ciência, pois antes da descoberta, muitas pessoas faleciam precocemente em consequência das complicações das infecções bacterianas. Os antibióticos são fundamentais para a população pois trouxeram muitos benefícios, como o aumento da expectativa de vida e redução da mortalidade infantil. Entretanto, o seu uso inadequado leva a resistência das bactérias aos antimicrobianos, fato este que se tornou um problema de saúde pública global (O’Neill, 2014; Hayes, O’Halloran &



Cotter, 2020). Logo, a determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos é muito importante para se conhecer o perfil de resistência da espécie microbiana em estudo e, com isso, direcionar melhor o desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas mais adequadas.

Os antimicrobianos são utilizados tanto de forma terapêutica quanto de forma profilática nas infecções por GBS. A classe dos beta-lactâmicos é amplamente utilizada, sendo a penicilina o antimicrobiano de primeira escolha, porém caso o paciente tenha alergia é recomendado o uso de antibióticos da classe dos macrolídeos, lincosaminas, fluoroquinolonas ou glicolípídeos (Raabe & Shane, 2019; Hayes, O'Halloran & Cotter, 2020).

A penicilina foi descoberta por Alexander Fleming sendo exposta à comunidade científica em 1929. As penicilinas e seus respectivos análogos pertencem ao grupo de substâncias que são reconhecidas por apresentarem um núcleo central formado pelo anel beta-lactâmico ao qual se liga um pentaciclo saturado. Outro antibiótico recomendado desse grupo é a ampicilina que apresenta estabilidade em meio ácido e tem efeito em bactérias gram-positivas e gram-negativas, é apresentada na forma tri-hidratada e anidra. Esse antibiótico é uma alternativa terapêutica para infecções causadas por cocos gram-positivos; entretanto, se prefere o uso da penicilina G por ter maior potência antimicrobiana (Tavares, 2009). De forma geral, as amostras de GBS permanecem sensíveis aos beta-lactâmicos, e nenhuma resistência à penicilina foi relatada, exceto em alguns casos esporádicos onde algumas amostras apresentaram sensibilidade diminuída à penicilina (Longtin *et al.*, 2011; Nagano *et al.*, 2012; Raabe & Shane, 2019; Hayes, O'Halloran & Cotter, 2020). Tal diminuição na sensibilidade está associada a alterações nas proteínas ligadoras de penicilina PBP 1a e PBP 2a (Kimura *et al.*, 2008, Bolukaoto *et al.*, 2015; Botelho *et al.*, 2018a).

Existem antibióticos alternativos para casos de pacientes alérgicos à penicilina (Bolukaoto *et al.*, 2015), como os macrolídeos e as lincosaminas. Porém, vem sendo reportada resistência de GBS à eritromicina e à clindamicina em vários lugares do mundo, incluindo América do Norte, Europa e América do Sul (Wehbeh *et al.*, 2005; Bolukaoto *et al.*, 2015; Botelho *et al.*, 2018a). Alguns estudos também relatam a resistência de GBS a quinolonas (Wehbeh *et al.*, 2005; Hayes, O'Halloran e Cotter, 2020). Esse aparecimento de amostras invasivas resistentes fez com que GBS fosse incluído na lista de ameaças atuais de resistência antimicrobiana do CDC (CDC, 2019). No Brasil, os índices de resistência a macrolídeos e lincosaminas mantêm-se relativamente moderados em relação às outras regiões geográficas. Enquanto no Brasil são reportadas baixas taxas de resistência em torno de 2% para a clindamicina e 14% para a eritromicina (Corrêa *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2013; Botelho *et al.*,

2018a), em outros países essa resistência é aumentada, já tendo sido registrado nos Estados Unidos a resistência à clindamicina em mais de 40% das amostras de GBS e à eritromicina em mais de 50% (CDC, 2019).

A resistência de *S. agalactiae* a diferentes classes de antimicrobianos é alarmante e, diante disso, o uso de estratégias de prevenção como a vacinação seria o método mais eficaz. Desde 1985, vários grupos têm voltado a atenção para o desenvolvimento de uma vacina (Baker & Kasper, 1985; Baker *et al*, 1988; Paoletti *et al*, 1994; Baker *et al*, 2003; Schrag & Verani, 2013; Doare & Heath, 2013; Heath, 2016; Baker *et al*, 2017; Furfaro, Chang & Payne, 2018; Vaz *et al*, 2020). Além disso, o desenvolvimento de vacinas contra GBS para gestantes foi identificado como prioridade pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo a imunização na gestação um método promissor devido a capacidade dos anticorpos maternos de atravessar a placenta e conferir imunidade ao feto. Entretanto, as vacinas propostas estão em desenvolvimento, mas ainda não foram licenciadas (Vornhagen, Adams Waldorf e Rajagopal, 2017; Furfaro, Chang e Payne, 2018). As vacinas que estão em desenvolvimento atualmente são baseadas nos polissacarídeos capsulares e visam principalmente os sorotipos Ia, Ib, II, III e V (Lin *et al*, 2021).

Sabe-se que as vacinas anti cápsula podem trazer imunidade contra a infecção, mas vacinas polissacarídicas não são tão efetivas, por causa da sua baixa imunogenicidade sendo, por isso, necessário o uso de vacinas conjugadas a proteínas. Segundo os dados da literatura, as vacinas conjugadas atuais trivalente e hexavalente, respectivamente, cobrem 3 sorotipos (Ia, Ib, III) ou 6 sorotipos (Ia, Ib, II-V) sendo conjugadas a uma proteína mutante não tóxica da toxina diftérica (CRM197) (Madhi *et al.*, 2016). Outra vacina também em testes clínicos contempla cinco sorotipos (Ia, Ib, II, III e V) (Furfaro, Chang & Payne, 2018; Lin *et al*, 2018). Os estudos de vacinas atuais contemplam os sorotipos mais encontrados em infecções, porém esse perfil pode mudar geograficamente, além de existirem amostras não tipáveis, fazendo-se necessário outros alvos vacinais (Vornhagen, Adams Waldorf & Rajagopal, 2017; Furfaro, Chang & Payne, 2018; Absalon *et al*, 2021). Tendo isso em vista, algumas propostas vacinais utilizando proteínas de superfície são uma alternativa. Atualmente, estudos vacinais utilizando os N-terminais das proteínas *alpha-C* e Rib se encontram em fase 1 em testes clínicos, além da utilização de sequências conservadas das proteínas dos pili que se encontram em estudos pré-clínicos (Heath, 2016; Furfaro, Chang & Payne, 2018; Lin *et al*, 2018).

### 1.5 Importância clínica de *Streptococcus agalactiae* em infecções em animais

*S. agalactiae* foi reconhecido, inicialmente, por causar mastite contagiosa em ruminantes (Ruegg, 2017; Chen, 2019). Essa infecção tem uma grande influência sobre a produção leiteira, tendo consequências significativas sobre o rendimento, além de ser uma doença de alto impacto econômico, social e na saúde. A mastite é uma inflamação na glândula mamária que pode ter diversas origens, porém grande parte dos quadros de mastite bovina está associado a microrganismos, incluindo EGB (Contreras & Rodriguez, 2011; Chen, 2019). A inflamação na glândula mamária parte dos tecidos intramamários, mas também inclui estruturas anatômicas relacionadas como os mamilos, aréolas mamárias e ductos lácteos. A mastite é caracterizada por sinais de inflamação, incluindo, dor e aumento do tamanho, densidade da glândula e hiperemia, em animais como vacas, búfalas, cabras e ovelhas, também podendo ser detectada por observação devido a mudanças nas características organolépticas do leite (Contreras & Rodriguez, 2011).

A transmissão bilateral de GBS nos quadros de mastite pode ocorrer através do contato com o leite contaminado, utensílios contaminados como ordenhadores e máquinas operadoras. Esse patógeno penetra através do úbere, atinge a cisterna glandular por proximidade dos líquidos e pode se disseminar amplamente e causar dano tecidual por toda glândula, porém inicialmente infecta o sistema de canais da porção inferior do teto. O inchaço no teto infectado devido ao processo inflamatório pode levar à obstrução do canal, e com isso, o leite acumula nestas regiões reduzindo a produção do leite (Keefe, 1997; Tong *et al.*, 2019; Cheng & Han, 2020). Caso o tratamento seja dentro de um período determinado, havendo então estímulo do úbere e esvaziamento completo durante a ordenha, as obstruções são removidas, restaurando a área afetada. Entretanto, se a infecção persistir, a mastite bovina por GBS pode se tornar crônica.

*S. agalactiae* também é isolado causando estreptococose em outros animais como peixes, camelos, crocodilos e, tendo sido recentemente isolado também de abscessos, fístula e lesões de pele de elefantes africanos (Bishop *et al.*, 2007; Eisenberg *et al.*, 2017). Alguns desses elefantes sofriam de laminite, em alguns casos, em todos os pés. Essa lesão é caracterizada por um exsudato purulento, podendo sangrar, com isso, a locomoção desses animais foi reduzida, levando alguns à extrema debilitação (Eisenberg *et al.*, 2017). Apesar de infecções por *S. agalactiae* serem muito incomuns em répteis, GBS já foi isolado de lesões cutâneas causadas em crocodilos e essa espécie bacteriana também foi isolada de fasciíte necrosante em golfinho (Bishop *et al.*, 2007).

Alguns estudos sugerem que GBS migrou de animais para humanos em um determinado momento da evolução, e é discutível se esse potencial zoonótico se mantém hoje (Botelho *et al.*, 2018b).

#### 1.6 Importância clínica de *S. agalactiae* em infecções humanas

*S. agalactiae* são parasitas obrigatórios de membranas mucosas, sendo o trato gastrointestinal o seu principal reservatório, onde é encontrado em 10-30% dos adultos saudáveis (McCracken, 1973; Brimil *et al.*, 2006). Também são encontrados no trato geniturinário (TGU) de seres humanos e de muitos animais. São bactérias comensais, mas podem causar doenças quando introduzidas em sítios estéreis em hospedeiros sadios ou pacientes imunocomprometidos; além disso, podem ser disseminados por transmissão horizontal. A ocorrência dos quadros infecciosos está comumente relacionada com os fatores de virulência presentes nessa espécie bacteriana (Hardie & Whiley, 1997).

Em 1935, *S. agalactiae* foi identificado como um potencial patógeno humano (Lancefield & Hare, 1935). Posteriormente, surgiu como uma das principais causas de morbidade e mortalidade perinatal. Em mulheres, GBS coloniza entre 5% a 35% de gestantes; onde até 60% das mulheres colonizadas podem ser portadoras deste patógeno de modo intermitente (Schrag & Verani, 2013). GBS emergiu durante a década de 1970 como um dos principais patógenos a causar infecções neonatais (McCracken, 1973), sendo hoje uma das principais causas de doenças invasivas no período neonatal. Esse microrganismo é capaz de ascender até o útero e penetrar na cavidade amniótica através da placenta íntegra levando à manifestações clínicas ainda durante a gestação, causando a chamada síndrome de início pré-natal; pode também ser transmitido verticalmente para o neonato durante a passagem pelo canal vaginal no momento do parto ou no momento da ruptura das membranas amnióticas, causando a síndrome de início precoce (cuja manifestação ocorre do nascimento até 1 semana de vida); ou ser transmitido após o nascimento no ambiente hospitalar ou na comunidade através do contato com a própria mãe ou indivíduos colonizados, resultando na síndrome de início tardio (manifestação entre 1 semana e 3 meses de vida) (Doare & Heath, 2013; Raabe & Shane, 2019). O quadro pré-natal da doença pode levar ao aborto espontâneo, natimorto, ruptura precoce das membranas e prematuridade. O quadro precoce da doença se apresenta com distúrbios respiratórios, choque, septicemia, apnéia, meningite e pneumonia de aspiração, sendo que frequentemente as manifestações clínicas ocorrem horas após o nascimento e podem levar de 7 a 10 dias de vida. Alguns fatores maternos aumentam o risco de infecção precoce para o recém-

nascido como trabalho de parto prematuro, ruptura prolongada de membranas amnióticas, bacteremia pós-parto, amnionite materna e a colonização vaginal intensa por GBS (Ancona *et al.*, 1980). No quadro tardio a infecção, geralmente, se manifesta por otite média, septicemia, celulite, conjuntivite, irritabilidade, febre e meningite. Em adição, GBS pode causar infecções invasivas e não invasivas em mulheres gestantes e no puerpério, tais como infecções urinárias, sepse, tromboflebite séptica, meningite, endometrite e amnionite (Gibbs; Schrag; Schuchat, 2004; Corrêa *et al.*, 2011; Função; Narchi, 2013; Seale *et al.*, 2017).

Este patógeno também é um importante agente causador de morbidade e mortalidade em idosos e adultos imunocomprometidos, causando infecções como pneumonia, osteomielite e infecções do trato urinário (Rosini & Margarit, 2015). Estudos mostram que infecções invasivas causadas por GBS em pacientes não gestantes são um problema crescente principalmente em adultos com doenças de base (Chaiwarith *et al.*, 2011). Além disso, estudos realizados na Grécia demonstraram que o local mais comum para infecções por GBS era o trato urinário (Falagas *et al.*, 2006). Alguns resultados de um estudo realizado na Grécia mostraram evidências clínicas de ITU por GBS tendo sido realizada a sua identificação em amostras de urina pós massagem prostática em pacientes com prostatite crônica (Skerk *et al.*, 2002; Falagas *et al.*, 2006). Outros estudos também demonstraram a relação entre GBS e a alta contagem de leucócitos no sêmen, condição relacionada à infertilidade (Fujita *et al.*, 2011; Parida & Samanta, 2017).

### 1.7 Infecções bacterianas no trato urinário (ITU) do homem e vias de contaminação

ITU é definida por invasão microbiana de qualquer tecido do trato urinário desde a uretra, bexiga até o rim, sendo esta uma das infecções mais comuns na população em geral, incluindo a infecção do epidídimo e da próstata nos homens (Roriz-Filho *et al.*, 2010).

A epididimite é uma infecção causada por microrganismos resultando na inflamação do epidídimo, um canalículo localizado atrás do testículo e que armazena e transporta o esperma. A epididimite pode, ocasionalmente, causar inflamação dos testículos, e a dor escrotal e edema são sintomas corriqueiros da infecção (Ludwing, 2008).

A presença de GBS no trato reprodutivo masculino pode estar associada com a prostatite (Yang, Bian & Sun, 2019). A prostatite é caracterizada pela inflamação na próstata, uma pequena glândula localizada próxima à bexiga (distal) que envolve parte da uretra e é responsável por produzir o líquido seminal, podendo essa inflamação ser ou não causada por microrganismos. Alguns dos sintomas são dor na região genital, dificuldade de urinar, dor no

abdômen, dor e desconforto na área ao redor entre o ânus e o escroto, também podendo haver uma sensação de queimação no momento da micção e desconforto durante ou após a ejaculação. A próstata tem mecanismos naturais de defesa contra infecções como o fluxo urinário e ejaculação, no entanto o refluxo urinário ou alterações nas secreções dos dutos periféricos podem levar a inflamação da próstata. Alguns estudos sugerem que a inflamação pode eventualmente levar ao câncer de próstata, o que é possível, pois as células inflamatórias podem danificar o DNA em células da próstata (Weidner, Krause & Ludwig, 1999; Ludwig, 2008).

A infecção pode ocorrer a partir da migração de microrganismos da uretra, e a entrada de resíduos de urina infectada em pacientes com infecção urinária para os dutos intra prostáticos, refluxo de urina para os dutos da zona periférica é considerado o mecanismo mais importante para o desenvolvimento da prostatite bacteriana crônica. A próstata também pode ser contaminada através de procedimentos como a biópsia prostática transretal (Seo e Lee, 2018).

As infecções no TGU masculino, dependendo do local de infecção, podem contribuir para causar a infertilidade, tendo alguns estudos já demonstrado a relação de GBS e alta contagem de leucócitos no sêmen, condição relacionada à infertilidade (Fujita *et al.*, 2011; Parida & Samanta, 2017). A prostatite e a epididimite podem causar alterações da ejaculação, que por sua vez modificam a qualidade do esperma. A próstata tem função de produzir o líquido prostático que é rico em nutrientes que constitui o líquido seminal, também produz o PSA que deixa o sêmen mais líquido para facilitar o movimento dos espermatozóides, é pressuposto que a presença da infecção leva a uma diminuição na produção e qualidade do líquido gerado na próstata. E o inchaço causado na infecção reduz o espaço disponível para a passagem do sêmen pelos dutos (Weidner, Krause & Ludwig, 1999; Rusz *et al.*, 2012).

Alguns estudos relatam que a transmissão via sexual é possível, uma vez que foi demonstrado que a presença de GBS na microbiota vaginal foi aumentada devido a atividade sexual (Cools *et al.*, 2016). Além disso, esse patógeno apresenta maiores complicações no período perinatal quando o companheiro também é colonizado, e a circunstância dos parceiros estarem colonizados pelas mesmas amostras é sugestivo que a bactéria possa ser transmitida por via sexual (Škerk *et al.*, 2002; Furfaro, Chang & Payne, 2018; Yang, Bian & Sun, 2019).

### 1.8 Classificação dos quadros de prostatite e etiologia

O “National Institute of Health” (NIH) propõe uma classificação da prostatite em diferentes categorias: (I) prostatite bacteriana aguda [PBA], (II) prostatite bacteriana crônica

[PBC], (IIIa) prostatite crônica inflamatória, (IIIb) prostatite crônica não inflamatória e (IV) prostatite inflamatória assintomática (Ramakrishnan, Salinas, 2010).

A prostatite é caracterizada por dor geniturinária e sintomas de micção e pode estar associada à disfunção sexual, em que até 25% dos homens recebem um diagnóstico de prostatite durante sua vida (Lipsky, Byren & Hoey, 2010; Tsunemori & Sugimoto, 2021). As causas e tratamento para a prostatite não bacteriana são desconhecidos, mas as prostatites bacterianas são causadas por uropatógenos, geralmente gram-negativos, porém alguns estudos já relataram o envolvimento de bactérias gram-positivas (Lipsky, Byren & Hoey, 2010; Mazzoli, 2010; Tsunemori & Sugimoto, 2021). A prostatite bacteriana aguda (PBA) é facilmente diagnosticada pelos seus sintomas que frequentemente são sistêmicos e pela presença de bactérias na urina (Lipsky, Byren & Hoey, 2010; Tsunemori & Sugimoto, 2021). A prostatite bacteriana crônica (PBC) se caracteriza pelos sintomas crônicos e bacteriúrias recorrentes, e o diagnóstico consiste em amostras urinárias obtidas antes com amostra obtidas após massagem prostática (Lipsky, Byren & Hoey, 2010; Tsunemori & Sugimoto, 2021). A prostatite não bacteriana costuma ser difícil de caracterizar devidos à outras queixas prostáticas, na categoria IIIa glóbulos brancos estão presentes no sêmen de secreções prostáticas expressas ou urina obtida após massagem prostática, na categoria IIIb não há glóbulos brancos (Dairiki Shortliffe, Sellers & Schachter, 1992, Ramakrishnan & Salinas, 2010; Tsunemori & Sugimoto, 2021). A prostatite inflamatória assintomática, não tem sintomas e é descoberta de forma acidental durante a avaliação para outras doenças (Ramakrishnan & Salinas, 2010; Tsunemori & Sugimoto, 2021).

Os agentes etiológicos que causam prostatites geralmente são os mesmos responsáveis pela maioria das ITUs, geralmente bacilos gram-negativos entéricos são os patógenos predominantes como a *Escherichia coli* (50 a 80%), que é a mais comumente encontrada, e *Klebsiella* e *Proteus* que causam 10 a 30% do casos (Lipsky *et al.*, 2010) Estudos também demonstram a presença de microrganismos gram-positivos em casos de prostatite, onde são encontrados *Enterococcus*, e outros como *Staphylococcus* e *Streptococcus* estão em debate ainda. Ainda, *Neisseria gonorrhoeae* deve ser considerada como uma possível causa em homens jovens sexualmente ativos (Ramakrishnan & Salinas, 2010).

Entretanto, um estudo realizado na Itália, mostrou que das 150 amostras clínicas, 50 eram *E. faecalis*; 50 *Staphylococcus* spp.; 30 *E. coli* e 20 formaram uma miscelânea com outras bactérias gram-negativas (Mazzoli, 2010). Esse estudo levantou uma questão de uma possível mudança de PBC que estaria passando de uma infecção causada primordialmente por bactérias gram-negativas para bactérias gram-positivas. Um outro estudo realizado na Coreia em um

hospital geral, com amostras de 105 pacientes que foram examinados na Clínica de Cuidados Primários através do fluido de massagem prostática, os resultados mostraram uma predominância de bactérias gram-positivas sendo de destaque *E. faecalis* (19%), *S. agalactiae* (17%) e *S. epidermidis* (16%) (Choi *et al.*, 2013). Em um trabalho realizado na Croácia por Skerk e colaboradores (2002), foram analisados 194 pacientes sendo 87% identificados com PBC, em que os principais microrganismos encontrados foram *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Enterococcus* e *E. coli*, além de outros agentes que também foram isolados como *Ureaplasma urealyticum*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. agalactiae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, um recente estudo realizado na China mostrou que a presença de GBS é significativamente aumentada em pacientes com prostatite crônica em idade fértil, demonstrando a importância do patógeno nos casos de prostatite (Yang, Bian & Sun, 2019).

Vários estudos têm demonstrado a presença de *S. agalactiae* em material clínico principalmente de PBC (Skerk *et al.*, 2002; Bundrick *et al.*, 2003; Skerk *et al.*, 2006; Skerk *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2013; Stamatiou & Pierris, 2017; Voroshilina, Zornikov & Panacheva, 2019) entretanto, são escassos os dados na literatura sobre o real papel de GBS em quadros de prostatite, e que seja de nosso conhecimento não há dados sobre a caracterização de amostras de GBS, como o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, a distribuição de sorotipos e presença de fatores de virulência, em infecções do TGU masculino no Brasil.

### 1.9 Epidemiologia e faixa etária de aparecimento de sintomas em prostatite

Ao contrário do que a população leiga supõe, ou seja, de que prostatite é uma doença de homens idosos, este quadro é o diagnóstico urológico mais comum em homens entre 20 e 40 anos e pode ter relação direta com a vida sexual ativa (Yang, Bian & Sun, 2019). Sendo o diagnóstico mais comum em homens em idade fértil, ou seja, abaixo dos 50 anos, e o terceiro mais comum ocorre em homens acima dos 50 anos. Até 25% dos homens recebem o diagnóstico de prostatite de sua vida, mas menos de 10% tem prostatite bacteriana crônica comprovada (Rizzo *et al.*, 2005; Bartoletti *et al.*, 2007; Lipsky *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2013). A prostatite pode gerar muito desconforto, estresse físico além do alto custo financeiro, podendo acometer homens de qualquer idade.

Em um estudo realizado na Finlândia por Mehik e colaboradores, demonstrou que dos 261 homens incluídos no estudo que tiveram sintomas, aproximadamente 27% sofriam com sintomas da prostatite uma vez no ano, enquanto 16% sofriam de sintomas persistentes e 63%



dos homens tiveram os piores sintomas durante o inverno. Em um outro estudo realizado no Canadá com 6037 homens, 2,7% entre eles foram diagnosticados com prostatite com idade média de 50 anos, 86,6% foram diagnosticados com prostatite crônica e 0,9% dos homens tiveram epididimite (Nickel *et al*, 2005).

#### 1.10 Papel da espermocultura no diagnóstico da prostatite e tratamento

A prostatite é uma síndrome urológica de difícil diagnóstico e de difícil tratamento, em que a significância da cultura do sêmen é muito discutida (Lee & Choi, 2012). Em um estudo feito por Weidner e colaboradores, foi visto que na cultura do sêmen se identifica bacteriospermia em, aproximadamente, 50% das amostras de sêmen de homens com prostatite bacteriana crônica, indicando que, portanto, a cultura do sêmen do ejaculado, por si só, não é suficiente para diagnosticar PBC (Weidner, Krause, & Ludwig, 1999). Em um outro estudo, foi observado que o isolamento de bactérias gram-positivas tanto na urina como no sêmen com a ausência de associação com elevação de leucócitos poderia sugerir que a bacteriospermia representa apenas uma contaminação (Cottell *et al*, 2000).

Entretanto, a cultura do material clínico de esperma proveniente de massagem prostática ou de urina após essa massagem é sugerido (Choi *et al*, 2013). Uma pesquisa realizada com 70 homens com suspeita de PBC onde foi realizado o teste de Meares e Stamey (1968) considerado padrão ouro para investigação de prostatite. É um método que avalia comparativamente urina e secreção prostática obtidas na seguinte ordem: frasco 1: urina primeiro jato, frasco 2: urina jato médio, frasco 3: secreção prostática e frasco 4: urina pós massagem. Para o diagnóstico de prostatite bacteriana crônica consiste no resultado da cultura do líquido prostático (frasco 3) e ou urina pós massagem prostática (frasco 4). A análise clínica das amostras de esperma nesse estudo, mostrou sensibilidade de 45% e especificidade de 94%. Para amostras de urina a sensibilidade e especificidade foram de 4% e 100%, respectivamente (Montes *et al*, 2008). Portanto, o resultado negativo da urina não exclui a prostatite e só a cultura de urina isoladamente não tem utilidade para definir um diagnóstico de PBC. Entretanto, é proposto que a cultura positiva de amostras clínicas de sêmen seja o suficiente para indicar o diagnóstico e iniciar o tratamento.

Para o tratamento ser eficaz contra PBC, os patógenos que estão no local da infecção devem ser expostos a uma concentração da droga relativamente alta para inibir o crescimento bacteriano ou erradicar os patógenos do local (Wagenlehner *et al*, 2008; Xiong *et al*, 2020). O tratamento se inicia com a utilização de drogas de amplo espectro que possuem propriedades

farmacocinéticas favoráveis para que consigam penetrar no tecido prostático e nos fluidos prostáticos, atentando-se para o fato que somente moléculas não ligadas a proteínas entram nos tecidos (Nickel & Moon, 2005; Xiong *et al*, 2020). É sabido que a maioria dos antibióticos são ácidos ou bases fracas que se ionizam nos fluidos biológicos e, como consequência, inibem a difusão passiva pelo epitélio prostático (Nickel & Moon, 2005; Xiong *et al*, 2020). Segundo Charalabopoulos e colaboradores, a passagem pelo tecido prostático pode ser facilitada quando há um alto gradiente de concentração, alta constante de dissociação, baixo grau de ionização, baixa ligação a proteínas e pequeno peso molecular, sendo as drogas como cicloproxacina e levofloxacina boas opções, pois atingem na próstata concentrações de 10 a 50%, e ainda, os macrolídeos que também penetram muito bem nos fluidos prostáticos e seminais (Charalabopoulos *et al*, 2003; Naber & Sorgel, 2003; Wagenlehner, *et a.*, 2008; Xiong *et al*, 2020). Além disso, o fluido prostático normalmente tem pH neutro 7,3, mas em pacientes com PBC esse fluido torna-se bastante alcalino chegando a pH 8,3 e, com isso, drogas alcalinas como trimetopim e clindamicina penetram bem levando à um alto nível prostático. Entretanto, as drogas acídicas como os beta-lactâmicos penetram menos, porém com uma maior concentração da droga no estado não ionizado (Lipsky *et al.*, 2010; Xiong *et al*, 2020). Ademais, evidências sugerem que as bactérias no tecido prostático sobrevivem em um meio protegido por biofilme, onde agentes antimicrobianos como fluoroquinolonas e macrolídeos são mais ativos no biofilme do que outros antimicrobianos como os beta-lactâmicos e aminoglicosídeos (Wagenlehner, *et al*, 2008).

As fluoroquinolonas são consideradas as drogas de escolha para o tratamento de PBC e são sugeridas pelo *Food and Drug Administration* (FDA), sendo esses antimicrobianos em seu uso clínico não considerados nem ácidos e nem bases, mas possuindo características anfotéricas e de drogas iônicas (Wagenlehner, *et al*, 2008). A maioria das quinolonas com característica anfotérica possui dois grupos ionizáveis, um positivo e outro negativo carregado, portanto dois valores de PKa e o ponto isoelétrico que fica entres os dois PKaS é diferente para cada droga anfotérica. A alta concentração do fármaco ocorre no lado com maior grau de ionização, drogas com ponto isoelétrico próximo o pH do plasma deve se concentrar em fluidos com pH acima e abaixo do pH plasmático (Wagenlehner, *et al*, 2008). Entretanto, a crescente resistência às fluoroquinolonas que vem sendo observada, tem preocupado pesquisadores e clínicos (Shigehara *et al*, 2008; Xiong *et al*, 2020). Por isso é de grande importância a seleção de um agente antimicrobiano adequado que tenha boas propriedades farmacocinéticas.

## 2. JUSTIFICATIVA

*Streptococcus agalactiae* (“Group B *Streptococcus*”, GBS) é uma bactéria que foi inicialmente relacionada a quadros de mastite bovina, sendo hoje reconhecida, também, como um importante patógeno causador de infecções em humanos. E tal importância como patógeno humano, especialmente no período neonatal, já é bastante conhecida e estudada.

Porém, recentemente, alguns estudos demonstraram a presença de GBS associada também à quadros de prostatite e epididimite, doenças que podem causar muita dor e infertilidade, prejudicando a qualidade de vida do indivíduo acometido. Entretanto, tais estudos acerca da presença e papel do GBS nesses quadros são demasiado escassos e normalmente reportam apenas informações do patógeno no local, sem maiores detalhes quanto à caracterização das amostras bacterianas.

Tendo isso em vista, este projeto analisou amostras de *S. agalactiae* isoladas de espermocultura de pacientes com suspeita de PBC, através da caracterização fenotípica e genotípica dessas amostras que, possivelmente, possam estar associadas com a prostatite. Essas informações contribuirão para um melhor entendimento do papel de GBS em quadros de prostatite, além de trazer subsídios para o estudo de possíveis alternativas terapêuticas e de prevenção para esses pacientes.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Levando-se em consideração a importância de *S. agalactiae* como patógeno, este projeto visou caracterizar através de testes fenotípicos e genotípicos amostras clínicas de espermocultura de pacientes com suspeita de PBC.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Confirmar a identificação das amostras bacterianas incluídas neste estudo através de métodos convencionais e pela técnica de MALDI-TOF;
2. Caracterizar fenotipicamente as amostras bacterianas através da determinação do tipo sorológico e do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos;
3. Detectar através da metodologia de PCR a presença de genes envolvidos na produção dos pili;
4. Caracterizar as amostras quanto à capacidade de produção de biofilme.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cepas bacterianas

Foram incluídas no presente estudo 49 cepas de GBS isoladas de material clínico de sêmen, de pacientes com suspeita de prostatite, moradores do Rio de Janeiro, entre os anos de 2019 e 2022. Essas amostras pertencem à Coleção de Conveniência do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMPG/UFRJ), encontrando-se estocadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) acrescidas de 20% de glicerol e congeladas -20°C (freezer convencional).

As suspensões bacterianas estocadas foram reativadas através da retirada de uma alíquota de 50 µL que foi inoculada em 2 mL de caldo THB (*Todd Hewitt Broth*). As amostras foram incubadas por 24h a 35°C, em seguida, semeadas em meio cromogênico CHROMagar™ StrepB e paralelamente também foram semeadas em ágar sangue (base de ágar triptona de soja acrescida de 5% de sangue desfibrinado de carneiro) e incubadas por 24h a 35°C. Após essa etapa, as colônias foram analisadas através de inspeção visual e submetidas aos testes descritos abaixo.

### 4.2 Identificação fenotípica das amostras bacterianas

As amostras de *S. agalactiae* foram submetidas a testes fisiológicos para a confirmação da identificação da espécie. Foram realizadas as devidas observações morfo-tintoriais após coloração de Gram, observação do tipo de hemólise em ágar sangue de carneiro, produção de fator CAMP e hidrólise do hipurato de sódio.

O teste de CAMP foi realizado através da semeadura na forma de estria única, em placas contendo ágar sangue, de uma amostra de referência de *S. aureus* ATCC 25923 produtora de β-lisina. Em seguida, as amostras de *S. agalactiae* foram inoculadas em estrias perpendiculares à primeira sem tocar uma estria na outra. Após, as placas foram incubadas a 35°C por 24h. Quando ocorreu a produção do fator CAMP este atuou em sinergia com a β-lisina de *S. aureus* levando à uma hemólise acentuada, na forma de uma ponta de seta entre as estrias.

O teste da hidrólise do hipurato de sódio foi realizado segundo Hwang e Ederer (1975). Em tubos estéreis foi adicionado um volume de 400 µL de solução do hipurato de sódio a 1%. Em seguida, utilizando alça de 10 µL, foi inoculada uma alçada da amostra respectiva no tubo.

Após a incubação na estufa por 2h a 37°C foram adicionados 200 µL de solução de ninidrina (3,5g de ninidrina em 100mL de uma mistura 1:1 de acetona e butanol) e, em seguida, os tubos foram incubados novamente por 10 min. Nos casos positivos a amostra testada produz a enzima hipuricase que quebra o hipurato de sódio gerando, como um dos produtos finais, a glicina que na presença da ninidrina é desaminada formando um precipitado roxo. Para o teste foi utilizada como controle positivo a amostra *S. agalactiae* SS-615 e como controle negativo foi utilizada a amostra de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

#### 4.3 Identificação por MALDI-TOF MS

A confirmação da identificação das amostras foi realizada utilizando-se a metodologia de MALDI-TOF MS (do inglês “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time Of Flight Mass Spectrometry”). As colônias das amostras foram aplicadas em uma placa de aço inoxidável polido com auxílio de um palito de madeira. Em seguida, foi acrescentado 1 µL de ácido fórmico, após secar, foi acrescentado 1µL de solução matriz HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico). Quando inseridas no equipamento, as amostras que estão na placa são submetidas ao laser, ionizando as proteínas, geralmente as ribossomais (entre 2 e 20 KDa), que percorrem um tubo vertical dentro do equipamento, e o tempo que as partículas levam para percorrer o tubo é mensurado que é denominado de tempo de voo. Através das análises dessas informações são gerados espectros que são gerados com auxílio do espectrômetro de massa Microflex LT (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando o software FlexControl (Bruker Daltonics, Alemanha) no intervalo de 2.000 a 20.000 *m/z.*, em seguida, com auxílio de um software, comparadas com um banco de dados. O resultado apresenta-se através de escores de confiabilidade, onde, escores  $\leq 1,69$  são considerados não confiáveis, escores entre 1,70 a 1,99 indicam identificação provável de gênero, escores entre 2,00 e 2,29 indicam identificação segura de gênero e provável de espécie e por fim, escores acima de 2,30 até 3,00 indicam alta probabilidade na identificação da espécie (Bizzini & Greub, 2010; Pasternak, 2012).

#### 4.4 Determinação do tipo capsular

A determinação do tipo capsular foi realizada utilizando-se o método de aglutinação em látex, com auxílio do kit Immulex Strep-B (SSI Diagnóstica, Dinamarca), de acordo com as instruções do fabricante. Todos os 10 sorotipos foram testados (Ia, Ib-IX). No cartão de reação do Immulex Strep-B (SSI Diagnostica) foi aplicada uma gota do reativo composto do anticorpo

tipo específico adsorvido a partículas de látex, com o auxílio de uma alça estéril de 1µL, foi retirado o crescimento bacteriano da placa do meio de cultura preenchendo toda a alça e foi misturado esse material com o reativo no cartão de reação, com movimentos circulares. Uma reação foi considerada positiva quando ocorreu a formação de grumos dentro de 30s. Amostras de referência dos diferentes tipos capsulares foram utilizadas para fins de controle do teste.

Para amostras não tipáveis pela técnica de aglutinação em látex, a tipagem sorológica foi realizada através da técnica de PCR segundo Imperi e colaboradores (2010).

Para um volume final de 25 µL, foram utilizados 1x do tampão, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatadi, 400 nM para iniciadores 1 e 16 cada, demais iniciadores na concentração de 250 nM cada, 0,3 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA) e 5µl do DNA bacteriano.

As condições de ciclagem seguiram: desnaturação inicial por 95°C por 5 minutos, seguidos de 15 ciclos de desnaturação a 95°C por 60 segundos, anelamento a 54°C por 60s e extensão a 72°C por 2 minutos. Após, mais 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 60 segundos, anelamento a 56°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. Por último, uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para a visualização da amplificação dos genes de interesse foi realizada a eletroforese dos produtos obtidos na PCR, em gel de agarose a 1,5% em cuba de eletroforese com tampão TBE 0,5X, a 90V durante 1h30min. Foi utilizado o marcador molecular de 100pb (Invitrogen, EUA) para estimar o tamanho do amplicon, 1,5 µL do corante safe dye (Uniscience, EUA) em 5µL de cada produto. Para a revelação, os géis foram expostos a radiação UV utilizando um transiluminador com luz UV.

#### 4.5 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e a pesquisa dos fenótipos de resistência aos macrolídeos e lincosamidas foram determinados de acordo com instruções contidas no manual do “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2022), utilizando-se a técnica de disco-difusão. Primeiramente, com auxílio de uma alça, uma suspensão bacteriana foi preparada a partir de um cultivo recente em salina fisiológica estéril. Essa suspensão correspondente a uma turbidez da escala 0,5 de McFarland contém aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Essa suspensão foi semeada com auxílio de um swab

estéril em placa contendo ágar Muller Hinton acrescida de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (MHS). Em seguida, foram colocados os discos de antibióticos na superfície do ágar com auxílio de pinça estéril. As placas foram incubadas por até 24h em 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> (CLSI, 2022). Os antimicrobianos testados foram a clindamicina (2µg), eritromicina (15µg), levofloxacina (5µg), penicilina (10µg), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg). A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os critérios descritos no CLSI (2022). A amostra *S. pneumoniae* ATCC 49619 foi utilizada para fins de controle de qualidade do teste.

Para as amostras que apresentaram resistência à levofloxacina foi realizado o Teste episilométrico para determinar a concentração mínima inibitória (CMI), segundo as recomendações do CLSI (CLSI, 2022). A suspensão da amostra correspondente à turbidez 0,5 de McFarland foi semeada em MHS com o auxílio de um swab. Com auxílio de uma pinça estéril, as fitas de E-test (Liofilchem Diagnostici, Itália) contendo concentrações crescentes (0.002 a 32 µg/mL) de levofloxacina foram aplicadas nas placas de MHS. Em seguida, as placas foram incubadas por 24h a 37°C em atmosfera normal. Para saber a CMI da amostra, foi observada a formação de um halo em formato elíptico, onde deve ser considerada como a CMI do antimicrobiano a menor concentração em que não se observa o crescimento bacteriano junto a fita.

O fenótipo MLS<sub>B</sub> (resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B) foi avaliado pelo método de disco aproximação (teste D), segundo Seppälä e colaboradores (1993). Para isso, após o ajuste da suspensão bacteriana de acordo com a escala 0,5 de McFarland e sua semeadura em MHS, os discos de eritromicina e clindamicina foram colocados a uma distância de 12mm do centro de um disco ao outro. Após a incubação por 24h à 37°C, os halos de inibição foram interpretados de acordo com os critérios do CLSI (2022). O fenótipo MLS<sub>B</sub> induzido ocorre quando há a resistência à eritromicina e halo de sensibilidade à clindamicina com achatamento do halo em forma da letra “D”, indicando que a presença da eritromicina induziu a resistência à clindamicina. O MLS<sub>B</sub> constitutivo é definido quando ocorre a resistência à eritromicina e clindamicina. O fenótipo M, por sua vez, é definido quando ocorre a resistência somente ao macrolídeo e sensibilidade à clindamicina e o fenótipo L é quando ocorre resistência somente à lincosamida.

#### 4.6 Obtenção de DNA bacteriano



A obtenção do DNA bacteriano foi realizada de acordo com protocolo descrito por Pinto e colaboradores (2013) utilizando a resina Chelex. Foi preparada uma solução contendo Chelex a 5% (Bio-Rad Laboratories, USA) e proteinase K (Invitrogen, USA) 20 mg/mL. O crescimento bacteriano de cada amostra foi ressuscitado em 200  $\mu$ L da solução anteriormente preparada. Essa suspensão foi incubada a temperatura de 50°C durante 1 hora, após, foi feita homogeneização no vortex por 10 segundos e em seguida foram submetidos à fervura a 95°C por 10 minutos, posteriormente, após a homogeneização o material é centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi usado para as reações de PCR.

#### 4.7 Detecção de genes envolvidos na produção dos pili

Os genes envolvidos na produção dos pili PI-1, PI-2a e PI-2b foram detectados através da metodologia de PCR uniplex. A técnica foi realizada utilizando iniciadores e recomendações previamente descritas na literatura (Otaguiri *et al.*, 2013). Na **Tabela 1** é possível observar a sequência dos iniciadores, assim como o tamanho dos produtos de amplificação. A solução de amplificação chegou a um volume final de 25  $\mu$ L, contendo 22,5  $\mu$ L de SuperMix Platinum, 200 nM de cada iniciador e 1,5  $\mu$ L do DNA.

As seguintes condições foram usadas para a reação de amplificação: desnaturação inicial por 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final em 72°C por 5 minutos.

Para a visualização da amplificação dos genes de interesse foi realizada a eletroforese dos produtos obtidos na PCR. Utilizado 5 $\mu$ L de cada produto de PCR, gel de agarose a 1%, o marcador molecular de 100pb (Invitrogen, EUA) para estimar o tamanho do amplicon, 1,5  $\mu$ L do corante safe dye (Uniscience, EUA) em 5 $\mu$ L de cada produto. Para a revelação, os géis foram expostos a radiação UV utilizando um transiluminador com luz UV.

**Tabela 1.** Tamanho esperado dos produtos da amplificação, iniciadores utilizados e suas respectivas referências para detecção dos genes envolvidos na produção dos pili em *S. agalactiae* em amostras de material clínico de espermocultura.

Tipo de pili	Tamanho dos produtos	Sequência dos iniciadores (5' → 3')
PI-1	147 pb	F: AACCACTAGCAGGCGTTGTCTTTG R: TGAGCCCGGAAATTCTGATATGCC
PI-2 <sup>a</sup>	117 pb	F: GCCGTTAGATGTTGTCTTCGTA R: TTTACTGCGGTCCCAAGAGCTTC
PI-2b	152 pb	F: AAGTCTTGACCAAGGATACGACGC R: ATCGTGTACTTGCCCTGCGTA

F: *forward*; R: *reverse*; pb: pares de base

#### 4.8 Avaliação da formação de biofilme em poliestireno

A formação do biofilme foi realizada para as 49 amostras, segundo Alvim e colaboradores (2019) com modificações. Primeiramente, as amostras de GBS foram ativadas em ágar sangue por 24h a 37°C em atmosfera normal e, em seguida, foram inoculadas em caldo THB (OXOID) suplementado até chegar à concentração de 1,0% (p/v) de glicose (THB-G) e incubadas a 37°C por 24 h. Após, foram diluídas em 2 mL de caldo THB-G, a fim de que a turbidez final correspondesse à escala 0,5 de McFarland ( $\cong 1,5 \times 10^8$  UFC). Dessa diluição, alíquotas de 200  $\mu$ L foram transferidas para poços de placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (NEST Scientific, China). O ensaio foi realizado em quadruplicata, além dos 4 poços contendo 200  $\mu$ L de caldo estéril sem inóculo bacteriano para controle negativo (branco). Como controle positivo foi utilizada uma amostra forte produtora de biofilme e uma fraca produtora de biofilme. A placa foi incubada a 37°C durante 24h. Após, a placa foi lavada duas vezes com 200  $\mu$ L de água destilada para retirada de bactérias não aderentes e seca em estufa a 70°C por 1h para a fixação do biofilme. Na etapa seguinte, as placas foram coradas com cristal violeta a 0,1% p/v por 5 min, lavadas com 200  $\mu$ L de água destilada, após, foram eluídas em 100  $\mu$ L de álcool P.A. por 30 min e a leitura da densidade ótica foi realizada (DO 570nm). A interpretação foi feita segundo Alvim e colaboradores (2019) com modificações, conforme descrito na Tabela 2.

**Tabela 2:** Classificação dos biofilmes em placas de poliestireno de acordo com a densidade ótica (DO 570nm) do biofilme.

<b>Classificação</b>	<b>(DO570nm)</b>
Não aderentes	$\leq$ a 0,230
Fracos formadores	0,231 a 0,459
Moderados formadores	0,460 a 0,919
Fortes formadores	$\geq$ a 0,920

#### 4.9 Análises *in silico*

Os espectros gerados pelo espectrômetro de massa Microflex LT (Bruker Daltonics, Alemanha) através da técnica de MALDI-TOF foram analisados com auxílio do software BioNumerics v7.6 (Applied Maths, Bélgica), no qual foi construído um diagrama baseado no coeficiente de Pearson e no algoritmo Neighbor Joining, a fim de observar a distribuição das amostras de GBS e avaliar possíveis associações com as características analisadas.

## 5. Resultados

### 5.1 Teste fenotípicos para identificação presuntiva

Informações referentes às 49 cepas incluídas no presente estudo estão descritas no **ANEXO 1**. Todas as amostras apresentaram a beta-hemólise característica de *S. agalactiae* em ágar sangue e no meio CHROMagar™ StrepB formaram colônias rosas que é indicativo de GBS. As amostras estudadas foram submetidas à coloração de Gram para observação das características morfo-tintoriais, onde todas se apresentaram como Gram positivas em formato de cocos dispostos em cadeia ou pares.

Ainda, todas as cepas foram positivas para o teste do fator CAMP, como demonstrado na **Figura 4** abaixo, e todas se mostraram serem produtoras da enzima hipuricase, tendo sido capazes de hidrolisar o hipurato de sódio.



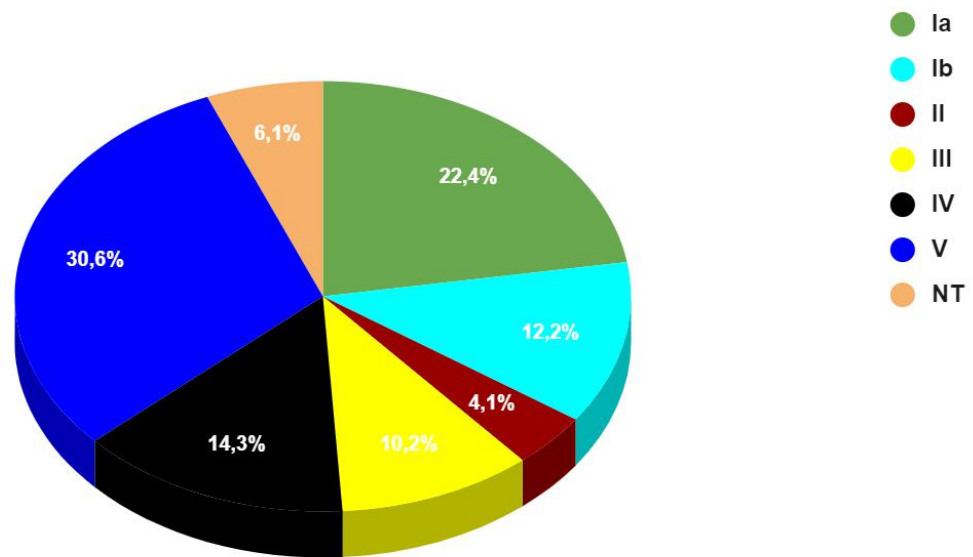
**Figura 4: Teste do Fator CAMP.** Obtida no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (imagem autoral).

### 5.2 Confirmação da identificação

Todas as cepas provenientes de material clínico de espermocultura foram identificados por MALDI-TOF MS como pertencentes a espécie *S. agalactiae*. A confirmação da identificação ocorreu de acordo com os escores dos espectros gerados pelo software MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Alemanha), onde todas as amostras obtiveram uma identificação confiável ao nível de espécie (score  $\geq 2,0$ ).

### 5.3 Determinação do tipo capsular

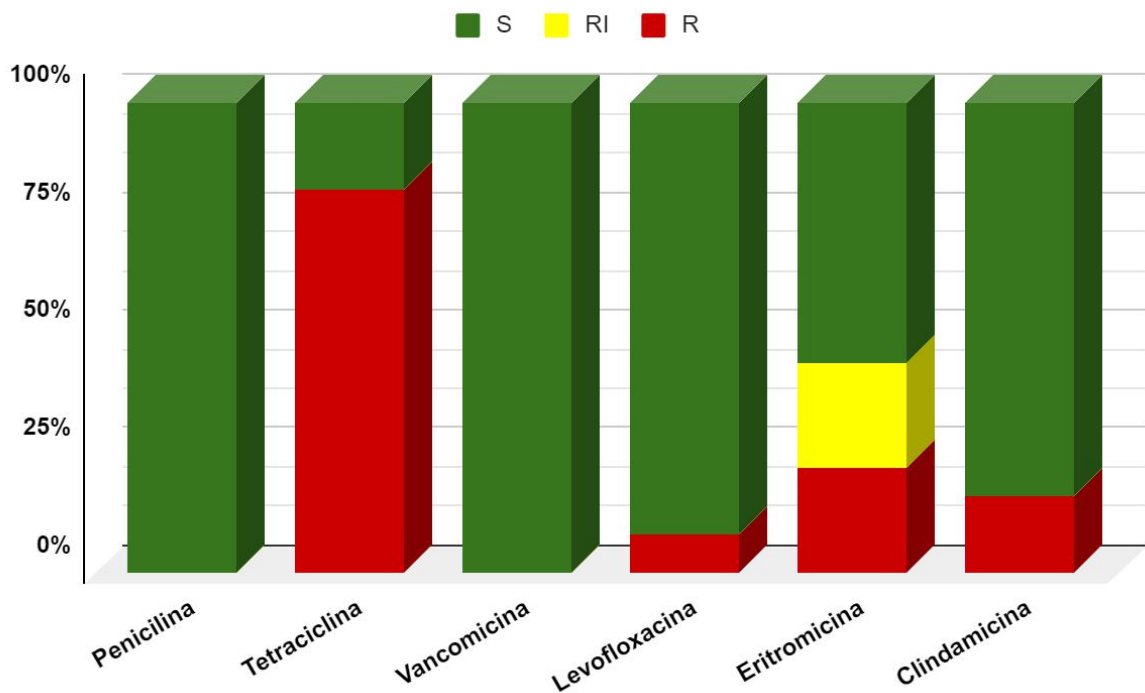
A determinação do tipo capsular por meio do método de aglutinação em látex foi realizada para todas as amostras analisadas (**Figura 5**). Os sorotipos encontrados foram: V (30,6%), seguido do Ia (22,4%), IV (14,3%), Ib (12,2%), III (10,2%) e II (4,1%). Ainda, 3 amostras (6,1%) se apresentaram como não tipáveis (NT). Para estas foi realizado o PCR para tipo capsular, onde foi observada a ausência de bandas referentes à amplificação de genes do locus capsular, confirmando-as então como não tipáveis.



**Figura 5:** Distribuição dos tipos capsulares através da aglutinação em látex utilizando o kit Immulex Strep-B (SSI Diagnóstica, Dinamarca) de amostras de espermocultura.

### 5.4 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Os resultados observados para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos estão expressos na **Figura 6**.



\* R: Resistente; RI: Resistência intermediária; S: sensível

**Figura 6:** Susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de espermocultura analisadas

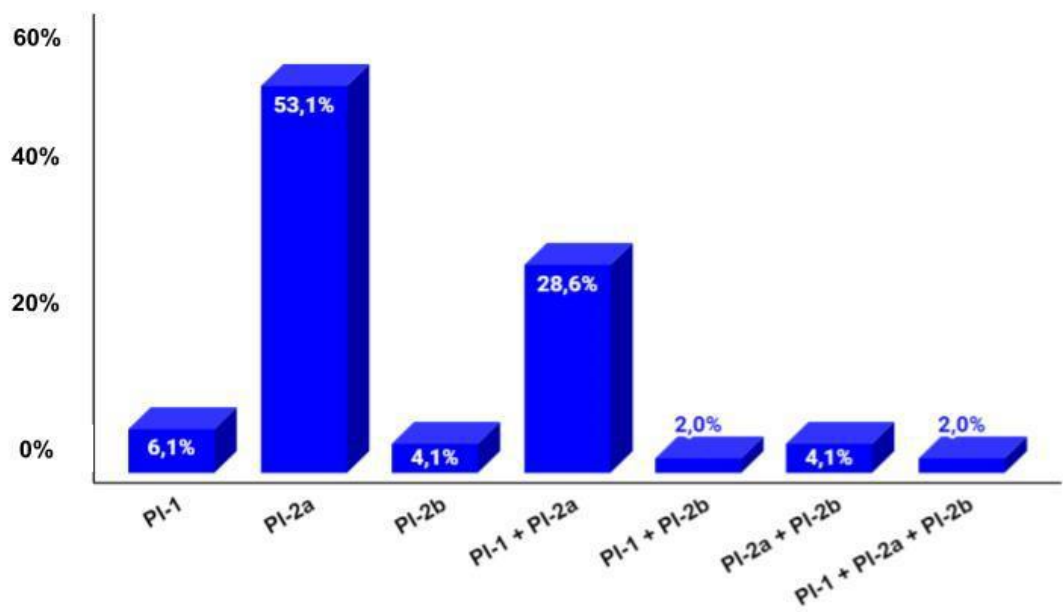
Apesar de 100% das cepas terem apresentado sensibilidade à penicilina e vancomicina, percentuais significativos de resistência foram observados para tetraciclina (81,6%), eritromicina (44,8%), clindamicina (16,3%) e levofloxacina (8,2%). Para as amostras que apresentaram resistência à levofloxacina, realizou-se o teste episilométrico onde nenhuma das 4 amostras exibiu halo de inibição, indicando uma CMI maior que 32  $\mu\text{g/mL}$ . Além disso, foi avaliada a susceptibilidade ao cloranfenicol para estas 4 amostras e todas elas apresentaram resistência a esse antimicrobiano. Ainda, essas 4 cepas apresentaram o perfil  $\text{MLS}_B$  induzido (**Figura 7**) e resistência à tetraciclina, sendo assim consideradas amostras multirresistentes. Ademais, foi observado o fenótipo  $\text{MLS}_B$  induzido para 10,2% das amostras, enquanto o fenótipo  $\text{MLS}_B$  constitutivo esteve presente em 4%, o fenótipo M em 30% e o fenótipo L em 2%.



**Figura 7:** Observação do fenótipo  $MLS_B$  induzido pelo teste D.

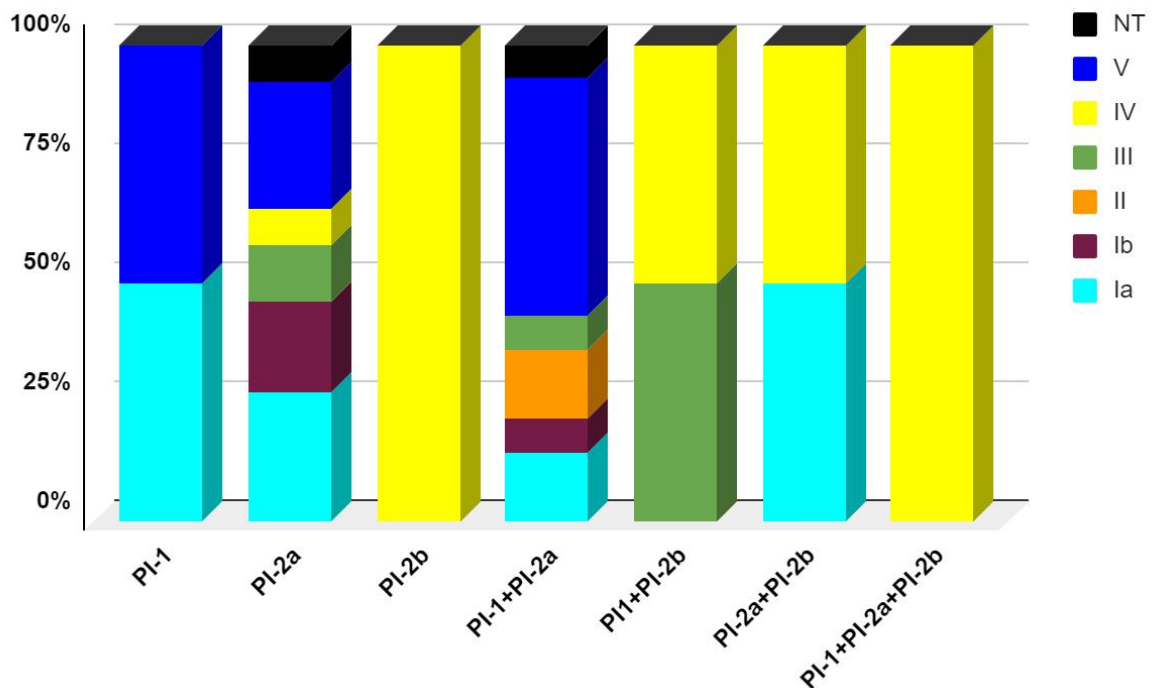
### 5.5 Ocorrência dos Pili

Todas as 49 cepas apresentaram pelo menos um dos genes envolvidos na codificação de pilus (**Figura 8**). Foram observados 7 perfis com distintas combinações dos pili, onde se destacaram as amostras apresentando somente PI-2a (53,1%) e a combinação PI-1 + PI-2a (28,6%).



**Figura 8:** Distribuição dos Pili entre as amostras avaliadas no estudo.

Cepas contendo somente o PI-2a eram pertencentes a praticamente todos os sorotipos (exceto o II), enquanto as amostras que apresentaram somente o PI-2b pertenciam exclusivamente ao sorotipo IV e as amostras que apresentaram somente PI-1 eram dos sorotipos Ia e V. Ainda, a única amostra que apresentou os três tipos de pili pertencia ao sorotipo IV, as amostras com o perfil PI-1+PI-2a pertenciam à distintos sorotipos com predominância do sorotipo V, as do perfil PI-2a+PI-2b apresentavam os sorotipos Ia e IV e as amostras que apresentaram PI-1+PI-2b eram pertencentes aos sorotipos III e IV (**Figura 9**).



**Figura 9:** Classificação dos pili de acordo com a distribuição de sorotipos.

## 5.6 Avaliação da formação do biofilme

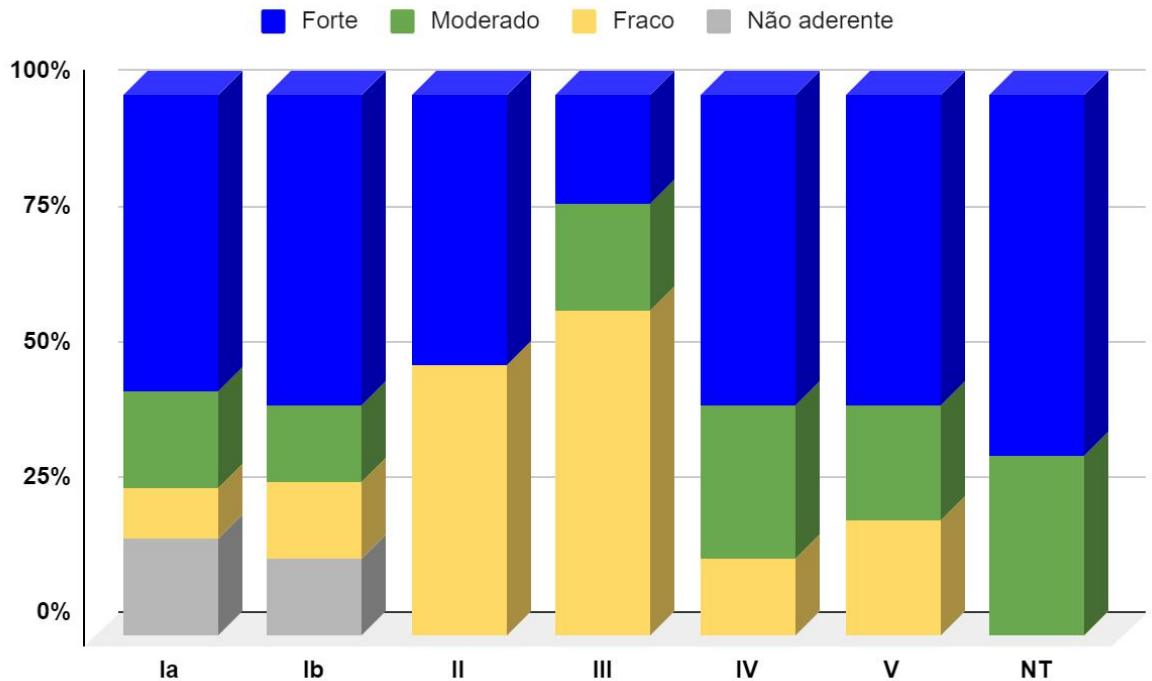
Para avaliação da formação do biofilme, a partir da leitura da densidade óptica as cepas foram classificadas em 4 fenótipos de acordo com Amaral e colaboradores (2009).

Dentre as 49 amostras, 55,1% apresentaram-se como fortes produtoras de biofilme, enquanto 20,4% foram fracas produtoras, 18,4% foram moderadas produtoras e 6,1% das amostras foram consideradas não aderentes.

No geral, todos os sorotipos apresentaram majoritariamente cepas fortes formadoras de biofilme, exceto o sorotipo III que se mostrou associado a amostras fracas produtoras.

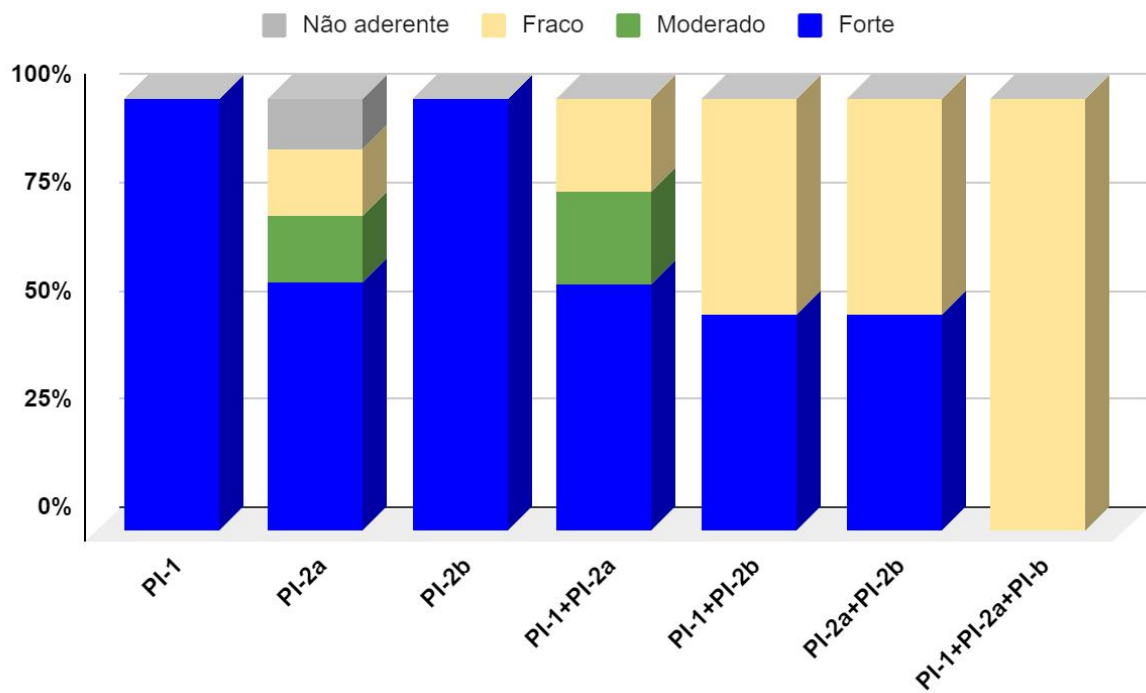


Apenas cepas pertencentes aos sorotipos Ia e Ib foram não aderentes. Os resultados podem ser visualizados na **Figura 10**.



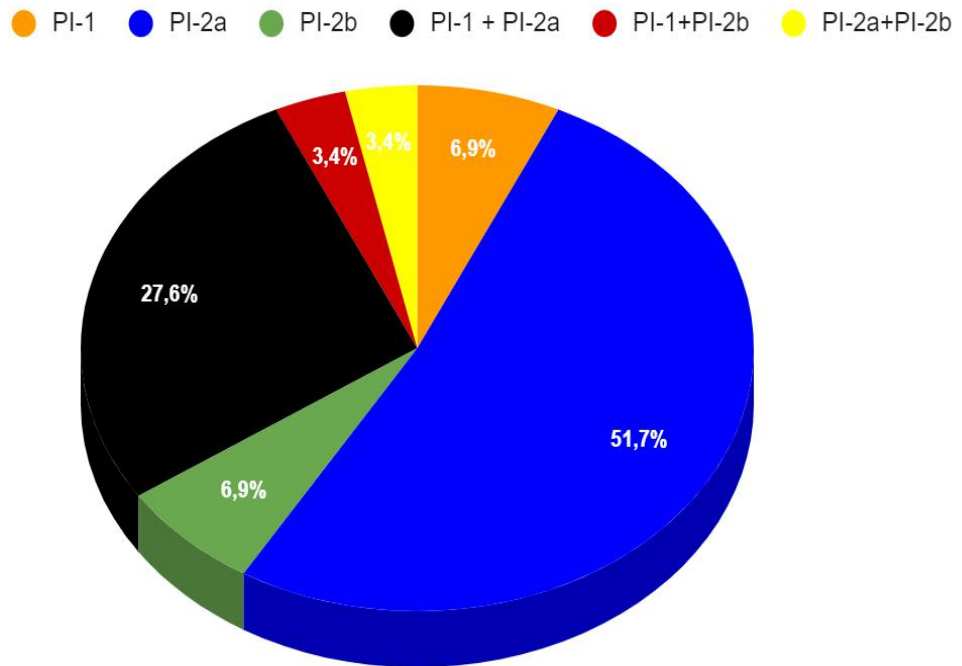
**Figura 10:** Classificação das amostras quanto à produção de biofilme distribuídas nos diferentes sorotipos.

Além disso, as cepas com genes codificadores para somente o pilus PI-1 (n=2) e PI-2b (n=2) mostraram estar plenamente associadas à uma forte formação de biofilme. Para as amostras que codificam genes apenas para o pilus PI-2a (n=26), 57% foram fortes formadoras, 15,4% foram moderadas, 15,4% fracas formadoras e 11,5% não aderentes. Já para a combinação PI-1+PI-2a (n=14), 57,1% foram fortes formadoras, 21,4% moderadas e 21,4% fracas formadoras. Enquanto as combinações PI-1+PI-2b (n=2) e PI-2a+PI-2b (n=2), foram igualmente representadas por cepas fortes e fracas formadoras (50% cada). E a combinação PI-1+PI-2a+PI-2b foi representada por uma cepa que se apresentou fraca formadora de biofilme. Esses dados podem ser visualizados na **Figura 11**.



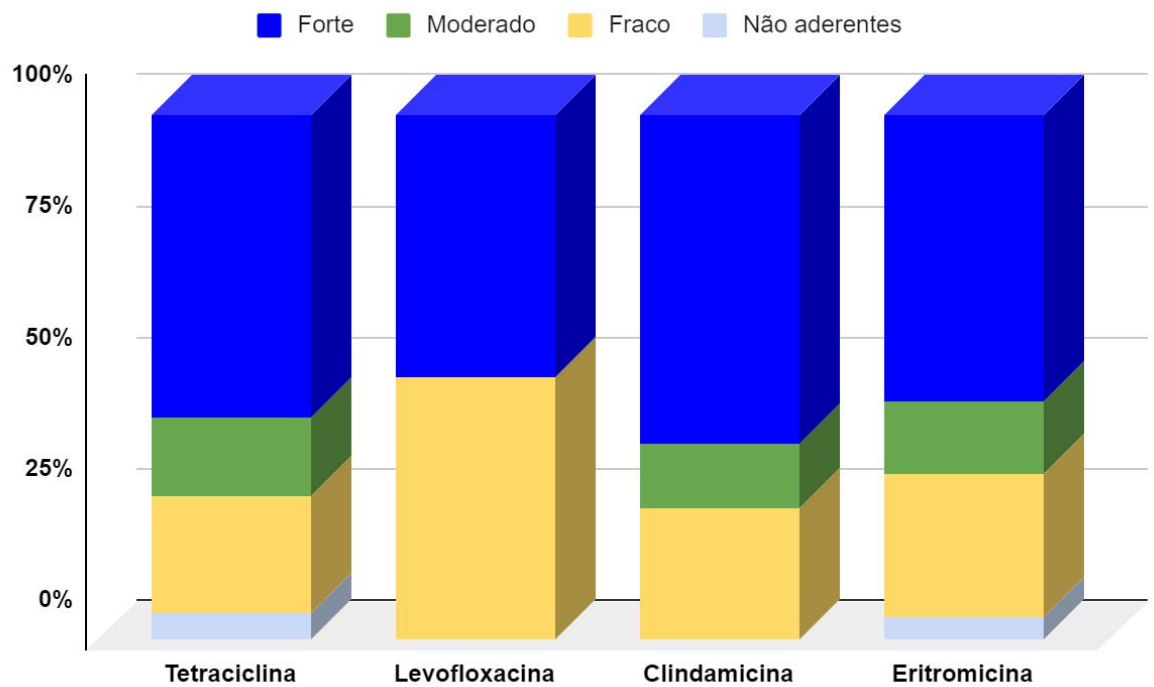
**Figura 11:** Classificação das amostras de acordo com os genes envolvidos na produção dos Pili em relação aos fenótipos do biofilme apresentados em amostras de espermocultura

Comparando apenas as cepas fortes formadoras de biofilme com os perfis de pilus, 51,7% apresentavam somente o PI-2a, 27,6% a combinação PI-1+PI-2a, 6,9% somente o PI-1, 6,9% somente o PI-2b, e 3,4% para as combinações PI-1+PI-2b e PI-2a+PI-2b. Esses resultados podem ser visualizados na **Figura 12**.



**Figura 12:** Classificação das cepas de espermocultura fortes produtoras de biofilme em relação a distribuição dos Pili.

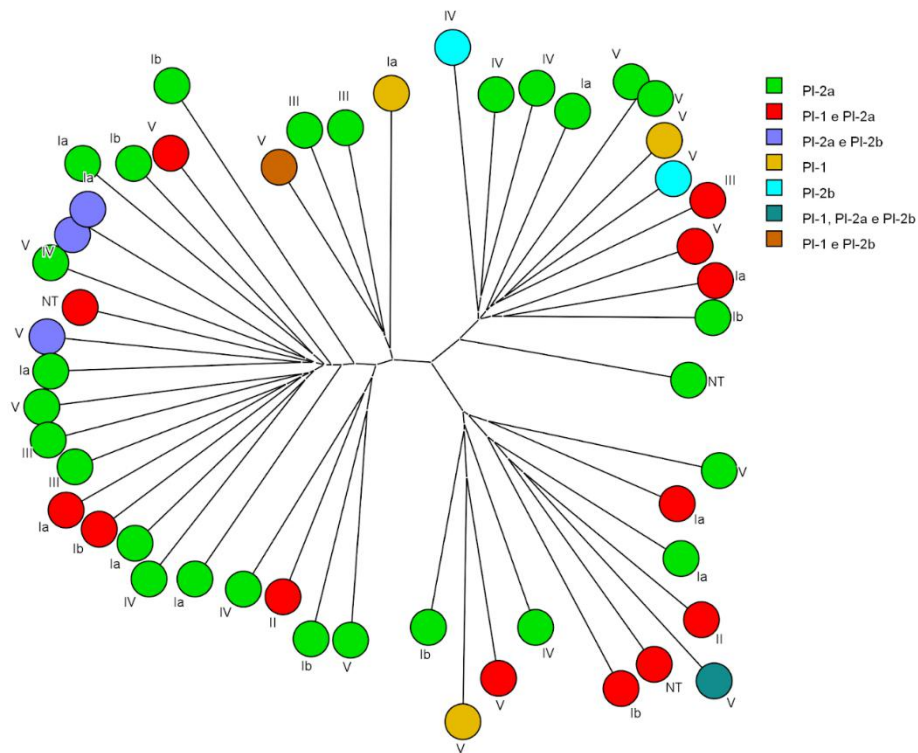
Ademais, em relação à tetraciclina a maior parte das cepas (57,5%) resistentes foram fortes formadoras de biofilme, 22,5% foram fracas, 15% moderadas e 5% não aderentes. Para levofloxacinina, 50% foram fracas formadoras e 50% forte formadoras; já à clindamicina, 62,5% foram forte formadoras, 25% foram fracas formadoras e 12,5% foram moderadas; e para eritromicina, 54,5% foram fortes formadoras, 27,3% fraco formadoras, 13,7% moderado formadoras e 4,5% não aderentes (**Figura 13**).



**Figura 13:** Classificação das amostras de acordo com o perfil de resistência em relação aos fenótipos do biofilme apresentados em amostra de espermocultura.

### 5.7 Análise dos espectros gerados pelo MALDI-TOF MS

Os espectros gerados pelo espectrômetro de massa foram analisados pelo *Bionumerics*, o que permitiu a distribuição das amostras em grupos que, apesar da maior frequência dos perfis PI-2a ou PI-1 + PI-2a, apresentaram uma ampla distribuição dos distintos sorotipos e perfis de pili, não estando, portanto, correlacionados com determinados perfis de tais características (**Figura 14**).



**Figura 14:** *Neighbor Joining tree* gerada a partir de espectros obtidos pelo espectrofotômetro de massa do MALDI-TOF MS entre 49 amostras incluídas neste estudo. As cores dos nódulos representam o perfil dos pili e está nomeado de acordo com os sorotipos.

## 6. Discussão

*Streptococcus agalactiae* inicialmente foi reconhecido como um dos principais patógeno causador de mastite em animais leiteiros levando a perdas econômicas na agropecuária (Cheng & Han, 2020). Esse microrganismo também é um importante agente em infecções em humanos, principalmente em mulheres grávidas e neonatos podendo causar casos de infecções urinária, complicações no puerpério, meningite, sepse e pneumonias em neonatos (Furfaro, Chang & Payne, 2018). Além disso, *S. agalactiae* também pode ser encontrado em adultos não gestantes em sítios como o trato respiratório superior e geniturinário, sendo normalmente comensal, mas podendo atuar como agente infeccioso (Raabe & Shane, 2019).

Dentre as infecções em adultos não gestantes, GBS também pode causar infecções no trato urinário masculino (Parida & Samanta, 2017). Segundo dados da literatura, a taxa de colonização por GBS é aumentada em pacientes com prostatite crônica e em idade fértil, além disso mostram que a relação entre *S. agalactiae* e alta contagem de leucócitos no sêmen, que é uma condição relacionada com a infertilidade, pode indicar que seja um possível agente causador de infecções neste sítio (Yang, Bian e Sun, 2019; Fujita *et al.*, 2011; Parida e Samanta, 2017). Esses aspectos, tornam de elevada relevância a avaliação de amostras de GBS de material clínico de espermiocultura, como realizada neste trabalho. Nesse estudo o perfil de idade entre os pacientes variou de 22 a 65 anos e teve uma média de idade de 39 anos, mostrando que a PBC não acomete somente idosos, tendo na realidade ocorrido entre jovens em idade fértil.

No presente estudo, todas as cepas avaliadas quanto ao teste da produção do fator CAMP e da hidrólise do hipurato de sódio obtiveram resultado positivo esperado, corroborando com resultados de estudos antigos bem estabelecidos (Phillips, Tapsall e Smith, 1980; Waitkins, 1980). Apesar desses testes quando usados isoladamente não serem confiáveis no que diz respeito a identificação da espécie, os resultados positivos combinados entre os testes geram maior confiabilidade, além de serem de baixo custo quando comparados a outras técnicas genotípicas (Rosa-Fraile e Spellerberg, 2017). Além disso, é muito importante saber se essas amostras produzem a proteína CAMP e a hialuronidase, uma vez que, essas também desempenham papel na virulência deste microrganismo, e proteínas que desempenham papel de virulência podem afetar a microbiota do trato urogenital masculino (Parida e Samanta, 2017; Spellerberg, 2000). A proteína CAMP está envolvida com a sobrevivência intracelular do microrganismo no hospedeiro, por meio da degradação do ácido hialurônico e degradação de

sulfatos de condroitina pela hialuronidase, o que permite a bactéria invadir o sistema biofísico do hospedeiro (Baker e Pritchard, 2000; Li e Jedrzejcas, 2001; Parida e Samanta, 2017).

Para a confirmação da identificação foi utilizado o MALDI-TOF MS que gera espectros que são comparados com o banco de dados e fornecem escores de confiabilidade. O MALDI-TOF MS é um método de identificação rápida para espécies bacterianas clinicamente importantes, baseada na detecção de biomarcadores altamente conservados intraespécie, tais como as proteínas ribossômicas (Wieser *et al.*, 2012). O potencial de identificação no nível de espécie torna o MALDI-TOF MS uma revolução contínua na microbiologia. E em relação a identificação de *S. agalactiae*, diversos estudos demonstram que o MALDI-TOF os classifica na espécie de forma correta, mesmo em estudos que utilizaram sorotipos diferentes, demonstraram que não houve divergência na classificação (Assis *et al.*, 2017; Ábrók *et al.*, 2019; Rothen *et al.*, 2020). Além disso, estudos mostram que o exame dos espectros do MALDI-TOF é um método útil para detectar clones de GBS (Ábrók *et al.*, 2019; Rothen *et al.*, 2020). Ainda, através da análise dos espectros gerados pelo MALDI-TOF foi possível a construção de uma árvore filogenética do tipo *Neighbor Joining*, onde as amostras puderam ser distribuídas em grupos. Apesar de uma maior frequência dos perfis PI-2a e PI-1 + PI-2a entre os grupos observados, estes não se mostraram correlacionados com os perfis de pili e nem com sorotipo.

A distribuição dos sorotipos de GBS pode variar de acordo com o país ou a região geográfica analisada, sendo o sorotipo Ia o mais frequentemente relatado nas Américas (Ippolito *et al.*, 2010). Nos EUA o sorotipo mais frequente é o Ia, seguido do V, II, III, Ib e IV (McGee *et al.*, 2021). Na Itália o sorotipo III é o mais comum, seguido do V, Ia, Ib, II e IV (Genovese *et al.*, 2020). Na África o sorotipo V é o mais frequente, seguido do III, Ia, Ib e II (Gizachew *et al.*, 2019). As amostras de esperma do presente estudo pertencem a 6 sorotipos capsulares distintos: Ia, Ib, II, III, IV e V. O sorotipo mais frequentemente detectado foi o sorotipo V (30,6%), seguido do Ia (22,4%), IV (14,3%), Ib (12,2%), III (10,2%) e II (4,1%). Tais resultados diferem de achados no Brasil, que habitualmente relatam a alta frequência do sorotipo Ia, seguida dos tipos II, III ou V, e com uma menor frequência dos tipos Ib e IV (Corrêa *et al.*, 2011; Botelho *et al.*, 2018; Kfoury *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2022). Estudos recentes vêm relatando mudanças significativas nos perfis de sorotipos, onde o sorotipo III parece estar diminuindo a frequência enquanto o V e o Ib vêm aumentando (Soares *et al.*, 2013; Botelho *et al.*, 2018a; Shipitsyna *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2022). Além disso, o sorotipo V é relatado como o mais comumente encontrado em infecções em adultos não gestantes (Yoon *et al.*, 2015;

Bianchi *et al.*, 2020). Esses dados podem sugerir o porquê da maior frequência do sorotipo V neste estudo. Além disso, na Ásia e África relatam frequentemente os sorotipos VI, VII, VIII e IX, que são frequentemente reportados na Ásia e África, que não foram detectados nesse estudo (Hirai *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020). Ainda, 6,1% das amostras se apresentaram como não tipáveis, sendo sugerido que podem ser amostras sem a cápsula polissacarídica ou até mesmo pertencerem a um novo sorotipo ainda não descrito (Furfaro, Chang & Payne, 2018).

Assim como comumente reportado ao redor do mundo, todas as cepas avaliadas apresentaram sensibilidade a penicilina e vancomicina, estando, portanto, de acordo com a literatura, uma vez que, a resistência para essas classes de antimicrobianos é rara (Metcalf *et al.*, 2017).

Para os pacientes que são alérgicos aos beta-lactâmicos, são recomendados antimicrobianos da classe dos macrolídeos e lincosaminas, entretanto, de acordo com dados na literatura a resistência a essas classes vem sendo reportada ao longo dos anos (Raabe & Shane, 2019; Hayes, O'Halloran & Cotter, 2020). Neste estudo 44,8% amostras apresentaram resistência à eritromicina, o que não foi de encontro ao reportado por estudos realizados no Brasil, onde habitualmente são relatadas taxas de resistência de 4 a 25% (Barros, 2021). Dessa forma, nossos resultados estão mais similares à estudos realizados nos EUA, que apresentaram níveis de resistência a eritromicina de 54,8% em amostras encontradas em adultos (Watkins *et al.*, 2019; Hayes, O'Halloran e Cotter, 2020), e na China, que relatam taxas de 74,1% a 92,5% (Guo *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2020). Em relação à clindamicina, a taxa de 16,3% observada neste estudo está de acordo com o que normalmente é relatado em estudos brasileiros, que apontam taxas de 1,9 a 18,8% de resistência. Apesar disso, estudos em outras localidades reportam taxas maiores de resistência à clindamicina, como em torno de 50% nos EUA (Watkins *et al.*, 2019; Hayes, O'Halloran e Cotter, 2020) e 64,2% a 87,5% na China (Guo *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2020).

Dentre as cepas com fenótipos MLS<sub>B</sub> constitutivo e induzido (7) observadas neste estudo, 85,7% eram pertencentes ao sorotipo V e apenas uma (14,3%) foi não tipável. Essa associação corrobora com achados no Brasil onde o sorotipo V predomina entre as amostras com a resistência MLS<sub>B</sub> (Dutra *et al.*, 2014; Khodaei *et al.*, 2018; Barros, 2021). Além disso, outros estudos realizados no Brasil, Portugal, Coreia do Sul e Itália também mostraram a associação do tipo capsular V com a resistência aos macrolídeos (Pinto *et al.*, 2013; Otaguiri *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2015; Simone *et al.*, 2018).



Em relação à tetraciclina, sabe-se que a maioria das cepas de GBS de humanos são resistentes à tetraciclina, e isso ocorre devido a aquisição de elementos genéticos móveis e à expansão desses clones que levou ao surgimento de amostras mais adaptadas para causar infecções em humanos (Metcalf *et al.*, 2017; Hayes, O'Halloran e Cotter, 2020). Assim, foi observada neste estudo uma alta taxa de resistência à tetraciclina (81,6%), corroborando com dados achados na literatura, uma vez que a taxa de resistência à tetraciclina em humanos varia de 75% a 100% no Brasil (Barros, 2021).

A levofloxacina é recomendada pelo FDA como droga de tratamento para prostatite, por possuir características anfotéricas e de drogas iônicas e com isso leva a altos níveis prostáticos (Lipsky *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2020). Porém a crescente resistência às fluoroquinolonas que vem sendo observada, tem preocupado pesquisadores e clínicos. (Shigehara *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2020). Por isso, o estudo da resistência a essa quinolona é muito importante para a escolha do tratamento desses pacientes.

Nesse estudo, observou-se taxa de resistência de 8,2% para levofloxacina, que apesar de rara, já foi relatada no Brasil em níveis de 1 a 7,1% (Barros, 2021). Assim, nosso estudo mostra que a taxa de resistência à levofloxacina está de acordo com o mais alto nível já reportado. As 4 amostras resistentes à essa quinolona, que eram todas pertencentes ao sorotipo V e apresentavam o fenótipo  $MLS_B$  induzido, apontaram uma CMI  $>32 \mu\text{g/mL}$  para a levofloxacina. Estas foram também testadas quanto à susceptibilidade ao cloranfenicol, uma vez que é descrito na literatura que amostras resistentes à levofloxacina frequentemente são resistentes ao cloranfenicol (Yoon *et al.*, 2015; Simone *et al.*, 2018), tendo sido todas as 4 amostras determinadas como resistentes ao antimicrobiano. Esses dados são compatíveis com dados reportados na literatura que apresentam essas mesmas associações entre sorotipo V, fenótipo  $MLS_B$  e resistência à levofloxacina e ao cloranfenicol em amostras de GBS (Yoon *et al.*, 2015; Simoni *et al.*, 2018). Essas amostras, devido a resistência à mais de 3 distintas classes de antimicrobianos, foram, portanto, consideradas como multirresistentes.

Ademais, quanto aos genes envolvidos na produção de Pili, a presença de ao menos uma variante de pilus nas 49 cepas analisadas corrobora com dados reportados na literatura (Rosini *et al.*, 2006; Margarit *et al.*, 2009; Alvim *et al.*, 2019). Apresentaram maior frequência o PI-2a (53,1%) e a combinação PI-1 + PI-2a (28,6%), enquanto para os outros perfis foi observado 6,1% para PI-1 e a mesma porcentagem para a combinação de PI-2a + PI-2b, 4,1% para amostras contendo somente o PI-2b e 2% para PI-1 + PI-2b e para PI-1 + PI-2a + PI-2b.

Esses resultados vão de encontro com achados na literatura, que relatam que é comum a maior prevalência do PI-2a com ou sem PI-1 (Pang *et al*, 2017; Motallebirad *et al*, 2021).

Considerando a relação de distribuição de Pilus com os sorotipos, as cepas que apresentaram somente o sorotipo PI-2b são do sorotipo IV, o que corrobora com dados na literatura (Margarit *et al.*, 2009; Alvim *et al.*, 2019). O perfil PI-1+PI-2b foi associado a amostras dos sorotipos III e IV, o que concorda com outros estudos, uma vez que Khodaei e colaboradores (2018) observaram em seu estudo que os sorotipos relacionados a combinação PI-1+PI-2b foi distribuída entre os sorotipos II, III e IV e em um estudo mais recente feito por Shipitsyna e colaboradores (2020) observaram fortes associações entre o PI-1+PI-2b e o sorotipo III. Além disso, também foi possível observar neste estudo a relação do perfil PI-1+PI-2a com uma maior frequência do sorotipo V, que também já foi observado por Shipitsyna e colaboradores (2020). Com tudo, não há uma relação pré-definida na literatura na relação entre pilus e sorotipo, sugerindo que o gene da ilha de pilus pode ter a capacidade de se desenvolver em todos os sorotipos (Khodaei *et al*, 2018).

Com relação à formação do biofilme, dentre as 49 amostras, apenas 6,1% foram consideradas não formadoras de biofilme, enquanto 55,1% foram consideradas fortes produtoras de biofilme e 38,8% foram consideradas moderadas/fracas produtoras de biofilme. Esses dados sugerem que as amostras provenientes de esperma, tem capacidade de formar biofilme e isso pode ajudar no estabelecimento da colonização e infecções no hospedeiro. E já foi descrito na literatura que, pacientes com quadros de prostatite podem vir a ter uma reinfeção, onde essa segunda infecção pode estar relacionada com a capacidade da bactéria persistir no hospedeiro através do biofilme (Mazzoli, 2010).

Considerando a relação do biofilme com o sorotipo de cada cepa, a maior parte dos sorotipos apresentou a maioria de suas amostras como fortes formadoras (54,6% para Ia; 57,4% para Ib; 50% para II; 57,4% para IV; e 57,2% para V). Apenas o sorotipo III teve 60% de suas amostras como fracas formadoras de biofilme. Tal dado difere da literatura que habitualmente relatam amostras do sorotipo III como fortes produtoras (Alvim *et al*, 2019; Shadbad *et al*, 2020). Contudo, os fenótipos de biofilme mostraram-se variados no que se refere à sorotipos. Em um estudo recente de Noble e colaboradores (2021), descreveram que a formação de biofilme pode envolver diversos fatores, que podem variar entre amostras ou espécies ou até mesmo fatores ambientais podem influenciar na formação de biofilme, sugerindo que seja independentemente do tipo capsular.

Quanto à distribuição dos Pili com os fenótipos de biofilme entre as fortes produtoras, 6,9% codificam genes apenas para PI-1, 51,7% codificam genes para apenas PI-2a, 6,9% para PI-2b, 27,6% para PI-1 + PI-2a, 3,4% para PI-1+PI-2b e 3,4% para PI-2a+PI-2b. Essa alta frequência da PI-2a em cepas fortes formadoras de biofilme corrobora com achados na literatura, uma vez que já foi relatada a relação entre PI-2a com a formação do biofilme e estudos indicam que o PI-2a desempenham um papel mais significativo na formação de biofilme de GBS do que o PI-1 e PI-2b (Rinaudo *et al*, 2010; Shadbad *et al*, 2020a).

Com relação à resistência aos antimicrobianos e os fenótipos de biofilme, os resultados aqui reportados não exibiram uma relação definida com os perfis de biofilme. Tais resultados são consistentes com os resultados de um estudo recente realizado por Shadbad e colaboradores (2020b) onde observaram que não houve uma relação entre a capacidade de formação de biofilme com a resistência aos antimicrobianos, corroborando também com resultados de Jiang e colaboradores (2016).

O estudo dos fatores de virulência em GBS são muito importantes, pois podem contribuir para estratégias de elaboração de vacinas, uma vez que propostas capsulares não englobam todos os sorotipos e nem as amostras não tipáveis. Logo, vacinas utilizando proteínas como os pili mostram-se um alvo mais abrangente para uma proposta vacinal (Patras & Nizet, 2018; Lin *et al*, 2021).

Assim, o presente estudo trouxe a caracterização de amostras isoladas de material clínico de espermocultura, e com os dados apresentados foi possível observar algumas associações. O perfil de resistência e distribuição da ilha de patogenicidade pode elucidar como essas cepas podem ser virulentas quando se encontram no hospedeiro, podendo ser resistentes a várias classes de antibióticos, principalmente a levofloxacina que é um antimicrobiano usado no tratamento de prostatite. Além disso, 93,9% das cepas demonstram ser produtoras de biofilme, sugerindo que podem formar biofilmes para evadir do sistema imune do hospedeiro e assim causarem uma reinfecção. Esses dados são muito importantes, pois a prostatite é uma doença que causa relevante dor e desconforto podendo levar à infertilidade (Parida & Samanta, 2017).

Portanto, os resultados deste estudo trazem subsídios para a literatura, visto que a maioria dos estudos sobre GBS em espermocultura apenas relatam a sua presença nessa fonte clínica sem maiores caracterizações (Mazzoli, 2010; Farahani *et al*, 2021, Purushottam *et al*, 2021; Ho *et al*, 2022). Por fim, o presente estudo constitui em dados inéditos quanto a

caracterização fenotípica e genotípica de GBS provenientes de esperma de amostras circulantes no Brasil.

## 7. Conclusão

O presente trabalho constitui o primeiro estudo sobre a caracterização de amostras isoladas de espermocultura em pacientes com suspeita de prostatite bacteriana. Assim, pode-se concluir que:

- As cepas provenientes de esperma foram identificadas ao nível de espécie por métodos fenotípicos e pela técnica de MALDI-TOF;
- A determinação do tipo sorológico mostrou a prevalência do sorotipo V (30,6%), seguida dos sorotipos Ia (22,4%), IV (14,3%), Ib (12,2%), III (10,2%) e II (4,1%), enquanto 3 amostras foram não tipáveis;
- O perfil de susceptibilidade demonstrou cepas 100% suscetíveis à penicilina e vancomicina, enquanto a resistência foi de 81,6% para a tetraciclina, 44,8% para eritromicina, 16,3% para clindamicina e 8,2% para levofloxacina;
- As cepas com perfil de resistência à levofloxacina também apresentaram resistência ao cloranfenicol;
- O fenótipo  $MLS_B$  induzido foi observado em 5 cepas, enquanto o fenótipo  $MLS_B$  constitutivo foi observado em 2 amostras e o fenótipo M em 4;
- Todas as cepas apresentaram ao menos um dos genes codificadores de Pilus, os pili mais frequente foi o PI-2a e a combinação de PI-1 + PI-2a;
- Quanto à capacidade de formação de biofilme, 93,9% foram capazes de produzir biofilme.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ábrók, M., Tigyí, P., Kostrzewa, M., Burián, K., & Deák, J. (2019). Evaluation of the Results of Group B Streptococcus Screening by MALDI-TOF MS among Pregnant Women in a Hungarian Hospital. *Pathogens*, 9,1.
- Absalon, J., Segall, N., Block, S. L., Center, K. J., Scully, I. L., Giardina, P. C., Peterson, J., Watson, W. J., Gruber, W. C., Jansen, K. U., Peng, Y., Munson, S., Pavliakova, D., Scott, D. A. e Anderson, A. S. 2021. Safety and immunogenicity of a novel hexavalent group B Streptococcus conjugate vaccine in healthy, non-pregnant adults: a phase 1/2, randomised, placebo-controlled, observer-blinded, dose-escalation trial, *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier Ltd, 21:263–274.
- Alvim, D. C. S. S., Ferreira, A. F. M., Leal, M. A. Oliveira, L. M. A., Botelho, A. M. N. Botelho, A. C. N., Figueiredo, A. M. S., Fracalanza, S. E. L., Teixeira, L. M. e Pinto, T. C. A. 2019. Biofilm production and distribution of pilus variants among Streptococcus agalactiae isolated from human and animal sources. *Biof.*, 35: 938-944.
- Amaral, M. M., Coelho, L. R., Flores, R. P., Souza, R. R., Silva-Carvalho, M. C., Teixeira, L. A., Ferreira-Carvalho, B. T., Figueiredo, A. M. S. 2005. The Predominant Variant of the Brazilian Epidemic Clonal Complex of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Has an Enhanced Ability to Produce Biofilm and to Adhere to and Invade Airway Epithelial Cells. *Journal of Infectious*, 192: 801–810
- Ancona, R. J., Ferrieri, P., Williams, P. P. 1980. Maternal factors that enhance the acquisition of group B Streptococci by newborn infants. *Journal of Medical Microbiology*, 13: 273-280.
- Armistead, B., Oler, E., Waldorf, K. A., Rajagopal, L., 2019. The Double Life of Group B *Streptococcus*: Asymptomatic Colonizer and Potent Pathogen. *J of Mol Biol*. 431: 2914-2931.
- Assis, G. B. N., Pereira, F. L., Zegarra, A. U., Tavares, G. C., Leal, C. A., & Figueiredo, H. C. P. 2017. Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens. *Front. Microbiol*. 8:1492
- Barros, R. R. 2021. Antimicrobial Resistance among Beta-Hemolytic Streptococcus in Brazil: An Overview, *Antibiotics*, 10:973.
- Baker CJ, Kasper DL., 1985. Group B streptococcal vaccines. *Rev Infect Dis*. 7:458-467.
- Baker CJ, Rench MA, Edwards MS, Carpenter RJ, Hays BM, Kasper DL. (1988). Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B streptococcus. *New Engl J Med*, 319:1180–5.
- Baker, J. R. e Pritchard, D. G. (2000). Action pattern and substrate specificity of the hyaluronan lyase from group B streptococci, *Biochl Journal*, 348:465–471.
- Baker, C.J, e Edwards, M.S. 2003. Group B streptococcal conjugate vaccines. *Arch Dis Child*, 88:375–378.
- Baker JA, Lewis EL, Byland LM, Bonakdar M, Randis TM, Ratner AJ. (2017). Mucosal vaccination promotes clearance of Streptococcus agalactiae vaginal colonization. *Vaccine*, 35: 1273-1280
- Bartoletti, R., Cai, T., Mondaini, N., Dinelli, N., Pinzi, N., Pavone, C., Naber, K. G. 2007. Prevalence, Incidence Estimation, Risk Factors and Characterization of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome in Urological Hospital Outpatients in Italy: Results of a Multicenter Case-Control Observational Study. *The JI of Urol*, 178:2411-2415.
- Berti, F., Campisi, E., Toniolo, C., Morelli, L., Crotti, S., Rosini, R., Margarit, I. 2014. Structure of the Type IX Group B *Streptococcus* Capsular Polysaccharide and Its Evolutionary Relationship with Types V and VII. *J of Biol Chem*, 248: 23437-23448.
- Betriu, C., Gomez, M., Sanchez, A., Cruceyra A., Romero, J. Picazo, J, J. 1994. Antibiotic Resistance and Penicillin Tolerance in Clinical Isolates of Group B Streptococci. *Ant Agents and Chemoth*, 38:, 2183-2186.

- Bianchi-Jassir F, Paul P, To K-N, Carreras-Abad C, Seale AC, Jauneikaite E., madhi, S, A., Russel, N, J., Hall, J., madrid, L., Bassat, Q., Kwatra, G., Doare, L, K., Lawn, J, E.,. Systematic review of Group B Streptococcal capsular types, sequence types and surface proteins as potential vaccine candidates. *Vaccine*. 2020;38:6682-94.
- Bishop, E. J., Shilton, C., Benedict, S., Kong, F., Gilbert, G. L., Gal, D., Currie, B. J. 2007. Necrotizing fasciitis in captive juvenile *Crocodylus porosus* caused by *Streptococcus agalactiae*: an outbreak and review of the animal and human literature. *Epid and Inf*, 135: 1248-1255
- Bizzini, A., & Greub, G. 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol and Inf*,16:1614-1619.
- Brimil, N., Barthell, E., Heindrichs U., . Kuhn, M., Luticken R., Spellerberg, B., 2006. Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. *International Journal of Medical Microbiology*, 296: 39-44.
- Bolukaoto, J. Y., Monyama C. M., Chukwu, M. O., Lekala S. M., Nchabeleng, M. R., Maphoshano, M., Maloba M. R. B., Mavenyengwa, R, T., Lebelo, S. L., Monokoane S. T., Tshepuwane C., Moyo, S. R., 2015. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa. *BmC Part of Springer nature*, 8: 364.
- Boonyayatra, Pata, S. P., Nakharuthai, P., Chaisri, W., 2016. Antimicrobial Resistance of Biofilm-Forming *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Mastitis. *J of Vete Sci & Technol*, 7: 374.
- Bobadilla, F. J., Novosak, M. G., Cortese, I. J., Delgado, O. D. e Laczeski, M. E. (2021). Prevalence, serotypes and virulence genes of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women with 35–37 weeks of gestation, *BMC Infectious Diseases*. *BMC Inf Dis*, 21:1–11.
- Botelho, AC N., Oliveira J. G., Damasco, A. P., . Santos, K. T., Ferreira, A. F., Rocha, G. T., Marinho,P, S., Bornia, R. B. G., Pinto, T. C. A., Fracalanza, S, E, L., Teixeira, L, M., 2018a. *Streptococcus agalactiae* carriage among pregnant women living in Rio de Janeiro, Brazil, over a period of eight years. *Plos One*, 13, :e0196925.
- Botelho, A. C., Ferreira, A. F., Fracalanza S. E. L., Teixeira L. M., Pinto, T. C., 2018b. A Perspective on the Potential Zoonotic Role of *Streptococcus agalactiae*: Searching for a Missing Link in Alternative Transmission Routes. *Front in Microbiol*, 9:608.
- Corrêa, A. B. A., Silva, L. G. da, Pinto, T. C. A., Oliveira, I. C. M., Fernandes, F. G., Costa, N. S. , Corrêa, M. M., Fracalanza, S. E. L., Benchetrit, L. C. 2011. The genetic diversity and phenotypic characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106: 1002-1006.
- Costa, N.S.; Rio-Tinto, A.; Pinto, I.B.F.; dos Santos Silva Alvim, D.C.; de Assis Rocha, A.; Oliveira, L.M.A.; Botelho, A.C.N.; Fracalanza, S.E.L.; Teixeira, L.M.; Rezende-Filho, J.; Marinho, P, S., Junior, J, A., Taylor, S., Thomas, S., Pinto, T, C, A. 2022 Changes in Group B Streptococcus Colonization among Pregnant Women before and after the Onset of the COVID-19 Pandemic in Brazil. *Pathogens* , 11:1104.
- CDC, Centers For Disease Control And Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. 2019.
- Chaiwarith, R., Jullaket, W., Bunchoo, M., Nuntachit, N., Sirisanthana, T., Supparatpinyo, K., 2011. *Streptococcus agalactiae* in adults at Chiang Mai University hospital: a retrospective study. *BMC Inf Dis*. 11, 149.
- Chaired by Jim O'Neill, 2014. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations, *The Review on Antimicrobial Resistance*, 14:742–750.
- Charalabopoulos, K., Karachalios, G., Baltogiannis, D., Charalabopoulos, A., Giannakopoulos, X., & Sofikitis, N. 2003. Penetration of Antimicrobial Agents into the Prostate. *Chemotherapy*, 49:269–279.
- Chen, S. L. (2019). Genomic insights into the distribution and evolution of group B Streptococcus, *Front in Microbiol* 10:1447.
- Cheng, W. N. e Han, S. G. 2020. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments. A review, *Asian-Australasian J of Ani Sci*, 33:1699–1713.

- Cho, Y.-T., Su, H., Wu, W.-J., Wu, D.-C., Hou, M.-F., Kuo, C.-H., & Shiea, J. 2015. Biomarker Characterization by MALDI-TOF/MS. *Adv. in Clin Chem.*, 209–254.
- Choi, Y. S., Kim, K. S., Choi, S. W., Kim, S., Bae, W. J., Cho, H. J., Lee, J. Y. 2013. Microbiological etiology of bacterial prostatitis in general hospital and primary care clinic in Korea. *Prostate International*, 1: 133-138.
- Cieslewicz M.J., Kasper D.L., Wang Y., Wessels M. R., 2000. Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci. *J of Biol Chem*, 276:139–146
- CLSI, 2022, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-Ed32, March 2022.
- Correa, AB A., Silva, L. G., Pinto, T. C., 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. *SciELO*. 106:, 1002-1006.
- Cools, P., Jaspers, V., Hardy, L., Crucitti, T., Delany-Moretlwe, S., Mwaura, M., Ndayisaba, G. F., van de Wijgert, J. H. H. M. e Vaneechoutte, M., 2016. A MultiCountry Cross-Sectional Study of Vaginal Carriage of Group B Streptococci (GBS) and *Escherichia coli* in Resource-Poor Settings: Prevalences and Risk Factors. *PloS One*, 11: 859–864.
- Contreras, G. A., Rodríguez, J. M., 2011. Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology. *J of Mammary Gland Biol and Neo*, 16:339–356.
- Cottell, E., Harrison, R. F., McCaffrey, M., Walsh, T., Mallon, E., & Barry-Kinsella, C. 2000. Are seminal fluid microorganisms of significance or merely contaminants?. *Fert and Steril*, 74: 465-470.
- Dairiki Shortliffe, L. M., R. G. Sellers, and J. Schachter. 1992. The Characterization of Nonbacterial Prostatitis: Search for an Etiology. *The J of Urol*, 148: 1461-1466.
- Ding, Y., Wang, Y., Hsia, Y., Russell, N., & Heath, P. T. 2020. Systematic Review and Meta-Analyses of Incidence for Group B Streptococcus Disease in Infants and Antimicrobial Resistance, China. *Emerging Infec Dis*, 26: 2651–2659.
- Dermer, P., Eggert, J., Few, B., Lee, C., 2004. A History of Neonatal Group B *Streptococcus* with Its Related Morbidity and Mortality Rates in the United States. *J of Pedi Nur*, 19: 357-363.
- Doare, K. L. e Heath, P. T. 2013. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine*, 31: 7-12.
- Dutra, V. G., V. M. Alves, A. N. Olendzki, C. A. Dias, A. F. Bastos, G. O. Santos, E. L. Amorin, Sousa M, AB., Santos, M., Ribeiro, P, CS., Fontes, C, F., Andrey, M., Magalhães, K., Araujo, A, A., Paffadore, L. F., Marconi, C., Murta, E. FC., Fernandes, P. C., Raddi, M. SG., Marinho, P. S., Bornia, R. BG., Palmeiro, J. K., Dalla-Costa, L. M., Pinto, T. CA., Botelho, A. C. N., Teixeira, L. M., Fracalanza, S. E. L., 2014. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *BMC Infec Dis*, 14: 323.
- Eisenberg, T., Rau, J., Westerhüs, U., Knauf-Witzens, T., Fawzy, A., Schlez, K., Ewers, C., 2017. *Streptococcus agalactiae* in elephants – A comparative study with isolates from human and zoo animal and livestock origin. *Vete Microbiol*, 204: 141-150.
- Elliott, J.A., Facklam, R. R., Richter, C.B. 1990. Whole-cell protein patterns os nonhemolytic group B, type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs and fish. *J of Clin. Microbiol*, 28: 628–630.
- Emanini, M., B. Khoramian, F. Jabalameli, S. Abani, and H. Dabiri. 2015. Comparison of virulence factors and capsular types of *Streptococcus agalactiae* isolated from human and bovine infections. *Microbial Pathogenesis*, 91: 1-4.
- Euzéby, J.P. 2021. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus Streptococcus. *International J of Systematic Bacteriol*.
- Farahani L., Tharakan T., Yap T., Ramsay J. W., Jayasena C. N., Minhas S., 2021. The semen microbiome and



- its impact on sperm function and male fertility: A systematic review and meta-analysis. *Andrology*, 9: 115-144.
- Falagas, M. E., Rosmarakis, E. S., Avramopoulos, I., Vakalis, N., 2006. *Streptococcus agalactiae* infections in non-pregnant adults: Single center experience of a growing clinical problem. *Medical Science Monitor*, 12: 2050-2060.
- Fraile, M. R., Spellerberg, B., 2017. Reliable Detection of Group B *Streptococcus* in the Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 55: 2590–2598.
- Fujita, Y., Mihara, T., Okazaki, T., Shitanaka, M., Kushino, R., Ikeda, C., Negishi, H., Liu, Z., Richards, J. S. e Shimada, M., 2011. Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis. *Human Reproduction*, 26: 2799–2806.
- Função, J. M., & Narchi, N. Z. 2013. Pesquisa do estreptococo do Grupo B em gestantes da Zona Leste de São Paulo. *Rev da Es de Enfer da USP*, 47: 22-9.
- Furfaro, L. L., Chang, B. J., Payne, M. S., 2018. Perinatal *Streptococcus agalactiae* Epidemiology and Surveillance Targets. *Clin Microbiol Reviews*, 31, e00049-18.
- Genovese, C.; D'Angeli, F.; Di Salvatore, V.; Tempera, G.; Nicolosi, D. 2020. *Streptococcus agalactiae* in pregnant women: Serotype and antimicrobial susceptibility patterns over five years in Eastern Sicily (Italy). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.*, 39: 2387–2396.
- Gizachew, M.; Tiruneh, M.; Moges, F.; Tessema, B. 2019. *Streptococcus agalactiae* maternal colonization, antibiotic resistance and serotype profiles in Africa: A meta-analysis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 18, 14
- Ghiorghi, Y. K., Mairey, E., Mallet, A., Duménil, G., Caliot, E., Trieu-Cuot, P., Dramsi, S., 2009. Dual Role for Pilus in Adherence to Epithelial Cells and Biofilm Formation in *Streptococcus agalactiae*. *Plos Pathogens*. 5, e1000422.
- Gibbs, R. S., Schrag, S., & Schuchat, A. 2004. Perinatal Infections Due to Group B Streptococci. *Obs & Gynecol*, 104: 1062-1076.
- Guo, D., Cao, X., Li, S., Ou, Q., Lin, D., Yao, Z., Chen, S., Wu, C., When, G., Ye, X. 2018. Neonatal colonization of group B *Streptococcus* in China: Prevalence, antimicrobial resistance, serotypes, and molecular characterization. *American J of Inf Control*, 46, e19–e24.
- Hardie, J. M. Whiley, R.A. 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J of Applied Microbiol*, 83:1S-11S.
- Hauge, M., C. Jespersgaard, and M. Kuluan. 1995. Population Structure of *Streptococcus agalactiae* Reveals an Association between Specific Evolutionary Lineages and Putative Virulence Factors but Not Disease. *Infec and Immu*, 64: 919–925.
- Hayes, K., O'Halloran, F. e Cotter, L. 2020. A review of antibiotic resistance in Group B Streptococcus: the story so far, *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor & Francis., 46: 253-269.
- Heath, P. T. 2016. Status of vaccine research and development of vaccines for GBS. *Vaccine*, 34:,2876–2879.
- Hirai, N.; Kasahara, K.; Nakano, R.; Ogawa, Y.; Suzuki, Y.; Ogawa, M.; Hishiya, N.; Nakano, A.; Ichimura, S.; Yano, H.; Yoshikawa, M. 2020. Clinical characteristics and molecular epidemiology of invasive *Streptococcus agalactiae* infections between 2007 and 2016 in Nara, Japan. *PLoS ONE*, 15, e0240590.
- Ho C. L. T., Vaughan-Constable D .R., Ramsay J., Jayasena C., Tharakan T., Yap T., Whiteman I., Graham N., Minhas S, Homa S. T. (2022). The relationship between genitourinary microorganisms and oxidative stress, sperm DNA fragmentation and semen parameters in infertile men. *Andrologia*, 54, e14322.
- Hynes, W. L., A. R. Dixon, S. L. Walton, and L. J. Aridgides. 2000. The extracellular hyaluronidase gene (hyla) of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiology Letters*, 184: 109-112.

- Hynes, W. L., Walton, S. L., 2000. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Letters*. 183: 201-207.
- Hwang, M. N., Ederer, G. M., 1975. Rapid Hippurate Hydrolysis Method for Presumptive Identification of Group B Streptococci. *J of Clin Microbiol*. 1: 14–5.
- Danielle L Ippolito, Wesley A James, Deborah Tinnemore, Raywin R Huang, Mary J Dehart, Julie Williams, Mark A Wingerd & Samandra T Demons. 2010. Group B streptococcus serotype prevalence in reproductive-age women at a tertiary care military medical center relative to global serotype distribution. *BMC Infec Dis*, 10: 336
- Jiang H, Chen M, Li T, Liu H, Gong Y, Li M. 2016. Molecular Characterization of *Streptococcus agalactiae* Causing Community- and Hospital-Acquired Infections in Shanghai, China. *Front Microbiol*. 7, 1308
- Jurgens, D., 1987. Unspecific binding of group B streptococcal cocytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. *J of Expe Medicine*, 165: 720 –732.
- Keefe, G.P. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Canad Vete Journal*, 38: 429–437.
- Kfourri, R. de Á., Pignatari, A. C. C., Kusano, E. J. U., Rocchetti, T. T., Fonseca, C. L., & Weckx, L. Y. 2021. Capsular genotype distribution of Group B Streptococcus colonization among at-risk pregnant women in Sao Paulo, Brazil. *The Brazilian J of Infec Dis*, 25: 1413-8670.
- Konto-Ghiorghi, Y., Mairey, E., Mallet, A., Duménil, G., Caliot, E., Trieu-Cuot, P., Dramsi, S., 2009. Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathogens*, 5, e1000422.
- Lancefield, R. C. 1933. A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. *J of Exp Medicine*, 57: 571-595.
- Lancefield, R. C., Hare, R., 1935. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. *J of Exp Medicine*, 61: 335–349.
- Landwehr-Kenzel, S. L., Henneke, p., 2014. Interaction of *Streptococcus agalactiae* and cellular innate immunity in colonization and disease. *Front in Immu*, 5, 519.
- Li, S. e Jedrzejewski, M. J. (2001). Hyaluronan Binding and Degradation by *Streptococcus agalactiae* Hyaluronate Lyase. *J of Biol Chem*, 276: 41407-16.
- Lin, S. M., Zhi, Y., Ahn, K. B., Lim, S. e Seo, H. S. (2018). Status of group B streptococcal vaccine development. *Clin and Exp Vaccine Research*, 7: 76–81.
- Lin, E., Zou, S., Wang, Y., Lee, C. C., Chiu, C. H. e Feng, Y. (2021). Phylogeny, recombination, and invasiveness of group B Streptococcus revealed by genomic comparisons of its global strains, *European J of Clin Microbiol & Infec Dis*, 40: 581–590.
- Lipsky, B. A., Byren, I., Hoey, C. T., 2010. Treatment of Bacterial Prostatitis. *Clin Infec Dis*. 50: 1641–1652.
- Ludwing, M. 2008. Diagnosis and therapy of acute prostatitis, epididymitis and orchitis. *Andrologia*. 40: 76–80.
- Malossini, G., Mirone, V., Johansen, T, E, B.,. 2018. Prostate calcifications: A case series supporting the microbial biofilm theory. *Invest and Clin Urol*, 59: 187-193
- Madhi, S. A., Cutland, C. L., Jose, L., Koen, A., Govender, N., Wittke, F., Olugbosi, M., Meulen, A. S., Baker, S., Dull, P. M., Narasimhan, V., Slobod, K. 2016. Safety and immunogenicity of an investigational maternal trivalent group B streptococcus vaccine in healthy women and their infants: a randomised phase 1b/2 trial. *The Lancet Infec Dis*, 16: 923–934.
- Maeland, J. A., Afset, J. E., Lyng, R. V., & Radtke, A., 2014. Survey of Immunological Features of the Alpha-Like Proteins of *Streptococcus agalactiae*. *Clin and Vaccine Immu*, 22: 153-9.

- Maisey, H. C., Doran, K. S., Nizet, V., 2008. Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert Reviews in Mol Medicine*, 10, e27.
- Manukumar, H.M., Umesha, S., 2017. MALDI-TOF-MS based identification and molecular characterization of food associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 7, 11414.
- Margarit I, Rinaudo CD, Galeotti CL, 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., Grandi, G., 2009. Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the group B *Streptococcus* paradigm. *J Infect Dis*. 199:108–115.
- Marín, M., Cercenado, E., Sánchez-Carrillo, C., Ruiz, A., Gómez González, Á., Rodríguez-Sánchez, B., & Bouza, E. 2017. Accurate Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from other Species within the *Streptococcus mitis* Group by Peak Analysis Using MALDI-TOF MS. *Front in Microbiol*, 8.
- Martinez-Gutierrez, F., Boegli, L., Agostinho, A., Sánchez, E., Bach, H., Ruiz, F., James, G., 2013. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 29: 651-660.
- MARTINS, E R; MELO-CRISTINO, J; RAMIREZ, M. 2012. Dominance of serotype Ia among group B *Streptococci* causing invasive infections in nonpregnant adults in Portugal. *J Clin Microbiol*. 50: 1219-27.
- Mazzoli, S. 2010. Biofilms in chronic bacterial prostatitis (NIH-II) and in prostatic calcifications. *Pathogens and Disease*, 59: 337–344.
- McGee, L.; Chochua, S.; Li, Z.; Mathis, S.; Rivers, J.; Metcalf, B.; Ryan, A.; Alden, N.; Farley, M.M.; Harisson, L.H.; Vagnone, P, S., Lynfield, R., Smelser, C., Muse, A., Thomas, A, R., Scharag, A., Beall, B, W. 2021. Multistate, Population-Based Distributions of Candidate Vaccine Targets, Clonal Complexes, and Resistance Features of Invasive Group B *Streptococci* Within the United States, 2015–2017. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 72: 1004–1013
- McCracken, G. H. 1973. Group B streptococci in neonatal infections. *The Journal of Pediatrics*, 82: 703-706.
- Mehik, A., Hellström, P., Lukkarinen, O., Sarpola, A., & Järvelin, M.-R. 2000. Epidemiology of prostatitis in Finnish men: a population-based cross-sectional study. *BJU Internatl*, 86: 443-448.
- Meares EM, Stamey TA. 1968. Bacteriologic localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis. *Invest Urol*, 5:492-518
- Metcalf, B. J., Chochua, S., Gertz, R. E., Hawkins, P. A., Ricaldi, J., Li, Z., Walker, H., Tran, T., Rivers, J., Mathis, S., Jackson, D., McGee, L., Beall, B., Glennen, A., Lynfield, R., Reingold, A., Brooks, S., Randel, H., Miller, L., White, B., Aragon, D., Barnes, M., Sadlowski, J., Petit, S., Carter, M., Marquez, C., Wilson, M., Farley, M., Thomas, S., Tunalı, A., Baughman, W., Harrison, L., Benton, J., Carter, T., Hollick, R., Holmes, K., Riner, A., Holtzman, C., Danila, R., MacInnes, K., Scherzinger, K., Angeles, K., Baretta, J., Butler, L., Khanlian, S., Mansmann, R., Nichols, M., Bennett, N., Zansky, S., Currenti, S., McGuire, S., Thomas, A., Schmidt, M., Thompson, J., Poissant, T., Schaffner, W., Barnes, B., Leib, K., Dyer, K., McKnight, L., Almendares, O., Hudson, J., McGlone, L., Whitney, C., Schrag, S. e Langley, G. (2017). Short-read whole genome sequencing for determination of antimicrobial resistance mechanisms and capsular serotypes of current invasive *Streptococcus agalactiae* recovered in the USA, *Clin Microbiol and Infec*, 23, e7-574.e14.
- Montes, L. R.Z, Meija A. A. S, Munarriz C. A. L, Gutierrez E. C. 2008. Semen and Urine Culture in the Diagnosis of Chronic Bacterial Prostatitis. *Clin Urol*, 34: 30-40.
- Motallebirad, T., Fazeli, H., Ghahiri, A., Shokri, D., Jalalifar, S., Moghim, S. e Esfahani, B. N. 2021. Prevalence, population structure, distribution of serotypes, pilus islands and resistance genes among erythromycin-resistant colonizing and invasive *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from pregnant and non-pregnant women in Isfahan, Iran, *BMC Microbiology*. *BMC Microbiol*, 21:, 1–11.
- Naber, K. G., Sörgel, F., 2003. Antibiotic therapy - rationale and evidence for optimal drug concentrations in prostatic and seminal fluid and in prostatic tissue. *Andrologia*, 35: 331-335

- Nizet, V., Gibson, R., Chi, E., Franson, P., Hulse, M., Rubens, C. 1996. Group B Streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect and Immunity*, 64: 3818-3826.
- Nizet, V. 2002. Streptococcal  $\alpha$ -hemolysis: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends Microbiol*, 10: 575-580.
- Nickel, J. C., & Moon, T., 2005. Chronic bacterial prostatitis: An evolving clinical enigma. *Urol*, 66: 2-8.
- Nobbs, A. H., Lamont, R. J., Jenkinson, H. F., 2009. *Streptococcus* Adherence and Colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73: 407-450.
- Noble, K., Lu, J., Guevara, M. A., Doster, R. S., Chambers, S. A., Rogers, L. M., Moore, R. E., Spicer, S. K., Eastman, A. J., Francis, J. D., Manning S. D., Rajagopal, L., Aronoff, D. M., Townsend, S. D., Gaddy, J. A. (2021). Group B Streptococcus cpsE Is Required for Serotype V Capsule Production and Aids in Biofilm Formation and Ascending Infection of the Reproductive Tract during Pregnancy. *ACS Infect. Dis*, 7: 2686–2696.
- Otaguiri, E.S., Morguette, A.E.B., Tavares, E. R., Santos, P. M. C., Morey, A. T., Cardoso, J. D., Perugini, M. R. R., Yamauchi L. M., Yamada-Ogatta, S. F., 2013. Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. *BMC Microbiol*, 13, 297.
- 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 LC, Wesels MR, Rodewald AK, Shroff AA, Jennings HJ, Kasper DL. 1994. Neonatal mouse protection against infection with multiple group B streptococcal (GBS) serotypes by maternal immunization with a tetravalent GBS polysaccharide-tetanus toxoid 439 conjugate vaccine. *Infect Immun* 62: 3236-43.
- Paoletti, L. C., Kasper, D. L., 2019. Surface Structures of Group B *Streptococcus* Important in Human Immunity. *Microbiol Spectrum*, 7.
- Pasternak, J. 2012. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. *Einstein*, 10: 118-119.
- Parida, R. e Samanta, L., 2017. In silico analysis of candidate proteins sharing homology with *Streptococcus agalactiae* proteins and their role in male infertility, *Systems Biology in Reproductive Medicine*. Taylor & Francis, 63, 15-28.
- 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 Microbiol*, 16, 86.
- Patras, K. A., & Nizet, V., 2018. Group B Streptococcal Maternal Colonization and Neonatal Disease: Molecular Mechanisms and Preventative Approaches. *Front in Pediatrics*, 6, 27.
- Paveenkittiporn, W., R. Ungcharoen, A. Kerdsin. 2020. *Streptococcus agalactiae* infections and clinical relevance in adults, Thailand. *Diag Microbiol and infec Dis*, 97: .0732-889.
- Phillips, E. A., Tapsall, J. W. e Smith, D. D. 1980. Rapid tube CAMP test for identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B), *J. Clin. Microbiol.*, 12: 135–137.
- Pinto, T. C. A., Costa, N. S., Souza, A. R. V., Silva, L. G. da, Corrêa, A. B. de A., Fernandes, F. G., Oliveira, I. C. M., Mattos, M. C., Rosado, A. S., 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. *Brazil J. of Infec. Diseases*, 17: 131-136.
- Pritchard, D.G., Gray, B. M., Dillon, H.C. Jr., 1984. Characterization of the group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 235( 2), 385-392.
- Purushottam M. D., Padmaja N., Pilli R. 2021. Role of Microbial Agents in Reproductive Health. *JK Science*. 23: 106-110.

- Raabe, Vanessa N., Shane, Andi L. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*), 2019. Microbiology Spectrum, 7, 1128.
- Rajagopal, L. 2009. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. Future Medicine, 4: 201-221.
- Ramakrishnan, K., and R. C. Salinas. 2010. Prostatitis: Acute and Chronic. Primary Care: clinics in office Practice, 37: 547-563.
- Roriz-filho, J. S., F. C. Vilar, L. M. Mota, C. L. Leal, PC B. Pisi. 2010. Infecção do trato urinário. Revista USP, 43, 118.
- Rinaudo, C. D., Rosini, R., Galeotti, C. L., Berti, F., Necchi, F., Reguzzi, V., ... Maione, D. (2010). Specific Involvement of Pilus Type 2a in Biofilm Formation in Group B Streptococcus. PLoS ONE, 5, e9216.
- Rizzo, M., Marchetti, F., Travaglini, F., Nickel, J. C., 2005. Clinical characterization of the prostatitis patient in Italy: a prospective urology outpatient study. World J of Urol, 23: 61–66.
- 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: 126-141.
- Rosini, R., Margarit, I., 2015. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. Front in Cell and Infec Microbiol, 5, 6.
- Rothen, J., Sapugahawatte, D. N., Li, C., Lo, N., Vogel, G., Foucault, F., Pfluger, V., Pothier, J. F., Blom, J., Daubenberger, C., Ip, M. 2020. A simple, rapid typing method for Streptococcus agalactiae based on ribosomal subunit proteins by MALDI-TOF MS. *Sci Rep* 10, 8788
- Ruegg, P. L. 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention, Journal of Dairy Science. Americ Dairy Sc Assoc, 100: 10381–10397.
- Rusz, A., A. Pilatz, F. Wagenlehner, T. Linn, Th Diemer, H. C. Schuppee, J. Lohmeyer, H. Hossain, Weidner, W., 2012. Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility. World J of Urol, 30: 23-30.
- Russell, N. J., Seale, A. C., O'Driscoll, M., O'Sullivan, C., Bianchi-Jassir, F., Gonzalez-Guarin, J. 2017. Maternal Colonization With Group B *Streptococcus* and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. Clin Infec Dis, 6:, 100-111.
- Shadbad, M. A., Kafil, H. S., Rezaee, M. A., Farzami, M. R., Dehkharghani, A. D., Sadeghi, J., Gholizadeh, P. e Aghazadeh, M. 2020a. Filament genes and biofilm formation in Streptococcus agalactiae, Reviews in Medical Microbiol, 31: 17–25.
- Shadbad MA, Kafil HS, Rezaee MA, Farzami MR, Dehkharghani AD, Sadeghi J, Gholizadeh P, Khodaei F, Aghazadeh M. 2020b. Streptococcus agalactiae clinical isolates in Northwest Iran: antibiotic susceptibility, molecular typing, and biofilm formation. GMS Hyg Infect Control. 29, 15.
- Seale, A. C., Bianchi-Jassir, F., Russell, N. J., Kohli-Lynch, M., Tann, C. J., Hall, J., Madrid, L., Blencowe, H., Cousens, S., Baker, C. J., Bartlet, L., Cutland, C., Gravet, M. G., Heath, P. T., Ip, M., Le Doare, K., Madh, S. A., Rubens, C. E., Saha, S. K., . Schrag, S. J., Meulen, A. S., Vekemans, J., Lawn, J. E. 2017. Estimates of the Burden of Group B Streptococcal Disease Worldwide for Pregnant Women, Stillbirths, and Children. Clin Infec Dis, 65: 200-219.
- Seo Y, Lee G. New bacterial infection in the prostate after transrectal prostate biopsy. J Korean Med Sci. 2018 Apr 23;33:e126.
- Seppala, B., Seppala, M., & Ainamo, J. 1993. A longitudinal study on insulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease. J. of Clin Period. 20: 161–165.

- Schrag, S. J., & 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.
- Shigehara, K., Miyagi, T., Nakashima, T., Shimamura, M., 2008. Acute bacterial prostatitis after transrectal prostate needle biopsy: clinical analysis. *J of Infec Chemoth*, 14: 40–43
- Shipitsyna E, Shalepo K, Zatsiorskaya S, Krysanova A, Razinkova M, Grigoriev A, Savicheva A. 2020. Significant shifts in the distribution of vaccine capsular polysaccharide types and rates of antimicrobial resistance of perinatal group B streptococci within the last decade in St. Petersburg, Russia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 39:1487-1493
- Siemens, N., Oehmcke-Hecht, S., Hoßmann, J., Skorcka, S. B., Nijhuis, R. H. T., Ruppen, C., Norrby-Teglund, A. 2019. Prothrombotic and Proinflammatory Activities of the  $\beta$ -Hemolytic Group B Streptococcal Pigment. *J of Innate Immu*, 12: 291-303.
- Simoni, S., Vincenzi, C., Brenciani, A., Morroni, G., Bagnarelli, P., Giovanetti, E., Varaldo, P, E., Mingoia, M. 2018. Molecular Characterization of Italian Isolates of Fluoroquinolone-Resistant *Streptococcus agalactiae* and Relationships with Chloramphenicol Resistance. *Microbial Drug Resistance*, 24: 225–231
- Skerk, V., S. Schonwald, I. Krhen, L. Markovinovic, A. Beus, N-S Kuzmanovic, V. Kruzic, and A. Vince. 2002. Aetiology of chronic prostatitis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19(6).
- Spellerberg, B. e Brandt, C. 2015. *Streptococcus*, in *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition, 383–402.
- Stamatiou, K., Pierris, N., 2017. Mounting resistance of uropathogens to antimicrobial agents: A retrospective study in patients with chronic bacterial prostatitis relapse. *Investig Clin Urol* 58: 271-280.
- Teixeira L. M., Pinto T. CA., Merquior VLC. 2015. *Streptococcus*, *Enterococcus* e gêneros relacionados. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editores. *Microbiol*, 195-199.
- Tong, J., Zhang, H., Zhang, Y., Xiong, B. e Jiang, L. 2019. Microbiome and Metabolome Analyses of Milk From Dairy Cows With Subclinical *Streptococcus agalactiae* Mastitis—Potential Biomarkers, *Front in Microbiol*, 10: 1–14.
- Tsunemori, H., Sugimoto, M. 2021. Effects of inflammatory prostatitis on the development and progression of benign prostatic hyperplasia: A literature review.
- Voroshilina ES, Zornikov DL, Panacheva EA. 2019. Evaluation of the ejaculate microbiota by real-time PCR and culture-based technique. *Bulletin of RSMU*. 1: 41–5.
- Vaz, M. J., Purrier, S. A., Bonakdar, M., Chamby, A. B., Ratner, A. J., & Randis, T. M. 2020. The impact of circulating antibody on Group B *Streptococcus* intestinal colonization and invasive disease. *Infec and Immu*.
- Vornhagen, J., Adams Waldorf, K. M. e Rajagopal, L., 2017. Perinatal Group B Streptococcal Infections: Virulence Factors, Immunity, and Prevention Strategies, *Trends in Microbiology*. Elsevier, 25: 919-931.
- Wagenlehner, F. M. E., Diemer, T., Naber, K. G., & Weidner, W., 2008. Chronic bacterial prostatitis (NIH type II): diagnosis, therapy and influence on the fertility status. *Andrologia*, 40: 100-104.
- Waitkins, S. A. 1980. Evaluation of rapid methods of identifying group B streptococci, *J. Clin. Pathol*, 33: 302–305.
- Watkins, F. ;, K., L., McGee, L., Schrag, S. J., Beall, B., Jain, J. H., Pondo, T., Farley, M. M., Harrison, L. H., Zansky, S. M., Baumbach, J., Lynfield, R., Snippes Vagnone, P., Miller, L. A., Schaffner, W., Thomas, A. R., Watt, J. P., Petit, S. e Langley, G. E. 2019. Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Infections among Nonpregnant Adults in the United States, 2008-2016, *JAMA Internal Medicine*, 179: 479–488.

Wehbeh, W., R. Rojas-Diaz, X. Li, N. Mariano, L. Grenner, S. Segal-Maurer, B. Tommasulo, K. Drlica, Curban., J. Jamens. 2005. Fluoroquinolone-Resistant *Streptococcus agalactiae*: Epidemiology and Mechanism of Resistance. *J of Clin Microbiol*, 49: 2495–2497.

Weidner, W., W. Krause, and M. Ludwig. 1999. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Human reproduction update*, 5: 421-432.

Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. e Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review), *Applied Microbiol and Biotechn*, 93: 965– 974.

Wessels, M.R., Rubens, C.E., Benedi, V-J, Kasper, D.L., 1989. Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. *Procee of the Nat Acad of Sci*, 86:, 8983–8987.

Yang, L. D., Bian, W. W., Sun, L. Z. 2019. Colonization of group B streptococcus in the semen of chronic prostatitis patients of childbearing age and its influence on perinatal outcomes. *Nat J of Androl*, 25: 1102-1105.

Yoon, I. A., Jo, D. S., Cho, E. Y., Choi, E. H., Lee, H. J., & Lee, H. 2015. Clinical significance of serotype V among infants with invasive group B streptococcal infections in South Korea. *Internat J of Infec Dis*, 38: 136–140.

Xiong, S., Liu, X., Deng, W., Zhou, Z., Li, Y., Tu, Y., Chen, L., Wang, G., Fu, B., 2020. Pharmacological Interventions for Bacterial Prostatitis. *Front. Pharmacol.* 11:504.

Zhu, Y.; Wu, J.; Zheng, X.; Chen, L.; He, M.; Ma, S.; Lin, Y.; Lin, X.; Chen, C. 2020. Identification of Group B *Streptococcus* Serotypes and Genotypes in Late Pregnant Women and Neonates That Are Associated with Neonatal Early-Onset Infection in a South China Population. *Front. Pediatr.* 8, 265

## Anexo 1

Dados das amostras de *Streptococcus agalactiae* isoladas de espermocultura de pacientes com suspeita de PBC.

Amostr ras	Ano de isolamento	Idade	Sorotipo	Pen	Tet	Va	Le	Clin	Eri *	Fenótipo	Presença de pilus	Produção de biofilme
13179	2019	45	Ib	S	R	S	S	S	S		PI-2a	Forte
13877	2019	36	III	S	R	S	S	S	S		PI-2a	Fraco
13971	2019	44	V	S	R	S	S	S	S		PI-1	Forte
13972	2019	41	V	S	R	S	S	R	S	L	PI-2a	Moderado
13973	2019	26	Ia	S	R	S	S	S	S		PI-1	Forte
13975	2019	22	Ia	S	R	S	S	S	S		PI-2a	Forte
13977	2019	33	II	S	R	S	S	S	I	M	PI-1 + PI-2a	Forte
13979	2019	44	Ib	S	R	S	S	S	R	M	PI-2a	Moderado
14032	2019	47	III	S	R	S	S	S	I	M	PI-2a	Fraco
14033	2019	45	V	S	R	S	S	S	S		PI-1 + PI-2a	Forte
14045	2019	23	III	S	R	S	S	S	S		PI-1 + PI-2a	Moderado
14049	2019	44	IV	S	S	S	S	S	S		PI-2a	Forte
14050	2019	44	II	S	R	S	S	S	S		PI-1 + PI-2a	Fraco
14051	2019	48	V	S	R	S	R	R	R	i MLS <sub>B</sub>	PI-1 + PI-2a	Forte
14085	2019	44	V	S	R	S	S	S	S		PI-2a	Forte
14086	2019	22	Ia	S	S	S	S	S	I	M	PI-1 + PI-2a	Moderado
14099	2019	30	Ib	S	R	S	S	S	S		PI-2a	Forte
14100	2019	34	Ib	S	R	S	S	S	I	M	PI-1 + PI-2a	Forte
14151	2019	37	V	S	R	S	R	R	R	i MLS <sub>B</sub>	PI-2a	Forte
14153	2019	59	Ib	S	R	S	S	S	I	M	PI-2a	Fraco
14154	2019	39	V	S	R	S	R	R	R	i MLS <sub>B</sub>	PI-1 + PI-2a	Fraco
14179	2019	39	Ib	S	R	S	S	S	R	M	PI-2a	Não formador
14180	2019	39	III	S	R	S	S	S	I	M	PI-1 + PI-2b	Fraco
14426	2022	34	V	S	S	S	S	S	I	M	PI-1 + PI-2a	Forte
14435	2022	36	Ia	S	R	S	S	S	S		PI-2a	Forte
14436	2022	40	IV	S	S	S	S	S	S		PI-2b	Forte
14437	2022	33	V	S	R	S	S	R	R	c MLS <sub>B</sub>	PI-2a	Forte
14438	2022	49	NT	S	R	S	S	R	R	c MLS <sub>B</sub>	PI-2a	Forte



14439	2022	33	IV	S	S	S	S	S	I	M	PI-2b	Forte
14440	2022	40	IV	S	S	S	S	S	S		PI-2a +PI-2b	Forte
14467	2022	35	V	S	R	S	S	S	S		PI-2a	Forte
14468	2022	36	IV	S	R	S	S	S	I	M	PI-2a	Forte
14469	2022	48	IV	S	S	S	S	S	S		PI-1+PI-2b	Forte
14476	2022	36	V	S	S	S	S	S	S		PI-2a	Fraco
14477	2022	44	IV	S	R	S	S	S	I	M	PI-1 + PI-2a+ PI-2b	Fraco
14478	2022	48	V	S	R	S	R	R	R	i MLS <sub>B</sub>	PI-1 + PI-2a	Fraco
14479	2022	54	NT	S	R	S	S	S	R	M	PI-2a	Moderado
14480	2022	33	Ia	S	R	S	S	S	I	M	PI-2a	Forte
14489	2022	41	Ia	S	R	S	S	S	S		PI-1 + PI-2a	Moderado
14490	2022	56	V	S	R	S	S	S	S		PI-2a	Moderado
14491	2022	33	Ia	S	R	S	S	S	S		PI-2a +PI-2b	Fraco
14501	2022	65	Ia	S	R	S	S	S	S		PI-2a	Forte
14502	2022	32	V	S	R	S	S	R	R	i MLS <sub>B</sub>	PI-1 + PI-2a	Forte
14503	2022	45	Ib	S	R	S	S	S	S		PI-1 + PI-2a	Forte
14504	2022	23	Ia	S	R	S	S	S	S		PI-2a	Forte
14505	2022	56	III	S	R	S	S	S	S		PI-2a	Não formador
14506	2022	34	Ia	S	R	S	S	S	R	M	PI-2a	Forte
14507	2022	47	NT	S	R	S	S	S	S		PI-1 + PI-2a	Forte
14508	2022	35	Ia	S	S	S	S	S	S		PI-2a	Não formador

\*S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente.