

Priscila Soares de Oliveira

*Streptococcus agalactiae*: caracterização fenotípica de amostras isoladas de gestantes em uma unidade hospitalar na cidade do Rio de Janeiro



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

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
DEZEMBRO/2022

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

## CIP - Catalogação na Publicação

O48s Oliveira, Priscila Soares de  
Streptococcus agalactiae: caracterização  
fenotípica de amostras isoladas de gestantes em uma  
unidade hospitalar na cidade do Rio de Janeiro /  
Priscila Soares de Oliveira. -- Rio de Janeiro,  
2022.  
44 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  
fenotípica. 3. Gestantes. I. Fracalanza, Sergio  
Eduardo Longo, orient. II. Granato, Natália Silva  
da Costa, 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.

**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: **Priscila Soares de Oliveira**

DRE: 117093031

BANCA EXAMINADORA: Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho (Presidente)  
Profa. Karla Rodrigues Miranda  
Profa. Joana Montezano Marques  
Dra. Andrea de Andrade Rangel de Freitas (Suplente)

Título da Monografia: **“*Streptococcus agalactiae*: Caracterização fenotípica de amostras isoladas de gestantes em uma unidade hospitalar na cidade do Rio de Janeiro”**

Local: Sala virtual <http://meet.google.com/jhp-ocks-uhq>

Data e hora de início: **13 de dezembro de 2022 às 10:00h**



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

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
8,5	Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho
8,5	Profa. Karla Rodrigues Miranda
8,5	Profa. Joana Montezano Marques
	Dra. Andrea de Andrade Rangel de Freitas

Presidente da banca \_\_\_\_\_   
Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Aluno: \_\_\_\_\_   
Priscila Soares de Oliveira

Orientador: \_\_\_\_\_  /   
Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza / Coorientador: Dra. Natália Silva da Costa Granato

Coordenador de TCC \_\_\_\_\_   
Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

*Dedico este trabalho aos meus avós, Jorge e Jacira.  
Muito obrigada por todo o amor, apoio e incentivo.  
Saibam que são os melhores avós do mundo!  
Amo vocês.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Ubiracy e Miriam, por tudo que fizeram por mim até hoje. Sou muito grata por todas as broncas, conselhos e orientações para a vida. Esse trabalho não existiria e eu não seria a pessoa que me tornei hoje sem vocês. Eu os amo demais.

Aos meus avós, Jorge e Jacira, por todo o interesse e incentivo à minha vida estudantil e por serem tão participativos na minha vida. Cada palavra de vocês me encorajou cada vez mais a continuar. Obrigada pelas conversas, amor e carinho. Vocês são incríveis. Os amo muito.

À minha irmã Miriely, apesar de ser chata e adorar me perturbar (cumprindo seu papel como irmã mais nova), agradeço por sempre me ajudar e apoiar em tudo que preciso. Obrigada por me descontraír em momentos de tensão (principalmente me convidando para assistir animes, tu sabe muito!) e por palavras tão sábias nos momentos em que necessitei disto. Mesmo sendo tão diferentes a gente se entende e eu aprendi a te amar. Muito obrigada por tudo!

À minha tia Ester, obrigada por ter me apoiado tanto durante meus anos de ensino médio. A senhora foi fundamental para a minha entrada na universidade. Sou muito grata.

À minha tia Léia, por toda a alegria e animação quando recebeu a notícia que eu tinha passado para a UFRJ. Eu estava muito preocupada em como lidaria com a vida universitária, e seu apoio foi fundamental para que eu conseguisse lidar com o início do curso e com isso ter chegado até aqui. Obrigada!

Ao prof. Sergio por ter me ensinado tanto. Não só sobre microbiologia, mas também sobre a vida. Sou muito grata pelo apoio, dedicação e tantos conselhos. Os levarei para a vida. Agradeço por ser tão compreensivo e paciente, sempre disposto a ajudar. Muito obrigada.

À Natália e Carol, minhas coorientadoras, pela paciência e todos os ensinamentos dados. Vocês foram muito importantes para o acontecimento deste trabalho.

À prof<sup>a</sup>. Tatiana Pinto por ter cedido o espaço do seu laboratório para que eu realizasse os experimentos presentes neste trabalho.

Aos amigos que a vida me deu (em ordem alfabética, sem briga) Bianca, Luis e (minha xará) Priscilla. Vocês são parceiros demais. Obrigada por me ouvirem quando precisei desabafar, pelos conselhos, por me distraírem nos momentos de estresse e por serem tão especiais na minha vida. Vocês fizeram toda a diferença para que eu chegasse aqui, cada um à sua maneira. Contem comigo para o que precisarem. Vocês são brabos!

Aos membros da banca avaliadora, Bernadete, Karla, Joana e Andrea. Obrigada pela disposição do seu tempo e conhecimento para avaliar este trabalho e torná-lo melhor.

Às pacientes que aceitaram participar deste estudo. Vocês foram fundamentais para que essa monografia acontecesse.

A todos que direta e indiretamente ajudaram de alguma forma neste projeto.

*“Se formos enganados por muito tempo, a nossa tendência é rejeitar qualquer evidência do logro. Já não nos interessamos em descobrir a verdade. O engano nos aprisionou”*

**Carl Sagan**

**viii**



## RESUMO

PRISCILA SOARES DE OLIVEIRA

### ***Streptococcus agalactiae*: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE AMOSTRAS ISOLADAS DE GESTANTES EM UMA UNIDADE HOSPITALAR NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO**

**Orientador: Sergio Eduardo Longo Fracalanza**

**Coorientadora: 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* (GBS - “Group B Streptococcus”) é um importante patógeno responsável por sérias infecções em humanos, tanto em neonatos como em adultos não gestantes e indivíduos idosos e/ou imunocomprometidos. Apesar de ainda ser altamente sensível à penicilina, em indivíduos alérgicos deve-se utilizar outras classes de antimicrobianos. Nas últimas décadas, têm-se observado uma crescente resistência aos antimicrobianos de segunda escolha, como macrolídeos e clindamicina. O objetivo deste estudo foi caracterizar por métodos fenotípicos as amostras de GBS isoladas de gestantes (35<sup>a</sup>-37<sup>a</sup> semana), residentes na região metropolitana do Rio de Janeiro, e atendidas durante o pré-natal na Maternidade Escola da UFRJ. O espécime clínico combinado (vaginal + anal) foi coletado com *swab*, colocado em meio de transporte e manutenção de Amies, refrigerado e enviado até o laboratório. Em seguida, uma alíquota (50 µL) foi semeada em caldo Todd-Hewitt (THB) contendo 8µg/mL de gentamicina e 15µg/mL de ácido nalidíxico, com o intuito de favorecer a seleção de *S. agalactiae*. Os meios foram incubados por 24h a 35°C, e, então, as culturas foram semeadas em placas contendo ágar caseína de soja acrescido de 5% de sangue de carneiro (ágar sangue) e em ágar cromogênico, e incubadas a 35°C por 24h. A presença de colônias com características de estreptococos circundadas por uma zona de beta-hemólise em ágar sangue foram consideradas suspeitas da presença de *S. agalactiae*. Em ágar cromogênico, as colônias de cor rosa foram consideradas como suspeitas de GBS. Todas as colônias suspeitas foram isoladas e identificadas por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS). Em seguida, todas as culturas foram estocadas por a -20°C em caldo BHI com 20% de glicerol. Para a caracterização fenotípica convencional, as amostras suspeitas de GBS foram submetidas à coloração de Gram e aos testes de produção do fator CAMP e hidrólise do hipurato. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinado por disco difusão, de acordo com o CLSI e a determinação do tipo capsular foi realizada por aglutinação em lâmina. Dentre as 1270 gestantes analisadas no período compreendido entre janeiro/2019 à junho/2022, 106 (8,3%) foram identificadas como positivas para presença de *S. agalactiae*. Os tipos sorológicos predominantes foram: Ia (34%), V (19,8%), II (17,9%) e III (14,1%). A determinação

do perfil de resistência aos antimicrobianos mostrou que as amostras apresentaram sensibilidade uniforme aos antimicrobianos: penicilina, levofloxacina e vancomicina e níveis de resistência variáveis para clindamicina (7%), eritromicina (18%) e tetraciclina (84%). Esses dados ressaltam a importância da pesquisa da colonização por GBS e a sua caracterização em gestantes para orientar os clínicos quanto a possíveis medidas profiláticas e terapêuticas para a gestante e para os neonatos.

**Palavras-chave:** *Streptococcus agalactiae*, caracterização fenotípica, gestantes.

## ABSTRACT

PRISCILA SOARES DE OLIVEIRA

### ***Streptococcus agalactiae*: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE AMOSTRAS ISOLADAS DE GESTANTES EM UMA UNIDADE HOSPITALAR NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO**

**Orientador: Sergio Eduardo Longo Fracalanza**

**Coorientador: 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* (GBS) is an important pathogen responsible for serious infections in humans, both in newborns and non-pregnant adults and in elderly and/or immunocompromised individuals. Although it is still highly sensitive to penicillin, other classes of antimicrobials should be used in allergic individuals. In recent decades, increasing resistance to second-choice antimicrobials, such as macrolides and clindamycin, has been observed. The aim of this study was to characterize by phenotypic methods the GBS samples isolated from pregnant women (35th-37th week), residing in the metropolitan region of Rio de Janeiro, and seen during prenatal care at the UFRJ Maternity School. The combined clinical specimen (vaginal + anal) was collected with a swab, placed in Amies transport and maintenance medium, refrigerated and sent to the laboratory. Then, an aliquot (50  $\mu$ L) was seeded in Todd-Hewitt broth (THB) containing 8 $\mu$ g/mL gentamicin and 15 $\mu$ g/mL nalidixic acid, in order to favor the selection of *S. agalactiae*. The media were incubated for 24h at 35°C, and then the cultures were seeded on plates containing soybean casein agar plus 5% sheep blood (blood agar) and chromogenic agar, and incubated at 35°C for 24h. The presence of colonies with streptococcal characteristics surrounded by a characteristic beta-hemolysis zone on blood agar was considered suspicious for the presence of *S. agalactiae*. On chromogenic agar, pink colonies were also considered suspicious for GBS. These colonies were isolated and identified by matrix-assisted laser ionization desorption mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Then, all cultures were stored by freezing at -20°C in BHI broth with 20% glycerol. For conventional phenotypic characterization, suspected GBS samples were subjected to GRAM staining and tests for CAMP factor production and hypurate hydrolysis. The antimicrobial susceptibility profile was determined by disc diffusion, according to the CLSI, and the capsule type determination was performed by slide agglutination. Among the 1270 pregnant women analyzed from January/2019 to June/2022, 106 (8.3%) were identified as positive for the presence of *Streptococcus agalactiae*. The serologic types predominant were Ia (34%), V (19.8%), II (17.9%) and III (14.1%). The determination of

the antimicrobial resistance profile showed that the strains showed uniform sensitivity to the

antimicrobials penicillin, levofloxacin, vancomycin and variable levels of resistance to clindamycin (7%), erythromycin (18%) and tetracycline (84%). These data highlight the importance of GBS colonization research and its characterization in pregnant women to guide clinicians regarding possible prophylactic and therapeutic measures for the pregnant woman and newborns.

**Keywords:** *Streptococcus agalactiae*, phenotypic characterization, pregnant women.

## RESUMO PARA LEIGOS

PRISCILA SOARES DE OLIVEIRA

### ***STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE AMOSTRAS ISOLADAS DE GESTANTES EM UMA UNIDADE HOSPITALAR NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO**

**Orientador: Sergio Eduardo Longo Fracalanza**

**Coorientador: Natália Silva da Costa Granato**

**Resumo para leigos 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* (GBS) é uma bactéria que pode causar diversas doenças em humanos de qualquer idade, desde recém-nascidos a idosos e/ou pessoas com baixa imunidade. Em recém-nascidos, pode causar meningite, infecção sanguínea e em alguns casos, óbito. Em adultos não gestantes, infecção urinária e pneumonia. Apesar de ainda ser altamente sensível à penicilina, em indivíduos alérgicos devem-se utilizar outros tipos de antibióticos. Nas últimas décadas, têm-se observado um aumento na resistência aos antibióticos de segunda escolha, como eritromicina e clindamicina. O objetivo deste estudo foi caracterizar *Streptococcus agalactiae* em amostras de gestantes (35<sup>a</sup>-37<sup>a</sup> semana) residentes na região metropolitana do Rio de Janeiro, e atendidas durante o pré-natal na Maternidade Escola da UFRJ. Para o estudo, um cotonete (*swab*) foi inserido primeiro no canal vaginal e em seguida na região anal a fim de coletar secreção para análise. Esse cotonete foi levado ao laboratório acondicionado em um líquido conservante e refrigerado. No laboratório as amostras passaram primeiramente por testes para identificar a presença de GBS. Após, outros testes foram aplicados com o objetivo de se observar características destas bactérias, como resistência a antibióticos. Os dados obtidos ao final do estudo ressaltaram a importância do teste do *swab* em gestantes para orientar os clínicos quanto a possíveis medidas de prevenção para evitar a infecção de recém-nascidos.

**Palavras-chave:** *Streptococcus agalactiae*, caracterização fenotípica, gestantes.

## ÍNDICE

<b>Resumo</b> .....	ix
<b>Abstract</b> .....	xi
<b>Resumo para leigos</b> .....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Características gerais de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	1
1.2 Atributos de virulência em GBS.....	2
1.3 Infecções causadas por GBS em humanos.....	4
1.4 Distribuição dos sorotipos.....	6
1.5 Profilaxia Intraparto e resistência aos antimicrobianos.....	7
1.6 Importância do diagnóstico laboratorial na gestação.....	9
1.7 Vacinas para <i>S. agalactiae</i> .....	10
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	11
<b>3 OBJETIVO</b> .....	12
3.1 Objetivo geral.....	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	13
4.1 População incluída no estudo.....	13
4.2 Coleta, processamento e estoque dos espécimes clínicos.....	13
4.3 Identificação fenotípica das amostras bacterianas.....	13
4.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	15
4.5 Determinação do tipo capsular.....	16

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
5.1 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	17
5.2 Determinação dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	18
5.3 Determinação dos tipos capsulares de GBS.....	20
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>26</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Características gerais de *Streptococcus agalactiae*

O gênero *Streptococcus* inclui diversas espécies descritas como cocos gram-positivos, imóveis, não esporulados, catalase-negativos, dispostos aos pares ou em cadeias, e pertencentes ao filo *Firmicutes*, ordem *Lactobacillales* e família *Streptococcaceae* (Póntigo, Moraga e Flores, 2015). Os estreptococos são nutricionalmente exigentes, necessitando do uso de meios de cultura enriquecidos com 5% de sangue de carneiro para o seu cultivo, o que também possibilita a sua categorização de acordo com os padrões de hemólise observados ao redor das colônias quando cultivados nesse meio. Assim, quando ocorre hemólise parcial são classificados como  $\alpha$ -hemolíticos, quando a lise dos eritrócitos é completa são denominados  $\beta$ -hemolíticos e quando não ocorre hemólise, são  $\gamma$ - ou não hemolíticos. Ainda, de acordo com a especificidade antigênica do carboidrato C, um polissacarídeo presente na parede celular, os estreptococos podem ser distribuídos em 20 grupos (A-H e K-V), segundo a classificação de Lancefield. A detecção do antígeno de grupo B, através da reação com antissoro específico, serve de base para a sua denominação frequente como estreptococos do grupo B (EGB) ou GBS (sigla derivada do inglês, *Group B Streptococcus*) (Lancefield, 1933; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2020).

A espécie *Streptococcus agalactiae* foi descrita em 1887 como um patógeno responsável por quadros de mastite bovina (Deb *et al.*, 2013), sendo sua circulação entre os seres humanos reconhecida somente a partir da década de 1930 (Fry, 1938). Entre os anos 1960 e 1970, a espécie emergiu como uma das principais fontes de morbidade e mortalidade no período neonatal (Eickhoff *et al.*, 1964; McCracken, 1973). Desde os anos 90, entretanto, *S. agalactiae* vem se destacando também como uma causa importante de infecções invasivas em adultos não gestantes (Muñoz *et al.*, 1997).

Os microrganismos pertencentes à espécie *S. agalactiae* são encontrados em membranas mucosas, incluindo sítios como o trato gastrointestinal e geniturinário de seres humanos (Hardie & Whiley, 1997; Le Doare & Heath, 2013). Apesar da possibilidade de estabelecimento de uma relação comensal, estes microrganismos podem causar quadros infecciosos quando introduzidos em sítios normalmente estéreis de hospedeiros saudáveis ou em pacientes com algum tipo de condição debilitante. A ocorrência de quadros infecciosos está relacionada com produtos ou



estruturas que são considerados fatores de virulência, entre os quais estão incluídos  $\beta$ -hemolisina, fator CAMP, parede celular, cápsula polissacarídica, proteínas de superfície celular e enzimas (Noobs, Lamont & Jenkinson, 2009).

A presença de cápsula polissacarídica com composição variável é a base para a classificação sorológica das amostras desta espécie (Lancefield, 1934), sendo esta amplamente empregada como marcador em estudos epidemiológicos e de patogenicidade. Portanto, os polissacarídeos capsulares vêm sendo considerados os principais alvos para a elaboração de vacinas contra *S. agalactiae* (WHO, 2021). Atualmente, dez diferentes sorotipos são reconhecidos, incluindo Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX (Chen, Avci & Kasper, 2013).

## 1.2 Atributos de virulência em *Streptococcus agalactiae*

*S. agalactiae* possui diversos fatores de virulência que influenciam na sua eficiência de colonização e invasão aos tecidos do hospedeiro (Rajagopal *et al.*, 2009). A cápsula é considerada o principal fator de virulência devido à sua função antifagocítica. Atua de forma a inibir a ativação do sistema complemento evitando, portanto, a deposição dos fragmentos opsonizantes C3b na superfície microbiana (Rajagopal *et al.*, 2009). Os tipos sorológicos de GBS podem ser classificados levando-se em conta a variação química (ácido N-acetilneuramínico, N-acetilglicosamina, galactose e glicose) e imunológica dos polissacarídeos da cápsula (Lancefield, 1934; Cieslewicz *et al.*, 2005). Dez sorotipos são conhecidos atualmente (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX) (Wessels & Kasper, 2000; Slotved *et al.*, 2007; Chen, Avci & Kasper, 2013), e alterações antigênicas podem ocorrer devido a recombinação no operon responsável pela sua codificação. Essa transferência horizontal de genes pode levar à alteração do sorotipo capsular, fenômeno conhecido como *switching* capsular (Cieslewicz *et al.*, 2005). Devido a sua importância, o desenvolvimento de vacinas contra GBS tem como alvo principal os polissacarídeos capsulares.

Além da cápsula, algumas proteínas de superfície também contribuem para a virulência de *S. agalactiae* por estarem tanto associadas com a interação com as células do hospedeiro, quanto com a capacidade de evasão do sistema imunológico. A proteína alfa, a qual faz parte da família de proteínas ALP (*alpha-like proteins*), tem seu papel nos mecanismos de patogenicidade ainda pouco conhecido, estando geralmente associada a cepas dos sorotipos Ia, Ib e II. Já a proteína beta está associada principalmente ao sorotipo Ib (Paolletti e Kasper, 2017). Outras proteínas

pertencentes à família ALP e encontradas em GBS são Ca, Alp1, Alp2, Alp3, Rib e Alp4. Estas proteínas têm como características moleculares repetições em tandem e genes mosaicos. Essas proteínas variam entre as amostras de GBS de acordo com o número de repetições gênicas. A proteína Ca pode sofrer deleções como estratégia de evasão do sistema imune (Creti *et al.*, 2004). Já as proteínas ligadoras de fibrinogênio (FBPs) e a proteína ligadora de laminina (Lmb) estão relacionadas à aderência e à invasão do microrganismo no tecido hospedeiro (Noobs, Lamont & Jenkinson, 2009).

Estudos recentes demonstraram a ocorrência de apêndices de superfície celular (pili) em aproximadamente 94% das amostras de *S. agalactiae*. Essas estruturas são um importante fator de virulência, pois estão envolvidas com a adesão da bactéria às células hospedeiras, e com a formação de biofilmes, além de conferir maior resistência a fagócitos e peptídeos antimicrobianos (Rosini & Marguerit, 2015). As proteínas denominadas sortases tipo C (StrC3 e StrC4) têm papel na montagem do pilus, promovendo a união e organização das subunidades proteicas (PilA, PilB e PilC) através da polimerização. O processo é realizado por meio de ligações covalentes entre as sortases e as subunidades proteicas. PilA é responsável pela adesão à célula hospedeira, PilB é a subunidade mais abundante e PilC é localizada na base do pilus e é a menor subunidade (Dramsi, TrieuCuot e Bierne, 2005; Lauer *et al.*, 2005; Dramsi *et al.*, 2006; Maisey *et al.*, 2007; Maresso e Schneewind, 2008; Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009; Rajagopal, 2009). Até o momento são descritas três principais variantes de pili: PI-1, PI2a e PI-2b (Rosini & Margarit, 2015; Armistead *et al.*, 2019).

A enzima C5a peptidase possibilita a clivagem do fator C5a do sistema complemento, o qual é responsável pelo recrutamento de neutrófilos ao sítio de infecção (Hebert, Beveridge & Saunders, 2004). A hialuronidase tem ação hidrolítica sobre o ácido hialurônico presente na matriz extracelular de tecidos animais, possibilitando a disseminação do microrganismo (Paolletti & Kasper, 2017).

O fator CAMP também contribui para a invasão do microrganismo. Esta proteína tem a capacidade de formar poros na membrana das células do hospedeiro, levando-as à lise (Spellerberg *et al.*, 1999). Já a hemolisina é a enzima responsável pela ação beta-hemolítica de *S. agalactiae* e pode ser associada a infecção pulmonar, por contribuir para a penetração através das barreiras epiteliais e pulmonares (Noobs, Lamont & Jenkinson, 2009).

O ácido lipopotéico é outro fator de virulência que auxilia na aderência de GBS à célula hospedeira. O ácido lipopotéico tem importância na patogênese da meningite, como evidenciado através do teste *in vitro* de invasão de células imortalizadas de endotélio microvascular cerebral humanas (hBMEC). E também pode estar envolvido em casos de sepse neonatal, possibilitando a colonização e invasão de tecidos profundos (Ginsburg, 2002; Doran & Nizet, 2004).

O pigmento carotenóide compensa a ausência de catalase em GBS, pois tem ação antioxidante, auxilia *S. agalactiae* a não ser fagocitado e oferece resistência à ação do peróxido de hidrogênio. Macrófagos e neutrófilos possuem um “*burst*” oxidativo e com isso há a produção de hipoclorito, peróxido de hidrogênio e ânion superóxido. O pigmento protege a bactéria contra a ação nociva destes componentes (Liu *et al.*, 2004).

Outro importante atributo de virulência expresso por GBS é a enzima superóxido dismutase com cofator de  $Mg^{2+}$ , que faz com que o GBS suporte o estresse oxidativo durante o processo infeccioso. O cofator  $Mg^{2+}$  converte oxigênio livre ( $O^2$ ) em oxigênio e peróxido de oxigênio ( $O_2$  e  $H_2O_2$  respectivamente) que são metabolizados por catalases e peroxidases, fazendo com que as células fagocíticas não consigam utilizar espécies reativas de oxigênio para defesa do sistema imune contra o patógeno e que, por consequência, GBS evada do sistema imune (Miller e Britigan, 1997; Poyart *et al.*, 2001; Rajagopal, 2009).

### **1.3 Infecções causadas por GBS em humanos**

O trato gastrointestinal é o principal reservatório humano de *S. agalactiae* e, assim, a colonização da vagina pode representar contaminação deste sítio com material proveniente do reto (João *et al.*, 2011; Le Doare & Heath, 2013). A colonização assintomática na vagina e reto é observada em 18% das mulheres gestantes a nível mundial, podendo variar de 10 a 40% entre as diferentes regiões geográficas (Seale *et al.*, 2017). No Brasil, um estudo realizado por nosso grupo avaliou gestantes dentro de um período de 8 anos, observando uma taxa de colonização de 22-32%, variando de acordo com os anos analisados (Botelho *et al.*, 2018). Até 60% das mulheres colonizadas podem ser portadoras deste patógeno de modo intermitente (Schrag & Verani, 2013).

*S. agalactiae* é um importante agente causador de doença invasiva no período neonatal

(WHO, 2021). Aproximadamente 90% das infecções nos neonatos ocorrem nos primeiros dias de vida e, por esse motivo, são chamadas de síndrome precoce. Por outro lado, as doenças que ocorrem após uma semana e até três meses de vida são conhecidas como síndrome tardia (Le Doare & Heath, 2013).

Os recém-nascidos que apresentam a síndrome precoce adquirem o microrganismo por infecção ascendente ainda dentro do útero, através da aspiração do líquido amniótico contaminado, ou mediante a passagem através do canal vaginal colonizado com *S. agalactiae* (Brokaw *et al.*, 2021). Embora cerca de 50% dos neonatos sejam colonizados por esse microrganismo, apenas 2% deles desenvolvem infecção (Le Doare *et al.*, 2017). As principais complicações associadas à síndrome precoce são bacteremia primária, pneumonia e meningite (WHO, 2021).

A síndrome tardia ocorre com uma incidência de 0,4 a cada 1000 nascidos vivos (Zangwill, Schuchat e Wenger, 1990). Enquanto cerca da metade das infecções de início tardio são adquiridas a partir do contato com o canal de parto em mães colonizadas, os outros casos resultam da aquisição pós-natal do microrganismo a partir da mãe, de outras pessoas que cuidam da criança ou do ambiente hospitalar (Paredes *et al.*, 1976). A bacteremia associada à meningite é a apresentação clínica predominante (Schuchat, 1998) e a mortalidade pode chegar a mais de 50% (CDC, 2004; Schrag & Verani, 2013).

Um relatório recente da OMS estimou um número total de mortalidade de 319.000 neonatos. Quanto à recém-nascidos com sequelas relacionadas à meningite por GBS, estimou-se em 10.000. E estimou-se também 57.000 casos de natimortos (WHO, 2021). Além disso, a taxa global de mortalidade de neonatos por doença invasiva é estimada em 8,4%, variando de acordo com o padrão de vida do país/continente. Em países com alto padrão de vida esta taxa costuma ser menor, enquanto no continente africano, maior (Madrid *et al.*, 2017, WHO, 2021). A infecção invasiva pode causar sequelas a longo prazo em neonatos, como transtorno do neurodesenvolvimento, podendo ser de moderado a grave, afetando um a cada cinco recém-nascidos (Kohli-Lynch *et al.*, 2017). GBS ainda se destaca como agente etiológico de fetos natimortos e parto prematuro (Seale *et al.*, 2017; Bianchi-Jassir *et al.*; 2017).

Além disso, em mulheres gestantes e no puerpério, GBS pode estar associado com infecções invasivas e não invasivas como infecções urinárias, sepse, tromboflebite séptica, meningite, endometrite e amnionite (Função & Narchi, 2013).

*S. agalactiae* também causa uma série de infecções em pacientes adultos não gestantes. Além da bacteremia sem foco primário, que é a manifestação clínica mais comum neste tipo de população, outras infecções por GBS observadas em adultos são pneumonia, infecção do trato urinário, endocardite, peritonite, meningite, infecções em pele e tecidos moles, infecção puerperal, osteomielite e artrite séptica (Jackson *et al.*, 1995; Lamagni *et al.*, 2013; Florindo *et al.*, 2014; Flores *et al.*, 2015; Alhazmi *et al.*, 2016).

#### **1.4 Distribuição dos sorotipos**

A distribuição dos sorotipos entre as amostras de GBS pode variar de acordo com diversos fatores, tais como o quadro clínico, a faixa etária do paciente e a região geográfica. De forma geral, os sorotipos mais prevalentes são Ia, II, III e V, englobando mais de 85% das amostras estudadas no mundo (Weisner *et al.*, 2004; Tazzi *et al.*, 2011; Edmond *et al.*, 2012).

Entre neonatos com infecção invasiva, os sorotipos Ia e III são os mais frequentes (Schuchat, 1998; Johri *et al.*, 2006; Melin & Efstratiou, 2013). Por outro lado, entre adultos não gestantes, o sorotipo V se destaca (Harrison *et al.*, 1998; Schuchat, 1998). O sorotipo Ia foi apontado como o mais prevalente entre adultos não gestantes de Portugal (Martins *et al.*, 2011). Igualmente, na Argentina, os sorotipos Ia e II se destacaram neste tipo de população, enquanto o sorotipo III foi o mais prevalente nas síndromes tardias neonatais (Lopardo *et al.*, 2003). No Canadá, o estudo de Teatero e colaboradores (2015) detectou a emergência do sorotipo IV em quadros de doença invasiva, particularmente o ST 459.

Estudos realizados no Japão mostram os sorotipos VI e VIII predominando nas mulheres grávidas colonizadas, embora sejam raramente encontrados em outros locais do mundo (Lachenauer *et al.*, 1999; Melin e Efstratiou, 2013).

No Brasil, estudos realizados em diferentes locais do país demonstraram a predominância dos sorotipos Ia, II e V entre amostras isoladas de casos de colonização e de infecção em pacientes adultos não gestantes, em sítios variados (sangue, ferida cirúrgica, fluido peritoneal, entre outros) (Palmeiro *et al.*, 2010; Correa *et al.*, 2011; Dutra *et al.*, 2014). Já estudos considerando apenas amostras de colonização indicam que além dos tipos Ia, II e V, o sorotipo III também predomina (Otaguiri *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2013, Botelho *et al.*, 2018).

Em um estudo publicado na China, Zhang *et al.*, (2021) demonstraram que cepas invasivas do sorotipo Ib, ST-10, causando infecção em crianças, pertenciam a um clone sensível à tetraciclina.

Em neonatos com infecção invasiva, os sorotipos predominantes são Ia e III (Schuchat, 1998; Johri *et al.*, 2006; Melin & Efstratiou, 2013).

Um estudo recente detectou que o sorotipo III foi responsável por colonizar 28% das gestantes e causar 48% dos casos de síndrome precoce e 74% dos casos de síndrome tardia (Seale *et al.*, 2017).

### **1.5 Profilaxia intraparto e resistência aos antimicrobianos**

No final da década de 1990, o *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG), o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e a *American Academy of Pediatrics* (AAP) estabeleceram recomendações para realização de profilaxia antibiótica intraparto (IAP, do inglês *Intrapartum Antibiotic Prophylaxis*) em mulheres gestantes que apresentassem fatores de risco ou cultura positiva para GBS, independente dos fatores de risco (CDC, 2010). Em 2002, diretrizes revisadas pelo CDC foram emitidas, e atualizadas em 2020, recomendando a triagem universal de mulheres entre a 35<sup>a</sup> e 37<sup>a</sup> semana de gestação, para verificar a presença de GBS no trato anovaginal e, caso confirmada, é realizado o protocolo de IAP (Shabayek & Spellerberg, 2018; ASM, 2020).

A profilaxia antibiótica intraparto (IAP) é uma terapia preventiva com o objetivo de diminuir a probabilidade de o neonato adquirir *S. agalactiae* por via vertical no momento do parto. O antibiótico de primeira escolha determinado pelo CDC é a penicilina, mas em indivíduos alérgicos, o indicado é a administração de clindamicina. (ACOG, 2010; CDC, 2010). O antimicrobiano escolhido é administrado por via intravenosa na gestante horas antes do parto com o objetivo de se atingir rapidamente a corrente sanguínea e o líquido amniótico fetal. Porém, a dose de antibiótico administrada é calculada cuidadosamente para que não haja risco de intoxicação neurotóxica para a gestante e para o feto (CDC 2010; ACOG 2010).

A detecção e eliminação de *S. agalactiae* do trato genital e intestinal através da profilaxia intraparto, na gestante, têm como objetivo quebrar a cadeia de transmissão, de forma a diminuir a incidência da doença. A melhor época para a detecção de colonização seria durante o último

trimestre, pois nesta fase da gestação detecta-se um aumento na prevalência de colonização em relação ao 2º trimestre e esse período é importante para se evitar a recolonização antes do final da gestação (Baker & Barret, 1974; Yook *et al.*, 2013). Embora esse procedimento profilático previna 70 a 75% dos casos de síndrome precoce, não tem efeito aparente sobre a ocorrência da síndrome tardia (Schrag & Verani, 2013).

Até a década de 90, *S. agalactiae* era considerado uniformemente sensível aos beta-lactâmicos (Betriu *et al.*, 1994). Contudo, desde então, a diminuição na sensibilidade à penicilina vem sendo esporadicamente demonstrada por diferentes autores (Kimura *et al.*, 2008; Longtin *et al.*, 2011; Nagano *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2020). No entanto, esses relatos não são significativos a ponto de desqualificar o antimicrobiano como primeira escolha e a penicilina, permanece como o antimicrobiano de escolha para a IAP na gestante, segundo o CDC.

Em pacientes alérgicos aos beta-lactâmicos, os macrolídeos e lincosaminas apresentam-se como alternativas. No entanto, entre amostras de GBS, índices crescentes de resistência à eritromicina e clindamicina vêm sendo reportados (Willems *et al.*, 2011; CDC, 2019). Estudos revelaram que os índices de resistência à eritromicina podem chegar a 46% na França (Bergal *et al.*, 2015), 45,5% em Taiwan (Wang *et al.*, 2021) e 54% nos EUA (CDC, 2019). Ainda nos Estados Unidos, a resistência à clindamicina foi registrada em mais de 40% das amostras de GBS (CDC, 2019). No Brasil, os índices de resistência a macrolídeos e lincosaminas são inferiores àqueles observados em outras regiões geográficas, estando em torno de 2% para a clindamicina e 14% para a eritromicina (Benchetrit *et al.*, 1982; Nakamura *et al.*, 2011; Corrêa *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2014; Botelho *et al.*, 2018).

Diversos estudos também têm relatado o desenvolvimento de resistência do GBS às fluoroquinolonas, antibiótico com ampla utilização na clínica médica, inclusive em quadros de infecção do trato urinário (Miró *et al.*, 2006; Faccone *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017; Arias *et al.*, 2019; Sanches *et al.*, 2021). Uma possível associação da resistência às fluoroquinolonas com a resistência ao cloranfenicol foi sugerida no estudo de Simoni e colaboradores (2018).

## **1.6 Importância do diagnóstico laboratorial na gestação**

O diagnóstico precoce da colonização por *S. agalactiae* na gravidez é fundamental para que medidas de controle e profilaxia sejam implementadas.

Em gestantes, o método padrão para o diagnóstico da colonização por *S. agalactiae* consiste na cultura de secreção anal e vaginal (*swab* combinado) em caldo seletivo com posterior cultivo em ágar sangue (5% de sangue de carneiro) e/ou ágar cromogênico e realização de teste sorológico (Baker, 1977; ASM, 2020).

As colônias de GBS em ágar sangue se apresentam  $\beta$ -hemolíticas e a espécie pode ser identificada presuntivamente com base em características como a produção do fator CAMP (Christie-Atkinson-Munch-Peterson) e a hidrólise do hipurato de sódio (Christie, Atkins, Munch-Petersen, 1945; Hwang e Ederer, 1975; Spellerberg & Brandt, 2015). O teste de detecção da produção do fator CAMP se baseia na capacidade de sinergia entre o fator CAMP e a  $\beta$ -lisina de *Staphylococcus aureus* levando à uma hemólise acentuada, na forma de uma ponta de seta. Por sua vez, o teste da hidrólise do hipurato de sódio verifica a capacidade da amostra bacteriana de hidrolisar o hipurato graças à presença da enzima hipuricase. Assim, o teste se baseia na detecção de um dos produtos gerados, o ácido benzoico ou a glicina, após a hidrólise do hipurato de sódio, através de um agente revelador.

A identificação definitiva de GBS pode ser realizada através de técnicas moleculares como a PCR (do inglês “Polymerase Chain Reaction”), utilizando um marcador molecular da espécie como o gene espécie-específico *dltS* (Poyart *et al.*, 2007). Além disso, mais recentemente, a identificação por MALDI-TOF (do inglês, “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–time of Flight Mass Spectrometry”) tem sido implementada na rotina dos laboratórios de microbiologia permitindo uma identificação mais rápida e robusta de diversas espécies bacterianas, inclusive do GBS. Essa técnica analisa o perfil de proteínas ribossomais da espécie bacteriana, comparando com um banco de dados de espectros já conhecidos e armazenados no *software* do equipamento (Rosa-Fraile & Spellerberg, 2017; Rothen *et al.*, 2020). A técnica de MALDI-TOF aumenta a rapidez da identificação do GBS, reduzindo o tempo de confirmação do diagnóstico em 24h quando comparado à identificação por cultura e métodos bioquímicos (Ábrok *et al.*, 2019; Rothen *et al.*, 2020).

## 1.7 Vacinas para *S. agalactiae*



A caracterização das amostras bacterianas, através de tipificação fenotípica, fornece dados importantes que podem subsidiar a melhor compreensão e conhecimento sobre as amostras circulantes e apontar também sua persistência e disseminação em uma determinada população. Essas informações são fundamentais para basear a formulação de uma vacina polivalente com a finalidade de combater as doenças invasivas por *S. agalactiae* no período neonatal. Este objetivo é considerado prioritário no mundo inteiro pelas autoridades de saúde (Melin & Efstratiou, 2013).

As vacinas contra GBS têm o potencial de substituir a IAP. O que oferece a vantagem de se imunizar as gestantes e evitar a possibilidade de aumento de resistência aos antimicrobianos administrados intraparto devido ao amplo uso.

Dentre os imunizantes em desenvolvimento, destacam-se a vacina polissacarídica trivalente (contra os tipos Ia, Ib e III) e a hexavalente (contra Ia, Ib, II-V), associadas à proteína CRM197 (um mutante não-tóxico da toxina diftérica. É utilizado como proteína transportadora de polissacarídeos e haptenos). As vacinas encontram-se em fases I e II de testes clínicos em humanos (Madhi *et al.*, 2016; Swamy *et al.*, 2020; Absalon *et al.*, 2021, Pinto *et al.*, 2021), mas, até o presente momento, não há vacinas licenciadas. Porém, a previsão é de que até 2026 pelo menos uma vacina contra GBS seja aprovada pela OMS para ser administrada em gestantes; e até 2030, que pelo menos 10 países ao redor do globo tenham introduzido o imunizante no seu calendário vacinal (WHO, GBS, 2021).

## 2. JUSTIFICATIVA

*S. agalactiae* é um importante agente de infecções neonatais devido à sua colonização no trato anovaginal de gestantes, podendo levar a sepse, meningite e até óbito. O rastreamento dessa bactéria a partir da 35<sup>a</sup> semana de gestação, como parte do acompanhamento pré-natal, é a principal forma de detectar precocemente a bactéria e implementar medidas de controle e profilaxia, sendo utilizado de forma eficaz em países de alta renda, porém não sendo realizado rotineiramente no Brasil e na maioria dos países de baixa e média renda. Todavia, a ampla utilização de antibióticos vem levantando questionamentos acerca da validade do uso profilático desses antimicrobianos no período neonatal, já que pode levar à seleção de bactérias resistentes aos antibióticos. Além disso, os dados sobre GBS em mulheres gestantes no Rio de Janeiro se mostraram dinâmicos, apresentando variações entre diferentes estudos, o que sugere a importância de estudos sequenciais sobre a epidemiologia de GBS nesta população.

Assim, o presente estudo, por meio de caracterização fenotípica das amostras bacterianas, tem o objetivo de contribuir para o melhor entendimento do panorama de GBS em nosso meio, através de conhecimento acerca da prevalência, perfil de colonização, distribuição de sorotipos e resistência aos antimicrobianos em amostras de GBS isoladas de mulheres gestantes no Rio de Janeiro.

### **3. OBJETIVOS**

Levando-se em consideração a importância de *S. agalactiae* como patógeno humano, bem como a grande relevância nas infecções em neonatos a partir de gestantes colonizadas, este projeto visa:

#### **3.1. Objetivo Geral**

Caracterizar, por métodos fenotípicos, amostras isoladas de gestantes (35<sup>a</sup>-37<sup>a</sup> semana), durante o período de janeiro de 2019 à junho de 2022, residentes na região metropolitana do Rio de Janeiro, e atendidas durante o pré-natal na Maternidade Escola da UFRJ.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- ❖ Identificar as amostras de GBS entre gestantes incluídas neste estudo através de métodos convencionais e pela técnica de MALDI-TOF;
- ❖ Caracterizar fenotipicamente as amostras através da determinação do tipo sorológico e da determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos;
- ❖ Determinar a frequência de colonização por GBS nessas pacientes no período do estudo.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 População incluída no estudo**

Os espécimes clínicos foram obtidos de gestantes entre a 35<sup>a</sup> e 37<sup>a</sup> semana de gestação, atendidas na Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) no período de Janeiro/2019 a Junho/2022. O procedimento da coleta foi realizado por médicos da Maternidade. As mulheres gestantes que concordaram em participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, e preencheram um questionário fornecendo dados clínicos e sociodemográficos. O projeto tem aprovação no comitê de ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da UFRJ sob o número 43389321.9.0000.5257.

### **4.2 Coleta, transporte e processamento dos espécimes clínicos**

Os espécimes clínicos foram coletados com auxílio de *swab* estéril através do método de *swab* combinado (representativo das secreções anal e vaginal). Após o procedimento de coleta, os *swabs* foram imediatamente acondicionados em tubo contendo 1,0 mL de meio de transporte de Amies, refrigerados e encaminhados ao laboratório, onde foram processados em até 24h, conforme indicado pelo CDC (ASM, 2020).

Para o processamento, cada material clínico (tubos contendo os *swabs* imersos em Amies) foi homogeneizado e alíquotas (50 µL) foram inoculadas em ágar cromogênico (PlastLabor). Em paralelo, 50 µL do meio de transporte Amies foi inoculado em caldo de pré-enriquecimento Todd Hewitt Broth (THB, Sigma-Aldrich), adicionado de gentamicina (8 µg/mL) e ácido nalidíxico (15 µg/mL) (THB-ANG). Após incubação a 37°C por 24h, o crescimento foi inoculado em placas de ágar sangue (agar tripticase soja + 5% de sangue desfibrinado de carneiro; Plastlabor) e as placas incubadas a 37°C por 24h. Todas as placas foram analisadas e as colônias suspeitas de GBS (em meio cromogênico, colônias de coloração rosa e em agar sangue, colônias circundadas por beta hemólise) submetidas aos testes fenotípicos de identificação.

### **4.3 Identificação fenotípica das amostras bacterianas**

As culturas suspeitas de serem GBS foram submetidas a testes fenotípicos para a identificação do gênero e da espécie, com base nas recomendações de Facklam & Washington II

(1991), incluindo: observação das características morfotintoriais após coloração de Gram, observação do tipo de hemólise, características coloniais no ágar cromogênico, produção do fator CAMP e teste de hidrólise do hipurato.

A observação de características morfotintoriais foi realizada a partir de esfregaços preparados a partir do crescimento das amostras em caldo THB a 37°C por 18h em atmosfera normal, e corados pelo método de Gram. Como controles foram utilizadas as amostras de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *S. agalactiae* SS-615.

As propriedades hemolíticas foram observadas a partir do crescimento das amostras em placas contendo ágar sangue (AS), após incubação a 37°C por 18-24h em aerobiose. Durante a semeadura foram feitos furos em profundidade no ágar, com auxílio da alça bacteriológica, a fim de facilitar a verificação do tipo de hemólise. A formação de um halo de hemólise total discreto ao redor das colônias e restrito a região imediatamente ao redor dos furos no ágar foi definida como  $\beta$ -hemólise característica de GBS. No caso do meio cromogênico, a presença de colônias de cor rosa, indicam a suspeita de GBS.

O teste de CAMP foi realizado através da semeadura sob a forma de estria única, em placas contendo meio de ágar sangue, de uma amostra de referência de *S. aureus* (ATCC 25923) produtora de  $\beta$ -lisina, seguido de semeadura das amostras suspeitas de GBS sob a forma de estrias perpendiculares à primeira. Após incubação à 37°C por 24h, a reação positiva indicando a produção de fator CAMP pelas amostras em teste foi observada através da formação de uma zona de hemólise sinérgica na forma de ponta de seta (Lang e Palmer, 2003). Todos os testes foram realizados juntamente com uma amostra controle positivo (*S. agalactiae* SS-615).

O teste da hidrólise do hipurato foi feito segundo Hwang & Ederer (1975). Para isso, foram adicionados 400 $\mu$ l de solução do hipurato de sódio a 1% (LAB Confiança) em tubos estéreis e, em seguida, foi inoculada uma alçada da amostra teste formando uma suspensão homogênea. Os tubos foram incubados na estufa por 2h/35°C e, após esse período, foram adicionados 200 $\mu$ l de solução de ninidrina (Isofar) (3,5g de ninidrina em 100mL de uma mistura 1:1 de acetona e butanol), e, em seguida, foram novamente incubados por 10 min. As amostras produtoras da enzima hipuricase quebram a molécula de hipurato gerando, como um dos produtos finais, a glicina que na presença da ninidrina é desaminada formando um precipitado roxo, sendo, então, um resultado presuntivo positivo para GBS. Para o teste, foi utilizada uma amostra controle positivo *S. agalactiae* SS-615 e como controle negativo a cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Por fim, a confirmação da identificação das amostras foi realizada utilizando-se a metodologia de MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time Of Flight Mass Spectrometry*). As colônias das amostras crescidas em ágar sangue, incubadas à 37°C por 18-24h em aerobiose, foram aplicadas em uma placa de aço inoxidável polido com auxílio de um palito de madeira. Em seguida, foi acrescentado 1µL de solução matriz HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico; (Bruker). Quando inseridas no espectrômetro de massa *Microflex LT (Bruker Daltonics, Alemanha)*, as amostras depositadas na placa foram submetidas ao laser, ionizando as proteínas, geralmente as ribossomais (entre 2 e 20 KDa). Através das análises dessas informações foram gerados espectros com auxílio do software *FlexControl* no intervalo de 2.000 a 20.000 *m/z*. Esses espectros foram comparados com os presentes no banco de dados do aparelho. O resultado foi apresentado através de escores de confiabilidade onde escores  $\leq 1,69$  são considerados não confiáveis, escores entre 1,70 e 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 de 2,30 até 3,00 indicam alta probabilidade na identificação de espécie (Bizzini & Greub, 2010; Pasternak, 2012).

#### **4.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos**

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado de acordo com instruções contidas no manual do *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2022)*. A técnica utilizada foi a de disco-difusão. Para determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, primeiramente foi feito um crescimento bacteriano em ágar sangue a 37 °C por 24h e, então, preparado um inóculo, em tubo de vidro, contendo 2 mL de salina e o crescimento bacteriano até se alcançar turbidez semelhante à escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml). Com o auxílio de um *swab* o inóculo foi semeado por confluência em ágar Müeller- Hinton acrescido de 5% de sangue de carneiro (Plastlabor) e, após, discos de antimicrobianos (Laborelin) foram posicionados na placa e esta foi incubada a 37 °C por 24h em estufa com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. Os antimicrobianos testados foram a clindamicina (2µg), eritromicina (15µg), levofloxacina (5µg), penicilina (10µg), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg). A interpretação dos resultados foi realizada medindo-se o diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano, de acordo com os critérios descritos

no CLSI (2022). A cepa *S. pneumoniae* ATCC 49619 foi utilizada para fins de controle de qualidade do teste.

Concomitantemente, foi também determinado o fenótipo  $MLS_B$ , para avaliar a resistência aos antimicrobianos clindamicina e eritromicina. O fenótipo  $MLS_B$  constitutivo ocorre quando a amostra apresenta halos de resistência para a eritromicina e a clindamicina enquanto o fenótipo  $MLS_B$  induzido ocorre quando a amostra apresenta halo de resistência à eritromicina e de sensibilidade à clindamicina, porém com a presença de um estreitamento deste halo de inibição próximo ao disco da eritromicina. O fenótipo M é caracterizado por amostras que se apresentam resistentes à eritromicina e sensíveis à clindamicina, enquanto o fenótipo L são amostras que se apresentam sensíveis à eritromicina e resistentes à clindamicina (Seppala *et al.*, 1993; De Azevedo *et al.*, 2001).

#### **4.5 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 Diagnostica, Dinamarca, Hillerød), de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, uma gota do antissoro foi aplicada no poço do cartão presente no kit e uma alça calibrada de 1µl repleta com crescimento bacteriano foi adicionado ao soro. Os dois elementos foram homogeneizados através de movimentos circulares e, após 30s, foi possível observar reação positiva quando há formação de grumos no poço em questão.

Todos os 10 sorotipos foram testados (Ia, Ib-IX). Amostras de referência dos diferentes tipos capsulares (SS-615 (sorotipo Ia), SS-618 (sorotipo Ib), SS-619 (sorotipo II), SS-620 (sorotipo III), SS-1240 (sorotipo IV), SS-1172 (sorotipo V), SS-1354 (sorotipo VI), SS-1355 (sorotipo VII), SS-1356 (sorotipo VIII)) foram utilizadas para fins de controle do teste.

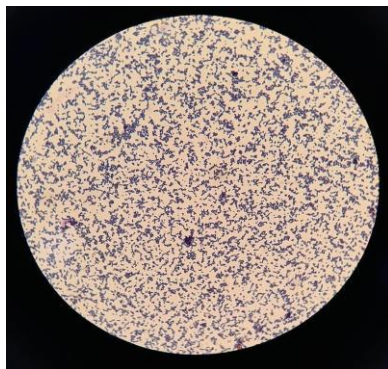
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Taxa de colonização e identificação de *S. agalactiae*

Um total de 1270 espécimes anovaginais foram obtidos de gestantes entre a 35<sup>a</sup> e 37<sup>a</sup> semanas de gestação atendidas na Maternidade Escola - UFRJ, que foram incluídas no estudo durante o período de Janeiro de 2019 a Junho de 2022.

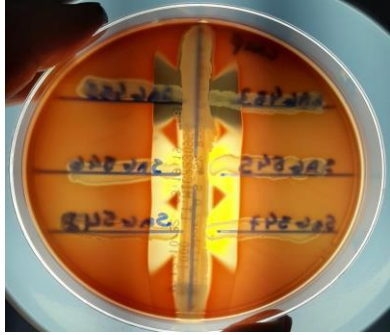
Dentre os espécimes clínicos analisados, em 106 deles (8,3%) foram identificadas amostras suspeitas de GBS. Todas elas foram caracterizadas fenotipicamente. A realização da coloração de Gram possibilitou a observação das características morfológicas dos microrganismos, que se apresentaram como cocos gram-positivos dispostos em cadeia (**Figura 1**). Todas as amostras testadas apresentaram beta-hemólise característica em ágar sangue e produziram o fator CAMP (**Figura 2**); colônias rosas em ágar cromogênico (**Figura 3**), e foram capazes de hidrolisar o hipurato de sódio (**Figura 4**). Com esses resultados, pudemos caracterizar presuntivamente as amostras como da espécie *S. agalactiae*.

Para a confirmação definitiva, todas as amostras bacterianas identificadas presuntivamente como GBS foram submetidas a técnica de MALDI-TOF e confirmaram os resultados, apresentando escores  $\geq 2,0$ .

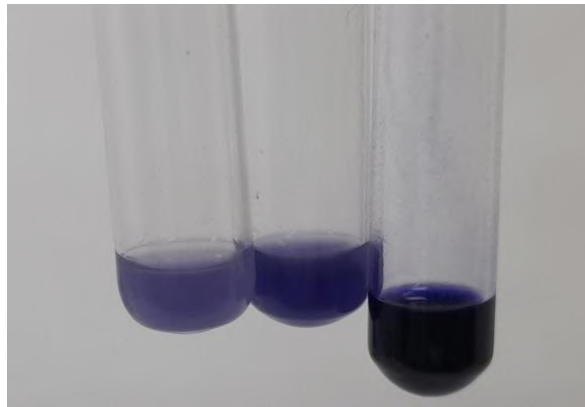


**Figura 1:** Coloração de GRAM das amostras suspeitas de serem *S. agalactiae*





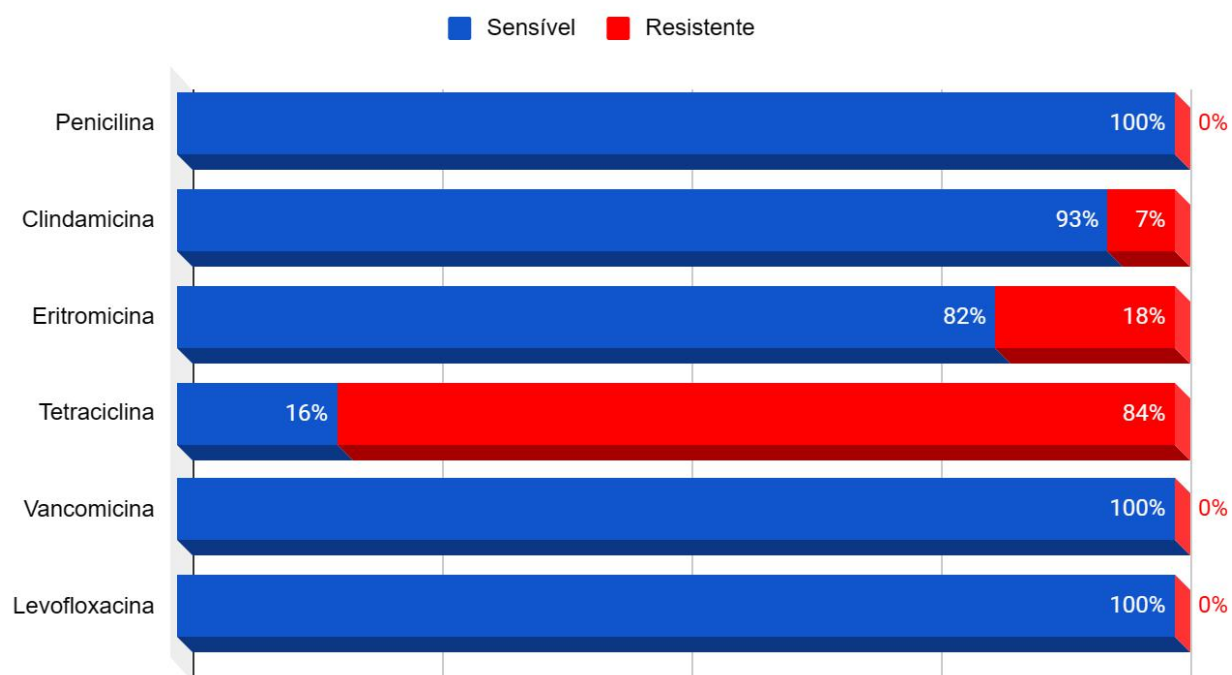
**Figura 2:** Hemólise e Teste de produção do fator CAMP    **Figura 3:** Crescimento em agar cromogênico



**Figura 4:** Teste da hidrólise do hipurato

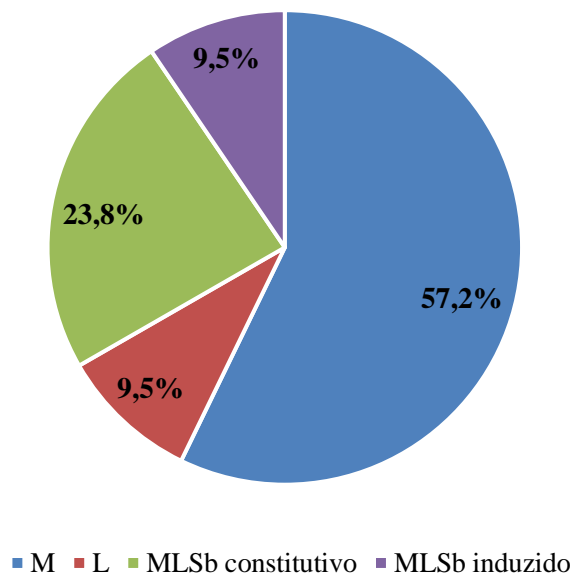
## 5.2 Determinação dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos

A análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos revelou que todas as amostras de GBS foram sensíveis à penicilina, vancomicina e levofloxacina, enquanto para a tetraciclina, eritromicina e clindamicina foi observada resistência de 84%, 18% e 7%, respectivamente. Esses resultados estão apresentados na **Figura 5**.



**Figura 5** - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 106 amostras de *S. agalactiae* avaliadas

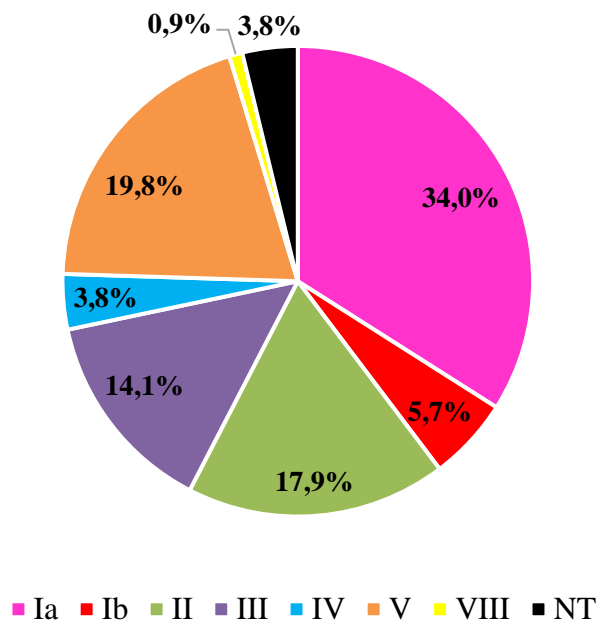
Além disso, dentre as 21 amostras resistentes à eritromicina e/ou à clindamicina, 12 (57,2%) apresentaram o fenótipo M, 5 (23,8%) apresentaram o fenótipo cMLSB, 2 (9,5%) o fenótipo iMLSB e 2 (9,5%) o fenótipo L (**Figura 6**).



**Figura 6** – Distribuição dos fenótipos de resistência MLS<sub>B</sub> entre as amostras de *S. agalactiae* analisadas

### 5.3 Determinação dos tipos capsulares de GBS

Dentre as 106 amostras de GBS testadas através do método de aglutinação em látex, o sorotipo mais frequente foi o Ia (34%), seguido dos sorotipos V (19,8%), II (17,9%), III (14,1%), Ib (5,7%), IV (3,8%) e VIII (0,9%). Além disso, 4 amostras (3,8%) se apresentaram como não tipáveis (NT), como está demonstrado na **Figura 7**.



**Figura 7-** Distribuição dos sorotipos detectados entre as amostras de *S. agalactiae* analisadas.

## 6. DISCUSSÃO

*S. agalactiae* se destaca como um importante agente de infecções neonatais, estimando-se que 392.000 casos de doenças invasivas por GBS ocorram em todo o mundo anualmente, levando à cerca de 91.000 óbitos neonatais (OMS, 2021). Em mulheres, gestantes ou não gestantes, o trato anovaginal é um importante reservatório de GBS, cuja taxa de colonização pode variar chegando até a 40 %, em diferentes locais do mundo, sendo a transmissão vertical durante o parto a principal forma de transmissão do GBS para o neonato (Seale *et al.*, 2017).

Com o intuito de prevenir as infecções em neonatos causadas por GBS, o CDC recomenda a IAP em gestantes que apresentem fatores de risco ou cultura positiva para *S. agalactiae* entre a 35<sup>a</sup> a 37<sup>a</sup> semana de gestação (ASM, 2020). No Brasil, apesar da Sociedade Brasileira de Pediatria reiterar as recomendações de triagem para GBS em gestantes e aplicação da IAP (Costa, 2011), não existe nenhuma política nacional de rastreamento e profilaxia para GBS, estimando-se uma baixa adesão de 20% dos casos (Costa, 2011; Le Doare *et al.*, 2017).

Além disso, amostras de GBS resistentes a antimicrobianos, tais como eritromicina e clindamicina que são utilizados como alternativas na IAP, nos casos de gestantes alérgicas aos beta lactâmicos, têm emergido nas últimas décadas, o que pode comprometer a utilização da IAP. Inclusive, o surgimento dessas amostras de GBS resistentes ocasionou a sua inclusão na lista de ameaças atuais de resistência antimicrobiana do CDC (CDC, 2019). Dessa forma, se torna essencial a realização de estudos que contribuam com a geração de dados a fim de auxiliar no desenvolvimento e aprimoramento de políticas públicas de vigilância epidemiológica para GBS no Brasil.

A taxa de prevalência de GBS observada no período avaliado neste estudo foi de 8,3%, uma taxa menor do que as relatadas em estudos prévios realizados no Brasil. Estudos na região Sudeste habitualmente mostram taxas expressivamente maiores de 17,4 a 32% (Nomura *et al.*, 2009; Marconi *et al.*, 2010; Função & Narchi, 2013; Barbosa *et al.*, 2016; Botelho *et al.*, 2018). Entretanto, um estudo mais recente do nosso grupo, realizado por Costa e colaboradores (2022), já havia indicado uma diminuição para 10,8% na taxa de colonização por GBS em gestantes, que se apresentou ainda menor quando avaliado separadamente entre períodos pré e após o início da pandemia de COVID-19, diminuindo significativamente de 13,8% para 5,3%. Tendo em vista que o período avaliado neste estudo incluiu uma parte do período pandêmico, esses dados podem

sugerir que a diminuição da prevalência de GBS seja um possível efeito, pelo menos em parte, das medidas estabelecidas durante a pandemia, tais como distanciamento social, uso aumentado de antibióticos, como a azitromicina, e antissépticos.

Dentre as 106 amostras testadas neste estudo, o sorotipo Ia foi o predominante (34%), seguido do V (19,8%), II (17,9%), III (14,1%), Ib (5,7%), IV (3,8%) e VIII (0,9%), além de 3,8% amostras NT. Em outro estudo, que analisou amostras de diversas regiões do Brasil foram detectados os sorotipos Ia (27,6%), II (19,1%), Ib (18,7%) e V (13,6%) (Dutra *et al.*, 2014). Cabe salientar que no estudo de Dutra e colaboradores foram testadas amostras tanto de colonização de gestantes como de infecções diversas, o que pode justificar algumas diferenças encontradas. Um estudo do nosso grupo, que avaliou amostras isoladas de gestantes do Rio de Janeiro, observou a predominância do sorotipo Ia (37,3%), seguido do sorotipo II (19,9%), Ib (11,2%), V (9,2%), III (6,8%) e IV (3,5%) (Botelho *et al.*, 2018). Estes sorotipos são também os mais observados em colonização e infecções em gestantes a nível mundial (Weisner *et al.*, 2004; Tazzi *et al.*, 2011; Edmond *et al.*, 2012). Assim, computando-se vários estudos publicados no Brasil, os sorotipos mais frequentes em colonização são Ia, Ib, II, III e V (Otaguiri *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2013, Botelho *et al.*, 2018). Já nos continentes africano e asiático, os sorotipos mais frequentes são VI, VII, VIII e IX (Kwatra *et al.*, 2014), os quais são raramente descritos em outras regiões geográficas, o que evidencia a presença de fatores ainda não bem esclarecidos que favorecem a colonização diferencial dos sorotipos entre as populações de diferentes continentes e regiões. Assim, nossos resultados divergem dos comumente relatados no Brasil, o que deverá ser comprovado se é uma nova tendência ou não nos próximos estudos do grupo.

Como destaque, pôde ser observado um aumento expressivo na identificação de amostras do sorotipo V, uma diminuição do Ib e o surgimento do VIII, o qual ainda não havia sido detectada nos nossos estudos anteriores.

Quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, todas as 106 amostras analisadas apresentaram sensibilidade à penicilina. Apesar de alguns trabalhos demonstrarem amostras de GBS com susceptibilidade diminuída à penicilina (Kimura *et al.*, 2008; Longtin *et al.*, 2011; Nagano *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2020), esses relatos são muito raros e as amostras de GBS permanecem sensíveis aos beta-lactâmicos, sendo a penicilina o antimicrobiano de primeira escolha para a administração da IAP (CDC, 2010).

Os resultados de resistência à eritromicina (18%) e à clindamicina (7%) estão de acordo com o que é encontrado na literatura para o Brasil, com exceção do trabalho de Pinto e colaboradores (2013) que reportaram taxas de resistência de 4% à eritromicina e 1,9% à clindamicina. Botelho *et al* (2018) relataram taxas de 14% à eritromicina e 2% à clindamicina e Costa *et al* (2022) observaram taxas de 13,8% à eritromicina e 4,6% à clindamicina. Essas taxas ainda são consideradas baixas comparadas àquelas observadas em outros países, onde a resistência à esses antimicrobianos é bastante elevada. Por exemplo, quanto à resistência à eritromicina, a França relata taxas de 35% (Tazzi *et al.*, 2011), Taiwan reporta taxas de 46% (Hsueh *et al.*, 2001) e os EUA de 54% (CDC, 2019). A maioria das amostras com resistência a eritromicina e/ou a clindamicina apresentou o fenótipo M seguido do fenótipo cMLSB e iMLSB.

A alta resistência à tetraciclina, observada neste estudo (84%), está de acordo com o documentado na literatura, tanto no Brasil quanto em outros países. Na China, são relatadas taxas de até 81,5% (Wang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015b; Wang *et al.*, 2015c). No Brasil, as taxas de resistência à tetraciclina também ultrapassam os 80% (Oliveira *et al.*, 2005; Corrêa *et al.*, 2011; Nakamura *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2013; Botelho *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2022).

Assim, estudos como o presente trabalho, que avaliam a taxa de colonização por GBS e caracterizam as amostras de GBS isoladas de gestantes residentes na cidade do Rio de Janeiro e região metropolitana, auxiliam no conhecimento da prevalência e característica de GBS circulantes em nossa região e contribui na geração de dados para proporcionar a possibilidade de uma política pública de implementação de estratégias adequadas para a prevenção das doenças causadas por GBS.

## 7. CONCLUSÃO

- ❖ Todas as 106 amostras de *S. agalactiae* se apresentaram como cocos Gram-positivos, beta-hemolíticos, produtores de fator CAMP e hipuricase;
- ❖ Todas as amostras bacterianas foram identificadas ao nível de espécie pela técnica de MALDI-TOF;
- ❖ Os sorotipos predominantes no estudo foram: Ia (34%), V (19,8%), II (17,9%), III (14,1%), Ib (5,7%), IV (3,8%) e VIII (0,9%); e quatro amostras (3,8%) se apresentaram como NT;
- ❖ Todas as amostras foram susceptíveis à penicilina, vancomicina e levofloxacina. Foram observadas taxas de resistência de 84%, 18% e 7% para a tetraciclina, eritromicina e clindamicina, respectivamente.
- ❖ Amostras resistentes à eritromicina e/ou lincomicina apresentaram com maior frequência o fenótipo M, seguido do fenótipo cMLSB;
- ❖ A frequência de colonização de gestantes foi de 8,3%.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alhazmi, A., Hurteau, D. e Tyrrell, G. J. 2016. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in Alberta, Canada, from 2003 to 2013. *J. Clin. Microbiol.* 54, 1774–1781.
- Arias, B., Kovacec, V., Vigliarolo, L., Suárez, M., Tersigni, C., Müller, L., Lopardo, H., Bonofiglio, L. e Mollerach, M. 2019. Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus agalactiae* invasive isolates recovered in Argentina. *Microbial Drug Resistance* 25,739-743.
- Armistead, B., Oler, E., Waldorf, K. A. e Rajagopal, L., 2019. The Double Life of Group B *Streptococcus*: Asymptomatic Colonizer and Potent Pathogen. *J. Mol Biol.* 431, 2914-2931.
- ASM. 2020. Guidelines for the Detection and Identification of Group B *Streptococcus*. Disponível em: <https://asm.org/Guideline/Guidelines-for-the-Detection-and-Identification-of-> Acessado em 15/07/2022.
- Barbosa, N. G., de Brito, D. V. D., dos Reis, H., Mantese, O. C., Pinhata, M. M. M., Abdalla, V. O. S., e Gontijo Filho, P. P. (2016). Colonização materna por estreptococos do grupo B: Prevalência e susceptibilidade aos antimicrobianos/ Group B *Streptococcus* colonization in pregnant women: Prevalence and antimicrobial susceptibility. *Revista de Pesquisa em Saúde*, 17(1).
- Baker, C.J. 1977. Summary of the workshop on perinatal infections due to group B *Streptococcus*. *J. Infect Dis.* 136, 137-152.
- Baker, C. J. e Barret, F. F. 1974. Group B Streptococcal infection in infants: the importance of the various serotypes. *J. Am. Med. Assoc.* 230, 1158-1160.
- Barros, R.R., Kegele, F.C., Paula, G.R., Brito, M.A. e Duarte, R.S. 2012. Molecular characterization of the first fluoroquinolone resistant strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 16, 476-478.
- Benchetrit, L.C., Fracalanza, S.E.L., Peregrino, H., Camelo, A.A. e Sanches, L.A.L.R. 1982. Carriage of *Streptococcus agalactiae* in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil. *J.Clin.Microbiol.* 15, 787-790.
- Betriu, C., Gomes, M., Sanchez, A., Cruceyra, A., Romero, J. e Picazo, J.J. 1994. Antibiotic resistance and penicilin tolerance in clinical isolates of group B streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38, 2183-2186.
- Bizzini, A., e Greub, G. 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.*, 16 (11), 1614-1619.
- 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. e Teixeira, L. M. 2018. *Streptococcus agalactiae* carriage among pregnant women living in Rio de Janeiro, Brazil, over a period of eight years. *Plos One*, 13(5), e0196925.
- Brokaw A, Furuta A, Dacanay M, Rajagopal L, Adams Waldorf KM. 2021. Bacterial and host determinants of Group B streptococcal vaginal colonization and ascending infection in pregnancy. *Front Cell Infect Microbiol.* 11,720789.
- Centers for Diseases Control and Prevention. 2004. Prevention of perinatal group B Streptococcal disease, revised guideline from CDC. *MMWR*, v. 51.
- Centers for Diseases Control and Prevention. 2010. Prevention of perinatal group B streptococcal disease, revised guidelines from CDC. *M.M.W.R.*, 59, 1-23.
- Centers for Diseases Control and Prevention. 2019. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>. Acesso em: 15/07/22.
- Chen, V. L., Avci, F. Y. e Kasper, D. L. 2013. A maternal vaccine against group B *Streptococcus*: past, present, and future. *Vaccine* 31(Suppl. 4), D13–D19.
- CLSI, 2022. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-Ed32, March 2022.
- Côrrea, A. B.; da Silva. L. G.; Pinto. T. de C.; de Oliveira. I. C.; Fernandes. F.G.; da Costa. N. S.; de Mattos. M. C.; Fracalanza. S. E. e Benchetrit. L. C. 2011. The genetic diversity and phenotypic characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106, 1002-1006.

COSTA, H.P.F.. 2011. Prevenção da Doença Perinatal Pelo Estreptococo do Grupo B, Sociedade Brasileira de Pediatria, 1–18.. Disponível em: <https://www.sbp.com.br/departamentos-cientificos/neonatalogia/documentos-cientificos>.

Deb R., Kumar, A., Chakraborty, S., Verma, A.K., Tiwari, R., Dhama, K., Singh, U. e Kumar, S. 2013. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. *Pak J Biol Sci.* 23,1653-1661.

Doran, K. S., & Nizet, V. 2004. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Mol. Microb.* 54(1), 23-31.

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. e Fracalanza, S. E. L. 2014. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *BMC Infect. Dis.* 14, 323.

Edmond, K. M.; Kortsalioudaki, C.; Scott, S.; Schrag, S. J.; Zaidi, A. K.; Cousens, S. & Heaeth, P. T. 2012. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 379, 11-17.

Eickhoff, T.C., Klein, J.O., Daly, A.K., Ingall, D. e Finland, M. 1964. Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic Streptococci. *N. Engl. J. Med.* 271, 1221-1228.

Faccone D, Guerriero L, Mendez E. et al. 2010. Fluoroquinolone resistant *Streptococcus agalactiae* isolates from Argentina. *Rev.Argent Microbiol* 42, 203–207.

Facklam, R.R. e Washington II, J.A. *Streptococcus* and related catalase-negative Gram positive cocci. In: Manual of Clinical Microbiology. Balows, A., Society for Microbiology, Washington, D.C. ,238-257.

Flores A. R., Galloway-Peña J., Sahasrabhojane P., Saldaña M., Yao H., Su X. 2015. Sequence Type 1 Group B *Streptococcus*, An Emerging Cause of Invasive Disease in Adults, Evolves By Small Genetic Changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 6431–6436.

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

Fry, R.M. 1938. Fatal Infections by Haemolytic *Streptococcus* Group B. *The Lancet* 1, 199-201.

Função, J.M., & Narchi, N.Z. 2013. A study of group B *Streptococcus* in pregnant women of eastern São Paulo. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 47, 22-29.

Ginsburg, I. 2002. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect.Dis.* 2, 171-179.

Hardie, J. M. & Whiley, R.A. 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement* 83, 1-11.

Harrison, L.H., Elliott, J.A., Dwyer, D.M., Libonati, J.P., Ferrieri, P., Billmann, L. & Schuchat, A. 1998. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. *Maryland Emerging Infections Program. J. Infect. Dis.* 177, 998-1002.

Hebert, M. A.; Beveridge, C. J. & Saunders, N. J. 2004. Bacterial virulence factors in neonatal sepsis: group B *Streptococcus*. *Curr Opin Infect Dis.* 17, 225-229.

Hsueh, P.R., Teng, L.J., Lee, L.N., Ho, S.W., Yang, P.C. e Luh, K.T. 2001. High incidence of erythromycin resistance among clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3205-3208.

Hwang, M. N. e Ederer, G. M. 1975. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group-B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 1,114-115.

Jakson, L. A., Hilsdon, R., Farley, M., Harrison, L., Reingold, A., Wenger, J. D. e Schuchat, A. 1995. Risk factors

for group B streptococcal disease in adults. *Ann. Intern. Med.* 123, 415-420.

João, E. C.; Gouvêa, M. I.; Menezes, J. A.; Matos, H. J.; Cruz, M. L.; Rodrigues, C. A.; de Souza, M. J.; Fracalanza, S. E.; Botelho, A. C.; Calvet, G. A. & Grinstzein, B. G. 2011. Group B *Streptococcus* in a cohort of HIV-infected pregnant women: prevalence of colonization, identification and antimicrobial susceptibility profile. *Scand J Infect Dis.* 43, 742-746.

Johri A.K., Paoletti L.C., Glaser P, Dua M, Sharma P.K, Grandi G. e Rappuoli, R. 2006. Group B *Streptococcus*: Global incidence and vaccine development. *Nat Rev Microbiol.* 4, 932 – 942.

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

Lachenauer, C., Kasper, D.L., Shimada, J., Ichiman, Y., Ohtsuka, H., Kaku, M., Paoletti, L. C., Ferrieri, P. e Madoff, L. C. 1999. Serotype VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant japanese women. *J. Infect. Dis.* 179, 1030-1033.

Lamagni, T. L., Keshishian, C., Efstratiou, A., Guy, R., Henderson, K. L., Broughton, K., et al. 2013. Emerging trends in the epidemiology of invasive group B streptococcal disease in England and Wales, 1991-2010. *Clin. Infect. Dis.* 57, 682–688.

Lancefield, R.C. 1933. A serological differentiation of human and other group of haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57, 571-595.

Lancefield, R.C. 1934. A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (Group B). *J. Exp. Med.* 59, 441-458.

Le Doare K. & Heath, P.T. 2013. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine* 31, 7-12.

Le Doare K, O'Driscoll M, Turner K, Seedat F, Russell NJ, Seale AC, Heath PT, Lawn JE, Baker CJ, Bartlett L, Cutland C, Gravett MG, Ip M, Madhi SA, Rubens CE, Saha SK, Schrag S, Sobanjo-Ter Meulen A, Vekemans J, Kampmann B; GBS Intrapartum Antibiotic Investigator Group. 2017. Intrapartum Antibiotic Chemoprophylaxis Policies for the Prevention of Group B Streptococcal Disease Worldwide: Systematic Review. *Clin. Infect. Dis.* 65, S143-S151.

Li, C., Sapugahawatte, D. N., Yang, Y., Wong, K. T., Lo, N. W. e Ip, M. 2020. Multidrug-Resistant *Streptococcus agalactiae* Strains Found in Human and Fish with High Penicillin and Cefotaxime Non-Susceptibilities. *Microorganisms* 8(7), 1055.

Longtin, J., Vermeiren, C., Shahinas, D., Tamber, G.S., Mcgeer, A., Low, D.E., Katz, K., Pillai, D.R. 2011. Novel mutations in a patient isolate of *Streptococcus agalactiae* with reduced penicillin susceptibility emerging after long-term oral suppressive therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2983-2985.

Lopardo, H.A., Vidal, P., Jeric, P., Centron, D., Paganini, H., Facklam, R.R. & Elliott, J.; Argentinian Streptococcus Study Group. 2003. Six-month multicenter study on invasive infections due to group B streptococci in Argentina. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4688-4694.

Marconi, C., Rocchetti, T. T., Rall, V. L., Carvalho, L. R., Borges, V. T., Silva, M. G. 2010. Detection of *Streptococcus agalactiae* colonization in pregnant women by using combined swab cultures: cross-sectional prevalence study. *São Paulo Med,* 128, p. 60-62.

Martins, E. R.; Andreu, A.; Correia, P.; Juncosa, T.; Bosch, J.; Ramirez, M.; e Melo- Cristino, J. 2011. Group B streptococci causing neonatal infections in Barcelona are a stable clonal population: 18-year surveillance. *J Clin Microbiol.* 49, 2911-2918.

McCracken, G.H. 1973. Group B streptococci: the new challenge in neonatal infections. *J. Pediatr.* 82, 703- 706.

Melin, P. & Efstratiou, A. 2013. Group B streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries. *Vaccine* 31, 31-42.

Miró, E., Rebollo, M., Rivera, A., Álvarez, M.T., Navarro, F., Mirelis, B. e Coll, P. 2006. *Streptococcus agalactiae* altamente resistente a fluoroquinolonas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24, 562-563.

- Muñoz, P., Llancaqueo, A., Rodríguez-Créixems, M., Peláez, T., Martín, L., Bouza, E. 1997. Arch Intern Med. 27, 213-216.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S e Pfaller, M.A. 2020. Microbiologia Médica. 9 ed, Elsevier.
- Nagano, N.; Nagano, Y.; Toyama, M.; Kimura, K.; Tamura, T.; Shibayama, K.; & Arakawa, Y. 2012. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. J Antimicrob. Chemother. 67, 848-856.
- Nakamura, P. A. M.; Schuab, R. B. B.; Neves, F. P. G.; Pereira, C. F. A.; De Paula, G. R. e Barros, R. R. 2011. Antimicrobial resistance profiles and genetic characterisation of macrolide resistant isolates of *Streptococcus agalactiae*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 106, 119-122.
- Nobbs, A.H., Lamont, R.J. & Jenkinson, H.F. 2009. *Streptococcus* adherence and colonization. Microbiol. Mol. Biol. Ver. 73, 407-450.
- Nomura, M.L., Passini J.R., Oliveira U.M., Calil, R. 2009. Colonização materna e neonatal por estreptococo do grupo B em situações de ruptura pré-termo de membranas e no trabalho de parto prematuro. Rev Bras Ginecol Obstet. 31(8):397-403.
- Otaguiri, E.S., Morguette, A.E., Tavares, E.R., Dos Santos, P.M., Morey, A.T., Cardoso, J.D., Perugini, M.R., Yamauchi e 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, 297-305.
- Palmeiro, J.K., Dalla-Costa, L.M., Fracalanza, S.E.L., Botelho, A.C.N, Nogueira, K.S., Scheffer, M.C., Torres, R.S.L.A., Carvalho, N.S., Cogo, L.L. & Madeira, H.M.F. 2010. Phenotypic and Genotypic characterization of group B streptococcal isolates in Southern Brazil. J. Clin. Microbiol. 48, 4397-4403.
- Paoletti, L.C. & Kasper, D.L. 2019. Surface Structures of Group B *Streptococcus* Important in Human Immunity. Microbiol. Spectr. 7(2).
- Paredes, A., Wong, P. e Mason, E. O. JR. 1976. Nosocomial transmission of group B Streptococci in a newborn nursery. Pediatrics. 59, 679-682.
- Pasternak, J. 2012. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. Einstein, 10(1), 118-119.
- Pinto, T. C.; Costa, N. S.; Vianna Souza, A. R.; Silva, L. G.; Corrêa, A. B.; Fernandes, F. G.; Oliveira, I. C.; Mattos, M. C.; Rosado, A. S. e Benchetrit, L. C. 2013. Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. Braz. J. Infect. Dis. 7, 131-136.
- Póntigo, F., Moraga, M., Flores, S.V. 2015. Molecular phylogeny and a taxonomic proposal for the genus *Streptococcus*. Genet. Mol. Res. 14, 10905-10918.
- Rajagopal L. 2009. Understanding the regulation of Group B streptococcal virulence factors. Future Microbiol. 4:201–221.
- Rosini, R., & Margarit, I. 2015. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. Front. Cel. Infect. Microbiol., 5, 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00006>
- 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.
- Sanches, G.F. & Lannes-Costa, P. S., Cristoforêto, M. C., Doran, K. S., Mattos-Guaraldi, A. L. , Nagao, P.E. 2021. *Streptococcus agalactiae* strains isolated from cancer patients in Rio de Janeiro, Brazil. Braz. J. Microbiol. 52, 303–310.
- 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.

Schuchat, A. 1998. Epidemiology of group B Streptococcal disease in the United States shifting paradigms. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 497-513.

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., Bartlett, L., Cutland, C., Gravett, M.G., Heath, P.T., Ip, M., Le Doare, K., Madhi, S.A., Rubens, C.E., Saha, S.K., Schrag, S.J., Sobanjo-Ter Meulen, A., Vekemans, J., Lawn, J.E. 2017. Estimates of the Burden of Group B Streptococcal Disease Worldwide for Pregnant Women, Stillbirths, and Children. *Clin. Infect. Dis.* 65, S200-S219.

Shabayek, S. & Spellerberg, B. 2018. Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. *Front Microbiol.* 9, 437.

Simoni S., Vincenzi C., Brenciani A., Morroni G., Bagnarelli P., Giovanetti E., et al. 2018. Molecular characterization of Italian isolates of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus agalactiae* and relationships with chloramphenicol resistance. *Microb. Drug Resist.* 24, 225–231.

Spellerberg, B., Rozdzinski, E., Martin, S., Weber-Heynemann, J., Schnitzler, N., Lütticken, R., Podbielsky, A. 1999. *Lmb*, a protein with similarities to the *Lra* adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect. Immun.* 67, 871-878.

Tazzi, A.; Morand, P.C.; Réglie-Poupet, H.; Dmytruk, N.; Billoët, A.; Antona, D.; Trieu-Cuot, P. & Poyart, C. 2011. Invasive group B streptococcal infections in adults, France (2007- 2010). *Clin Microbiol Infect*, 17, 1587-1589,

Teatero S., Athey T. B. T., Van Caesele P., Horsman G., Alexander D. C., Melano R. G., et al. 2015. Emergence of serotype IV group B *Streptococcus* adult invasive disease in Manitoba and Saskatchewan, Canada, is driven by clonal sequence type 459 strains. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2919–2926.

Wang, H., Zhao, C., He, W., Zhang, F., Zhang, L., Cao, B., Sun, Z., Xu, Y., Yang, Q., Mei, Y., Hu, B., Chu, Y., Liao, K., Yu, Y., Hu, Z., Ni, Y. 2013. High prevalence of fluoroquinolone-resistant group B streptococci among clinical isolates in China and predominance of sequence type 19 with serotype III. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1538-1541.

Weisner, A.M., Johnson, A.P., Lamagni, T.L., Arnold, E., Warner, M., Heath, P.T., Efstratiou, A. 2004. Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. *Clin. Infect. Dis.* 38,1203-1208.

WHO (2021). Group B *Streptococcus* vaccine: full value of vaccine assessment. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037526>. Acesso em: 18/07/2021.

Willems, R.J., Hanage, W.P., Bessen, D.E. e Feil, E.J. 2011. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 872-900.

Wu C. J., Lai J. F., Huang I. W., Hsieh L. Y., Wang H. Y., Shiau Y. R., et al. 2017. Multiclonal emergence of levofloxacin-resistant Group B *Streptococcus*, Taiwan. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 3263–3271.

Yook, J.H., Kim M.Y., Kim, E.J., Yang, J.H., RYU, H.M., Oh, K.Y., Shin, J.H., Foxman, B. e KI, M. 2013. Risk factors associated with group B *Streptococcus* resistant to clindamycin and erythromycin in pregnant Korean women. *Infect. Chemother.* 45, 299-307.

Zangwill, K.M., Schuchat, A., Wenger, J.D. 1992. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. *MMWR CDC Surveill Summ.* 41, 25-32.

Zhang L, Kang W-J, Zhu L, Xu L-J, Guo C, Zhang X-H, Liu Q-H e Ma L 2021. Emergence of Invasive Serotype Ib Sequence Type 10 Group B *Streptococcus* Disease in Chinese Infants Is Driven by a Tetracycline-Sensitive Clone. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 642455.