UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Streptococcus agalactiae - Distribuição sorotípica e relação com fatores de virulência e resistência antimicrobiana

Cilícia Silvério Nascimento

Dissertação para obtenção de Título de Mestre
Orientadora: Profª Drª Carla Taddei

SÃO PAULO
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Streptococcus agalactiae - Distribuição sorotípica e relação com fatores de virulência e resistência antimicrobiana

Cilícia Silvério Nascimento

Dissertação para obtenção de Título de Mestre
Orientadora: Profª Drª Carla Taddei

Versão Original

SÃO PAULO
2019

Cilicia Silvério Nascimento

Streptococcus agalactiae -Distribuição sorotípica e relação com fatores de virulência e resistência antimicrobiana

Comissão Julgadora
da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. orientador/presidente: Carla Taddei de Castro Neves

_____
1o. examinador

_____
2o. examinador

_____
3o. examinador

_____
4o. examinador

São Paulo, 28 de Janeiro de 2019.

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

Resumo

NASCIMENTO, C. S. *Streptococcus agalactiae* -Distribuição sorotípica e relação com fatores de virulência e resistência antimicrobiana. 2019. 67f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Streptococcus agalactiae, ou Estreptococo do Grupo B, é um microrganismo que encontrado na microbiota intestinal, vaginal e/ou geniturinária de 10-30% de mulheres saudáveis. A principal infecção causada por *S. agalactiae* é a sepse neonatal. O bebê pode adquirir o microrganismo durante o parto ao passar pelo canal vaginal, ou até mesmo durante a gestação, caso haja ascensão de *S. agalactiae* para o útero. Existem diversos fatores associados à infecção do feto por *S. agalactiae* quando a mãe é colonizada, tais como fator CAMP, cápsula de polissacarídeos, hialuronidase, β-citolisina/hemolisina e pili. Não existe consenso ou recomendação técnica sobre o tema no Brasil. Segundo o Caderno de Atenção Básica ao Pré-Natal, não existem estudos que levem à recomendação da antibioticoterapia intraparto. É necessário elucidar as características genotípicas de cepas de *S. agalactiae* isoladas no Brasil para alinhar as práticas clínicas às características fenotípicas do microrganismo. Desta forma, os objetivos deste projeto são: i) classificar cepas de *S. agalactiae* isoladas de gestantes e não gestantes quanto ao sorotipo capsular, por PCR Multiplex, ii) avaliar a presença e distribuição de fatores de virulência, por PCR e iii) avaliar o perfil de resistência antimicrobiana, pelo método de disco difusão e teste D. Os achados de virulência e resistência a antimicrobianos foram comparados com os sorotipos, gestação, localização geográfica e sítio de isolamento. Foram analisadas 292 cepas isoladas de gestantes e não gestantes em São Paulo, São José dos Campos e Rio de Janeiro. O sorotipo Ia foi o mais prevalente entre as cepas. Na cidade de São José dos Campos não houve diferença significativa entre a prevalência dos sorotipos Ia e V, sendo que o sorotipo V foi mais abundante do que nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro. O sorotipo II foi mais abundante em mulheres não gestantes do que gestantes. Não foram encontradas cepas resistentes à Penicilina e vancomicina; contudo a resistência a Cefepima, Eritromicina e Clindamicina ficou em torno de 22%. Foram encontradas diferenças entre os sorotipos quanto à resistência, genes de virulência e sítio de isolamento das cepas. Portanto essas diferenças podem se refletir no perfil epidemiológico da infecção por *S. agalactiae* quanto à localização geográfica também quanto à gestação. A incidência de sepse causada por *S. agalactiae* diminuiu muito nas últimas décadas, contudo o monitoramento constante é necessário para alinhar as práticas clínicas às características fenotípicas do microrganismo.

Palavras-chave: Estreptococos do grupo B, sepse, gestação, resistência, virulência.

Abstract

NASCIMENTO, C. S. *Streptococcus agalactiae* –Serotype distriburion and correlation with virulence factors and antibiotic resistance. 2019. 67f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Streptococcus agalactiae, or Group B Streptococcus, is a microorganism found in intestinal, vaginal and/or genitourinary microbiota from about 10-30% of all healthy women. The main infection caused by *S. agalactiae* is neonatal sepsis. The baby can contract the infection during labor when passing through the vaginal canal, or even during pregnancy, if *S. agalactiae* ascends from the vaginal canal to the uterus. There are several factors associated to the infection of the fetus by *S. agalactiae* when the mother is colonized, such as the CAMP factor, polysaccharide capsule, hyaluronidase, β-cytolysin/hemolysin and pili. There is no consensus or technical recommendation regarding this theme in Brazil. According to the Brazilian guidelines to prenatal care, there is no research that justifies the implementation of intrapartum antibiotic therapy. There is a need to clarify genotype characteristics of *S. agalactiae* strains isolated in Brazil in order to align clinical practices to phenotypical characteristics of this microorganism. This way, the goals of this project are: i) to classify *S. agalactiae* strains isolated from pregnant and nonpregnant women according to their capsular serotype, using PCR Multiplex, ii) to evaluate the presence and distribution of virulence factors, using PCR and iii) to evaluate their antibiotic resistance profile, using disk-diffusion and D-zone tests. The findings regarding virulence and resistance were compared to serotypes, pregnancy, geographic localization and the site where the sample was isolated. A total of 292 strains from pregnant and nonpregnant women from the cities of São Paulo, São José dos Campos and Rio de Janeiro were analyzed. Serotype Ia was the most prevalent among the strains. In São José dos Campos there was no significate difference in the prevalence of serotypes Ia and V. Serotype V was the most abundant in São Paulo and Rio de Janeiro. Serotype II was most prevalent in nonpregnant women when compared to pregnant women. No resistance to Penicillin nor Vancomycin was found. However, resistance to Cefepime, Erythromycin or Clindamycin was found in around 22% of strains. There were differences among serotypes regarding resistance, virulence genes and site where the strain was isolated. Therefore these differences can reflect into the epidemiologic profile of *S. agalactiae* infection in regards to geographic localization and pregnancy. The incidence of sepsis caused by *S. agalactiae* has decrease in the last few decades, however constant monitoring is necessary in order to align clinical practice to the microorganism's phenotypical characteristics.

Keywords: Group B Streptococcus, sepsis, pregnancy, resistance, virulence.

Sumário

Resumo 3
Abstract 4
Lista de figuras 6
1. Introdução 7
1.1 Epidemiologia 8
1.2 Caracterização microbiológica 10
1.3 Antibioticoterapia e Resistência 11
1.4 Fatores de virulência 12
1.5 Sorotipo Capsular 15
2. Justificativa 16
3. Objetivos 18
3.1 Gerais 18
3.2 Específicos 18
4. Materiais e métodos 19
4.1 Cepas 19
4.2 Extração de DNA 19
4.3 Pesquisa dos sorotipos capsulares 21
4.5 Pesquisa dos genes de virulência 22
4.6 Testes de resistência a antimicrobianos 23
4.7 Análise estatística 24
5. Resultados 25
5.1 Sorotipos 25
5.2 Sítio de isolamento 30
5.3 Virulência 33
5.4 Resistência 40
6. Discussão 45
7. Conclusão 55
9. Referências 57

Lista de figuras

FIGURA 1: AMOSTRAS PADRÃO DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE.* FILEIRA 1: LADDER 100BP; FILEIRA 2: SOROTIPO IA; FILEIRA 3: SOROTIPO IB; FILEIRA 4: SOROTIPO II; FILEIRA 5: SOROTIPO III; FILEIRA 6: SOROTIPO IV; FILEIRA 7: SOROTIPO VI; FILEIRA 8: SOROTIPO V. 25
FIGURA 2: DISTRIBUIÇÃO DOS SOROTIPOS CAPSULARES DAS 292 CEPAS NAS CIDADES DE SÃO PAULO, RIO DE JANEIRO E SÃO JOSÉ DOS CAMPOS. (*P<0,05) 26
FIGURA 3: GEL DE ELETROFORESE DAS CEPAS PADRÃO DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* SEGUIDAS DE 17 CEPAS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS 27
FIGURA 4: DISTRIBUIÇÃO DE SOROTIPOS ENTRE OS GRUPOS DE MULHERES GESTANTES E NÃO GESTANTES; (A) RESULTADOS TOTAIS, (B) CIDADE DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, (C) CIDADE DE SÃO PAULO. (*P<0,05) 29
FIGURA 5: DISTRIBUIÇÃO DE SOROTIPOS CAPSULARES QUANTO AO SÍTIO DE ISOLAMENTO NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO. 30
FIGURA 6: DISTRIBUIÇÃO DE SOROTIPOS CAPSULARES QUANTO AO SÍTIO DE ISOLAMENTO NA CIDADE DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS EM (A) MULHERES GESTANTES E (B) MULHERES NÃO GESTANTES. (*P<0,05; **P<0,0001) 31
FIGURA 7: DISTRIBUIÇÃO DE SOROTIPOS CAPSULARES QUANTO AO SÍTIO DE ISOLAMENTO NA CIDADE DE SÃO PAULO EM (A) MULHERES GESTANTES E (B) MULHERES NÃO GESTANTES. (P<0,05) 32
FIGURA 8: PREVALÊNCIA DE GENES DE VIRULÊNCIA ENTRE OS SOROTIPOS DE EGB DE TRÊS LOCALIDADES (RIO DE JANEIRO, SÃO JOSÉ DOS CAMPOS E SÃO PAULO) 33
FIGURA 9: DISTRIBUIÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE ACORDO COM SOROTIPOS CAPSULARES EM MULHERES GESTANTES E NÃO GESTANTES; (A) RESULTADOS TOTAIS, (B) MULHERES GESTANTES, (C) MULHERES NÃO GESTANTES. (*P<0,05; **P<0,0001) 34
FIGURA 10: PREVALÊNCIA DE GENES DE VIRULÊNCIA ENTRE OS SOROTIPOS DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B (A) NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO, (B) SÃO JOSÉ DOS CAMPOS E (C) SÃO PAULO. (*P<0,05) 36
FIGURA 11: PREVALÊNCIA DE GENES DE VIRULÊNCIA ENTRE OS SOROTIPOS DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B DE ACORDO COM O SÍTIO DE ISOLAMENTO DA AMOSTRA NO (A) RIO DE JANEIRO, (B) SÃO JOSÉ DOS CAMPOS E (C) SÃO PAULO. (*P<0,05) 39
FIGURA 12: CEPAS RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS EM TRÊS LOCALIDADES. (A) CEPAS RESISTENTES POR SOROTIPOS E (B) DETECÇÃO FENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA A MACROLÍDEOS, LINCOSAMIDAS E ESTREPTOGRAMINAS (MLSB). 40
FIGURA 13: DISTRIBUIÇÃO DE CEPAS RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS DE ACORDO COM O SOROTIPO CAPSULAR NA (A) CIDADE DO RIO DE JANEIRO, (B) SÃO JOSÉ DOS CAMPOS E (C) SÃO PAULO. (*P<0,005) 43
FIGURA 14: DETECÇÃO FENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA A MACROLÍDEOS, LINCOSAMIDAS E ESTREPTOGRAMINAS (MLS); SENDO QUE IMLSB: RESISTÊNCIA INDUZIDA, CMLSB: RESISTÊNCIA CONSTITUTIVA EM CEPAS PROVENIENTES DO (A) RIO DE JANEIRO, (B) SÃO JOSÉ DOS CAMPOS E (C) SÃO PAULO 44

1. Introdução

O período gestacional resulta em muitas mudanças no organismo da gestante, flutuações hormonais causam alterações tanto metabólicas quanto endócrinas, inclusive afetando o sistema imunológico (MAGON; KUMAR, 2012). Durante uma gravidez saudável há variações na microbiota residente nos diferentes sítios do organismo, destacando-se o trato gastrointestinal e genitourinário (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2005; NURIEL-OHAYON; NEUMAN; KOREN, 2016). *Streptococcus agalactiae* ou Estreptococos do Grupo B (EGB) pode integrar a microbiota vaginal e intestinal sem causar sintomas (ROSEN et al., 2017); contudo, EGB são a causa mais comum de sepse neonatal (EDMOND et al., 2012).

Bacteriúria com cultura positiva para EGB é um dos principais fatores de risco da sepse neonatal (BENITZ; GOULD; DRUZIN, 1999; EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011), pois o canal vaginal é uma das rotas de transmissão do microrganismo para o feto. Além da sua capacidade de adesão à mucosa vaginal, EGB têm fatores de virulência que permitem a ascensão ao útero e até mesmo penetração da placenta, causando bacteremia ao feto durante a gestação (DORAN; NIZET, 2004; EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011).

A sepse neonatal pode ser classificada de acordo com o aparecimento dos sintomas como: precoce, nos primeiros seis dias de vida, ou tardia, a partir de uma semana até oitenta e nove dias de vida (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011; PHARES et al., 2008). A doença de início precoce é caracterizada pelo aparecimento de pneumonia, hipóxia, taquipneia, cianose, e hipertensão pulmonar, resultado da densa infiltração de microrganismos (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011), posteriormente há a disseminação bacteriana na corrente sanguínea ocasionando a septicemia. Já na doença de forma tardia o bebê apresenta septicemia associada à meningite em 70% dos casos (TAZI et al, 2012).

1.1 Epidemiologia

Até o final do século XX, Estreptococos do Grupo B eram considerados apenas como causa da mastite bovina, até ser isolado de casos fatais de sepse puerperal e secreções vaginais de mulheres assintomáticas na década de 1960 nos Estados Unidos (ROSEN et al., 2017; SCHRAG et al., 2005; TAMINATO et al., 2011). Um estudo multicêntrico envolvendo 52.406 nascimentos, realizado nos Estados Unidos, reportou EGB como o agente mais prevalente nos casos de sepse neonatal precoce (SCHUCHAT, 1998). Dentre as infecções neonatais causadas por EGB, destacam-se a septicemia e a pneumonia e, em menor incidência, meningite, celulite, osteomielite e artrite séptica (SCHRAG et al., 2005; TAMINATO et al., 2011). Segundo dados obtidos nos Estados Unidos, a taxa de colonização em recém-nascidos de mulheres colonizadas está entre 50-70% (DORAN; NIZET, 2004), sendo que a taxa de colonização entre mulheres gestantes está entre 10% e 30% (SCHRAG et al., 2005).

Um estudo retrospectivo espanhol em que foram analisados todos os casos de sepse neonatal precoce durante sete anos, de 2004 a 2010, mostrou que entre 0,18 e 0,47% de todos os bebês nascidos foram diagnosticados com sepse neonatal, não havendo diferença significativa durante esses anos. Foram 49 casos de sepse em recém-nascidos, de 48 mães; destas, em 38 foi feita a pesquisa de EGB, sendo 68,5% dos resultados negativos. Mesmo nas gestantes em que não foi feita a pesquisa, mas que apresentaram fatores de risco, como febre intraparto, com temperatura maior ou igual a 38ºC, ruptura prolongada de membranas, durante 18h ou mais, e parto prematuro, antes de 37 semanas, não foi feita a profilaxia adequada. Tais resultados demonstram a importância de se seguir os protocolos de prevenção, e, além disso, manter-se um monitoramento pré-natal eficiente (GIMÉNEZ et al., 2015).

A administração de antibióticos intraparto reduziu os casos de sepse neonatal em até 80%, entre 1990 e 2000; contudo, a sepse precoce tem mantido incidência estável, e predomina sobre a sepse tardia, na maioria dos países (EDMOND et al., 2012). Tanto a

incidência de sepse por EGB quanto a sua mortalidade variam em países desenvolvidos e em desenvolvimento, segundo uma meta-análise que incluiu publicações de 36 países diferentes; a incidência de sepse tanto precoce quanto tardia foi maior no continente Africano, seguido das Américas (EDMOND et al., 2012).

As primeiras publicações brasileiras são da década de 1980, observando a transmissão de Estreptococos da mãe para o feto durante, ou até mesmo antes do parto (BENCHETRIT et al., 1982). Estudos brasileiros retrospectivos demonstram uma variação na prevalência; entre 2003 e 2004 a prevalência de EGB entre as gestantes no Rio de Janeiro foi de 19,2% (BORGER et al., 2005); durante o mesmo período um estudo em Londrina, Paraná encontrou 14,9% de prevalência (BERALDO et al., 2004), e outro em Florianópolis, Santa Catarina, obteve 21,6% (POGERE, 2005).

No estado de São Paulo, na cidade de Jundiaí, entre 2003 e 2004, a prevalência foi de 14,6% (SIMOES et al., 2007); no período entre 2006 e 2007, na cidade de Botucatu foi de 25,4% (MARCONI et al., 2010); na capital do estado a prevalência foi de 17,4% entre 2009 e 2010 (FUNÇÃO; NARCHI, 2013). No Nordeste, no estado da Bahia, um estudo encontrou uma prevalência semelhante, 17,4% (OLIVEIRA; TELES; VIANA, 2013); já no Ceará, houve uma baixa prevalência com apenas 4,2% (LINHARES et al., 2011). No Maranhão a prevalência foi de 20,4% entre 2005 e 2006 (COSTA et al., 2008).

Estudos regionais estão restritos a poucas unidades de saúde e podem não abranger toda a população de mulheres gestantes, mesmo assim, observa-se a grande variação entre as localidades, por isso é necessário o monitoramento constante de EGB. Além disso, a prevalência demonstra que, Estreptococos do Grupo B é comum em mulheres, e sepse neonatal é um risco que pode ser evitado (NOMURA et al., 2009; SCHRAG et al., 2005).

São necessários estudos brasileiros, regionais, demonstrando a incidência de sepse e que consequentemente possam direcionar a profilaxia e recomendações. Ademais, não existem estudos nacionais que avaliem o custo-efetividade (riscos *versus* benefícios) da profilaxia intraparto (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Há ainda um agravante na atenção básica de saúde: o elevado número de gestantes que não fazem o pré-natal

adequado e desta forma desconhece a positividade de colonização da microbiota vaginal por EGB.

1.2 Caracterização microbiológica

Rebecca Lancefield classificou os diferentes grupos de Estreptococos hemolíticos de acordo com características bioquímicas e de cultura, utilizando um teste de precipitina anti-C, que é um anticorpo de soro de coelhos específico para o carboidrato C (LANCEFIELD, 1933; MADIGAN et al., 2012). *Streptococcus agalactiae* é positivo para fermentação de trealose e hidrólise de hipurato de sódio, juntamente com as características do teste de precipitina, e ficou conhecido como é hoje: Estreptococos do Grupo B (EGB) (LANCEFIELD, 1933; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A identificação de EGB, de acordo com a ANVISA, começa com a prova negativa da catalase, para diferenciação entre estreptococos e estafilococos (ANVISA, 2004). Para determinar a espécie, podem ser feitos os testes CAMP (ANVISA, 2004; CHRISTINE; ATKINS; MUNCH-PETERSEN, 1944), hidrólise de hipurato, sensibilidade à bacitracina e Sulfametoxazol Trimetoprim (SXT), teste de bile esculina, que consiste na hidrólise de esculina na presença de bile, e tolerância a NaCl 6,5% (ANVISA, 2004; MADIGAN et al., 2012; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; TRABULSI, 2004).

EGB não possui catalase, que é uma enzima capaz de decompor peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água, logo apresenta teste da catalase negativo. (CHRISTINE; ATKINS; MUNCH-PETERSEN, 1944; LANG; PALMER, 2003; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). EGB é capaz de hidrolisar hipurato, é resistente à bacitracina e à SXT, não cresce na presença de sais biliares, sendo o teste da bile-esculina negativo, assim como a tolerância a NaCl (CHRISTINE; ATKINS; MUNCH-PETERSEN, 1944; TRABULSI, 2004).

Microscopicamente, são cocos Gram positivos e vistos aos pares ou cadeias curtas. São imóveis e não esporulados. Considerando o metabolismo energético, são classificados como anaeróbios facultativos, obtendo energia através da fermentação, mas podem fazer respiração na presença de heme e quinona (TRABULSI, 2004; YAMAMOTO et al., 2005).

1.3 Antibioticoterapia e Resistência

Atualmente, o CDC recomenda antibioticoterapia intraparto para gestantes que já tiveram filhos com EGB, gestantes diagnosticadas com bacteriúria por EGB, mulheres cujos testes durante o pré-natal confirmaram presença de EGB, mulheres em que não foi feita a pesquisa de EGB ou onde resultado é desconhecido e cujo parto é prematuro (antes de 37 semanas), mulheres com temperatura maior do que 38ºC ou com ruptura de membrana por 18h ou mais (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010).

O rastreamento adequado de todas as gestantes no período do pré-natal acontece entre a 35ª e a 37ª semana de gestação, caso o teste seja positivo para EGB, o recomendado é o tratamento intraparto, que consiste na administração endovenosa de Penicilina G cristalina a cada 4 horas até a expulsão completa do bebê. Recomenda-se que pelo menos duas doses de antibiótico sejam administradas antes do trabalho de parto expulsivo (BORGER et al., 2005; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010; VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010). A Sociedade Brasileira de Pediatria também recomenda a triagem universal no combate à septicemia neonatal por EGB (COSTA, 2011).

Apesar da eficiência da antibioticoterapia profilática na prevenção da sepse neonatal (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al., 2010), houve um aumento na prevalência de cepas resistentes a alguns dos antibióticos recomendados nas diretrizes do CDC, tais como Eritromicina e Clindamicina (MANNING et al., 2003; TEATERO et al., 2017). Alguns protocolos deixaram de recomendar o uso de Eritromicina devido à resistência

encontrada em cepas de EGB (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al., 2010; TEATERO et al., 2017).

Eritromicina pertence à família dos Macrolídeos, e Clindamicina pertence à família das Lincosamidas (LECLERCQ, 2002). Um dos principais mecanismos de resistência a Eritromicina e Clindamicina é a presença de genes *erm (erythromycin ribosome methylase)* e genes *mef (macrolide efflux)* (MARIMÓN et al., 2005). A presença de Erm metilase (gene *erm)* resulta na resistência a Macrolídeos, Lincosaminas e Streptograminas B, conhecido como fenótipo MLSB (AZAVEDO et al., 2001; LECLERCQ, 2002). O fenótipo MSLB pode ser expresso de forma induzida (iMLSB) ou constitutiva (cMLSB); na resistência induzida, o RNA mensageiro (*mRNA)* que codifica a metilase está inativo no microrganismo, ele só é ativado na presença de um macrolídeo indutor, na resistência constitutiva o *mRNA* que codifica metilase já está ativo no microrganismo (LECLERCQ, 2002).

É possível observar a presença desses genes de resistência através do teste de indução, utilizando dois discos de antimicrobianos, Clindamicina e Eritromicina, que são semeados a aproximadamente 12mm de distância (CLSI, 2018; OPLUSTIL et al., 2010). O achatamento do halo de Clindamicina indica a presença do gene *erm* (LECLERCQ, 2002; OPLUSTIL et al., 2010). Este resultado indica a resistência tanto à Eritromicina quanto à Clindamicina (LECLERCQ, 2002; OPLUSTIL et al., 2010). Segundo o Caderno de Atenção Básica de Saúde no Pré-Natal, a recomendação da antibioticoterapia intraparto e a pesquisa de EGB são protocolos cuja aplicação não é suportada por evidências suficientes (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Portanto são necessários estudos que avaliem a eficiência da profilaxia intraparto demonstrando a resistência a estes antimicrobianos em cepas isoladas no Brasil.

1.4 Fatores de virulência

Quando cultivado juntamente com *Staphylococcus aureus,* EGB produz uma zona de hemólise diferenciada, formando uma seta; essa é a chamada reação de CAMP, e é

utilizada amplamente para identificação de EGB (BROOKS et al., 2009; CHRISTINE; ATKINS; MUNCH-PETERSEN, 1944; TRABULSI, 2004). Esta reação resulta da ação conjunta da β-toxina (esfingomielinase) do *S. aureus* com o fator CAMP, uma proteína do EGB. O fator CAMP (ou proteína B) foi descrito como um fator de virulência importante desta espécie bacteriana, envolvido na morte celular e inibição do sistema imune do hospedeiro (CHRISTINE; ATKINS; MUNCH-PETERSEN, 1944; HENSLER et al., 2008; JURGENS; STERZIK; FEHRENBACH, 1987).

In vitro, o fator CAMP se liga à membrana de eritrócitos levando à hemólise, sendo que a afinidade da proteína à membrana aumenta se esta for previamente tratada com esfingomielinase, produzida por *S. aureus.* O fator CAMP liga-se à membrana plasmática e forma oligômeros que geram poros na membrana e, através de um mecanismo colóide osmótico, o influxo de água leva ao rompimento da célula (LANG; PALMER, 2003). Por ter sido observado primariamente em ágar sangue, a proteína B é constantemente associada à hemólise, contudo a ligação entra fator CAMP e membrana plasmática é inespecífica, por ligar-se às GPIs (Glicosilfosfatidilinositol) que são proteínas de ancoragem; quaisquer receptores ou proteínas contendo uma sequência GPI é um alvo, estando na membrana de eritrócidos ou de outras células (LANG et al., 2007).

S. agalactiae ativa a resposta imune inata quando é fagocitado, formando poros oligoméricos, como os observados na membrana de eritrócitos, na membrana do fagolisossomo. Sendo assim, o mecanismo de virulência mediado pelo fator CAMP é a lise da membrana do fagolisossomo, assim EGB chega, de forma íntegra ou apenas seus componentes e material genético, no citosol, o que ativa a resposta inflamatória do hospedeiro (CHARREL-DENNIS et al., 2008).

EGB possui uma cápsula de polissacarídeos, formada por unidades repetitivas, cujas variações estruturais determinam os dez sorotipos capsulares; a cápsula também é considerada um fator de virulência relevante (CIESLEWICZ et al., 2005; TRABULSI, 2004; WESSELS, 1997). Microrganismos adquiriram polissacarídeos capsulares para proteção contra fatores ambientais e fatores do hospedeiro; a indução de citocinas pró-inflamatórias e

a proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro fazem da cápsula o fator de virulência mais importante dos Estreptococos do Grupo B (TRABULSI, 2004; WESSELS, 1997). É possível associar os sorotipos mais prevalentes com a incidência de doenças invasivas (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011), por exemplo, o sorotipo III está frequentemente associado à meningite, e é responsável por 60-85% dos casos de sepse tardia (ALHHAZMI; HURTEAU; TYRRELL, 2016a; BELLAIS et al., 2012; EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011).

Além do sorotipo capsular e a presença do fator CAMP, que são fatores intrínsecos do EGB, este microrganismo possui outros fatores de virulência. Um deles é o gene cylE que está no locus *cyl* em *S. agalactiae,* é necessário para produção de β-hemolisina/citolisina (β-H/C), e é tóxica para uma ampla variedade de células eucarióticas, resultando na invasão celular e evasão de fagocitose (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011; PRITZLAFF et al., 2001). Outro exemplo é o gene *hylB*, que codifica uma hialuronidase capaz de lisar hialuronato, um componente da matriz extracelular de tecidos humanos (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011). O papel da hialuronidase está relacionado à invasão do microrganismo durante a infecção, também pode promover uma colonização permanente no canal vaginal (BAKER; PRITCHARD, 2000).

A análise do genoma de cepas de Estreptococos do Grupo B revelou ilhas de patogenicidade, conhecidas como ilhas de pili (ou PI). O pilus é observado em microscopia eletrônica como estruturas que se estendem a partir da superfície bacteriana (LAUER, 2005). Atualmente, três variações de PI são conhecidas e foram identificadas em EGB, PI-1, PI-2a e PI-2b; pili induz uma resposta imune de proteção, e é útil para adesão ao epitélio do hospedeiro e à matriz extracelular (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011; ROSINI et al., 2006), além de participar no processo de formação de biofilme (ROSINI; MARGARIT, 2015).

A distribuição de ilhas de pili pode determinar a capacidade desse microrganismo de colonizar ou causar infecções invasivas (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). Cepas de origem humana normalmente possuem a ilha de pili 1 associada à uma das ilhas de pili 2, além disso, um clone de EGB conhecido por sua hipervirulento (ST-17) tem pili 2b

conservada em seu genoma. A associação de pili 1 e pili 2b é comumente encontrada em EGB isolado de doenças neonatais (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). Portanto além de ser importante para a colonização e infecção, a variabilidade de ilhas de pili pode ajudar a compreender o perfil patogênico do microrganismo.

1.5 Sorotipo Capsular

S. agalactiae pode ser classificado em sorotipos; um estudo pelo mesmo grupo que propôs a denominação de Estreptococos do Grupo B avaliou as propriedades de um polissacarídeo conhecido como “substância S” e propôs três sorotipos, I, II e III. (LANCEFIELD, 1933). Atualmente, são conhecidos dez sorotipos, Ia, Ib, e II ao IX; a reação de aglutinação, baseada nos polissacarídeos capsulares é a forma mais comum de diferenciação entre os sorotipos (CIESLEWICZ et al., 2005; SLOTVED et al., 2007; WESSELS, 1997); sendo que todos podem ser associados a infecções em humanos (CIESLEWICZ et al., 2005; SLOTVED et al., 2007).

O grupo de genes que codifica os polissacarídeos capsulares, em inglês *cps* (*capsular polysaccharides*), é composto pelos genes *cps*A-O, *cps*R, cpsS e *cps*Y (CIESLEWICZ et al., 2005; KAPATAI et al., 2017; MANNING et al., 2005). Contudo, nem todos os sorotipos possuem necessariamente todos os genes desse grupo, ou não estão no mesmo *locus,* por exemplo, o sorotipo II possui tais genes em uma região completamente diferente do genoma (MARTINS; MELO-CRISTINO; RAMIREZ, 2007).

A estrutura do polissacarídeo capsular tem um papel importante na evasão do sistema imunológico, por ser semelhante aos carboidratos encontrados nas células do hospedeiro (CIESLEWICZ et al., 2005; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018), o que pode ter contribuído para o surgimento de novos sorotipos (CIESLEWICZ et al., 2005). Além disso, a capacidade de alterar a estrutura do polissacarídeo capsular e a variabilidade de sorotipos são recursos muito importantes na evasão do sistema imunológico, além de representar um obstáculo no desenvolvimento de vacinas antígeno-específicas (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018).

Os sorotipos Ia, Ib, II, III, e V são os mais prevalentes no trato vaginal em mulheres ao redor do mundo (KWATRA et al., 2016; RUSSELL et al., 2017). Porém existem variações na prevalência desses sorotipos entre as diferentes localidades (KWATRA et al., 2016; RUSSELL et al., 2017). Os diferentes sorotipos capsulares estão relacionados à diferentes doenças, há uma possível associação entre sorotipos capsulares e a patogenicidade do microrganismo. Por exemplo, EGB pode causar doenças em mulheres durante a gestação, nestes casos, os sorotipos Ia e III são os mais prevalentes mundialmente (HALL et al., 2017). Além disso, 90% dos casos de sepse tardia causada por EGB estão associadas ao sorotipo III (PHARES et al., 2008), que também está associado à meningite nos casos de sepse (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). Há também uma alta prevalência dos sorotipos Ia e V entre doenças invasivas em indivíduos não gestantes (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). Portanto, algumas associações podem ser feitas entre incidência de sorotipos e a prevalência de determinadas doenças. Estudos de prevalência de sorotipos podem ajudar a entender o perfil patológico de EGB.

2. Justificativa

A ampla variedade de manifestações clínicas causadas pelo EGB reflete uma adaptação eficaz das bactérias aos diferentes ambientes hospedeiros. Diversas pesquisas têm demonstrado que, na ocorrência de doenças e óbitos, os sorotipos com maior incidência são: Ia, Ib, II, III, e V (SCHUCHAT, 1998). Não existe consenso ou recomendação técnica sobre o tema no Brasil. Segundo o Caderno de Atenção Básica ao Pré-Natal, ainda não existem estudos que avaliem o custo-efetividade da antibioticoterapia profilática intraparto, como recomendada em países como Estados Unidos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Mais estudos são necessários para avaliar a distribuição dos sorotipos das cepas de EGB isoladas de mulheres gestantes e não gestantes no Brasil. Também é necessária a

verificação da presença de fatores de virulência e pesquisa da sensibilidade a antibióticos, a fim de elucidar o panorama de Estreptococos do Grupo B.

3. Objetivos

3.1 Gerais

Avaliar a distribuição de sorotipos entre cepas de EGB isoladas em três cidades do Brasil, São Paulo, São José dos Campos e Rio de Janeiro e relacionar os achados com padrão de resistência a antimicrobianos e genes de proteínas de virulência. Os resultados obtidos com esse projeto poderão revelar o potencial patogênico de cepas de EGB isoladas em gestantes no Brasil.

3.2 Específicos

I. Classificar cepas de Estreptococos do Grupo B isoladas de gestantes e não gestantes quanto ao sorotipo capsular;

II. Analisar a presença e distribuição de fatores de virulência;

III. Analisar o perfil de resistência a antimicrobianos;

IV. Correlacionar os achados de virulência e resistência a antimicrobianos com os sorotipos;

V. Relacionar os perfis genotípicos de cada cepa com o sítio de isolamento da amostra;

VI. Correlacionar os dados com a gestação e localidade geográfica.

4. Materiais e métodos

4.1 Cepas

As cepas de EGB foram obtidas de três diferentes localidades da Região Sudeste do Brasil: 92 cepas do banco de cepas do Serviço de Laboratório do Hospital Universitário (HU) da Universidade de São Paulo (USP), 101 cepas do banco de cepas do laboratório DASA, em São José dos Campos (SP), e 104 cepas do banco de cepas do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ (cedidas pelo Prof. Sérgio Fracalanzza), destas, cinco cepas não sobreviveram, foram utilizadas 99 cepas nas análises. Todas as cepas foram obtidas de bacteriotecas. A seleção dessas cepas para o projeto foi baseada nos seguintes critérios: somente pacientes adultas e saudáveis do sexo feminino, gestantes ou não, e ano de coleta (2010 a 2017 para a cidade de São Paulo, e 2017 para as cidades de São José dos Campos e Rio de Janeiro).

As amostras foram repicadas a partir dos meios de estoque em Ágar sangue (5% de sangue de carneiro), e confirmadas como *S. agalactiae*, pelo teste de CAMP em Ágar Sangue. Um novo estoque foi realizado em microtubos contendo caldo TSB e 10% de glicerol, e os mesmos forma mantidos a -80°C até momento do uso.

Cepas padrões dos diferentes sorogrupos de *S. agalactiae* foram utilizadas para a padronização das análises. As cepas foram cedidas pelo Prof. Sérgio Fracalanzza e previamente descritas (IMPERI et al., 2010)

4.2 Extração de DNA

O DNA das cepas selecionadas foi extraído utilizando o WIZARD® GENOMIC DNA PURIFICATION KIT (Promega, USA), com algumas modificações, a saber: as cepas foram cultivadas *overnight* em Ágar sangue. Cepas foram transferidas para microtubos contendo

água deionizada e autoclavada. Os microtubos contendo as culturas puras foram centrifugados a 16,000 RPM durante 5 minutos; o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspendidas em 480µl de EDTA a 50mM. Foram adicionados 120 µl de Lisozima a 10 mg/ml. As amostras foram incubadas a 37 ºC durante 45 minutos; após a incubação foram centrifugadas a 16,000 RPM durante 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 600 µl da Solução *Nuclei Lysis Solution*; a seguir, as amostras foram incubadas a 80 ºC durante 10 minutos. Após resfriar a amostra até atingir a temperatura ambiente, foram adicionados 3 µl de Solução de RNAse às cepas, homogeneizando por inversão. As cepas foram incubadas a 37 ºC durante 45 minutos, e resfriadas até atingir a temperatura ambiente; 200 µl de acetato de sódio a 3M foram acrescentados às amostras, que foram homogeneizadas em vórtex por 20 segundos e incubadas no gelo durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 16,000 RPM durante 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1.5 ml contendo 600 µl de isopropanol, em temperatura ambiente. As cepas foram homogeneizadas por inversão durante aproximadamente 10 minutos até que fossem observadas “fibras” nos tubos. Novamente, as cepas foram centrifugadas a 14,000 RPM durante 5 minutos à 4 ºC. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 600 µl de etanol (70%), homogeneizado por inversão até que o *pellet* fosse dissolvido; então as amostras foram centrifugadas a 16,000 RPM durante 5 minutos à 4 ºC. Após remoção do etanol, a fim de secá-lo completamente, as amostras, com tampa aberta, foram incubadas em fluxo laminar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para a diluição foram utilizados 100 µl de água estéril destilada e deionizada. O DNA extraído foi armazenado à - 20 ºC e foi usado como molde nas reações de PCR Multiplex para determinação de sorotipo capsular e de PCR para a pesquisa de fatores de virulência.

4.3 Pesquisa dos sorotipos capsulares

O sorotipo capsular foi determinado por PCR multiplex, utilizando *primer*s listados na Tabela 1. Segundo os autores, os *primers* foram obtidos utilizando a sequência dos genes *cps*D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O para identificação dos sorotipos Ia a VIII; para a identificação do sorotipo IX os *primers* foram desenhados a partir de um fragmento do gene *cps*G ao *cps*L. Um par de *primers* foi acrescentado como controle da reação, desenhado a partir de uma região conservada do gene *cps*L, resultando num fragmento de 688pb, que pode ser observado em gel, presente em todos os sorotipos (IMPERI et al., 2010).

Os componentes da reação estão descritos a seguir: 2,5µl de tampão (buffer 1x) de PCR; $MgCl_2$ a 1,5 mM; nucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP a 100 µM; iniciadores (*primers*) 1 (cpsI-Ia-6-7-F) e 16 (cpsI-7-9-F) a uma concentração de 400nM, e demais *primers* a 250nM; 3U de High Fidelity Taq DNA polimerase (Life Technologies); e 2 µl de DNA; água foi utilizada para atingir o volume final de 25 µl. O material foiamplificado por desnaturação durante 5 min a 95 °C, seguido por 15 ciclos de 95 °C durante 60 s, 54 °C durante 60 s, e 72 °C por 2 min e, em seguida serão adicionados mais 25 ciclos de 95 °C por 60 s, 56 °C durante 60 s, e 72 °C durante 2 min e um ciclo final de 72 °C durante 10 min (IMPERI et al, 2010). Os resultados das reações foram analisados em gel de agarose 2%, após corrida eletroforética a 100 mV e coloração do gel em gel red. Utilizando escala de 100bp (Thermo Fisher)

Tabela 1. **Nome e sequência dos *primer*s que serão utilizados na reação de Multiplex PCR para a sorotipagem capsular. (IMPERI et al., 2010)**

Primer	Sequência 5'---3'
cpsI-Ia-6-7-F	GAATTGATAACTTTTGTGGATTGCGATGA
cpsI-6-R	CAATTCTGTCGGACTATCCTGATG
cpsI-7-R	TGTCGCTTCCACACTGAGTGTTGA
cpsL-F	CAATCCTAAGTATTTTCGGTTCATT
cpsL-R	TAGGAACATGTTCATTAACATAGC
cpsG-F	ACATGAACAGCAGTTCAACCGT
CpsG-R	ATGCTCTCCAAACTGTTCTTGT
CpsG-2-3-6-R	TCCATCTACATCTTCAATCCAAGC
CpsN-5-F	ATGCAACCAAGTGATTATCATGTA
CpsN-5-R	CTCTTCACTCTTTAGTGTAGGTAT
CpsJ-8-F	TATTTGGGAGGTAATCAAGAGACA
CpsJ-8-R	GTTTGGAGCATTCAAGATAACTCT
cpsJ-2-4-F	CATTTATTGATTCAGACGATTACATTGA
cpsJ-2-R	CCTCTTTCTCTAAAATATTCCAACC
cpsJ-4-R	CCTCAGGATATTTACGAATTCTGTA
cpsI-7-9-F	CTGTAATTGGAGGAATGTGGATCG
cpsI-9-R	AATCATCTTCATAATTTATCTCCCATT
cpsJ-Ib-F	GCAATTCTTAACAGAATATTCAGTTG
cpsJ-Ib-R	GCGTTTCTTTATCACATACTCTTG

4.5 Pesquisa dos genes de virulência

Os genes de virulência foram pesquisados por PCR (Tabela 2), seguindo protocolo de amplificação descrito na literatura (OTAGUIRI et al., 2013). Os componentes da reação

estão listados a seguir: 2,5µl de tampão (buffer 1x) de PCR; $MgCl_2$ a 1,5mM; nucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP a 100µM; iniciadores (*primers*) *forward* e *reverse* a 1µM (cada); 2,5U de High Fidelity Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, São Paulo); e 2µl de DNA; água foi utilizada para atingir o volume final de 25µl. As amostras foram amplificadas por desnaturação durante 1 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 95°C durante 30s, anelamento a 60°C durante 1min, e extensão a 72°C por 45s.Os resultados das reações foram analisados em gel de agarose 1%, após corrida eletroforética a 100mV e coloração do gel em gel red. Utilizando escala de 100bp (Thermo Fisher)

Tabela 2. **Seqüência de nucleotídeos de cada *primer* e tamanho amplicon esperado para cada gene da proteína de superfície de *Streptococcus agalactiae.* (OTAGUIRI et al., 2013)**

Primer	Sequência (5′-–3′)	Tamanho do amplicon (bp)
hylB	F: TGTCTCCGAGGTGACACTTGAACT R: TTGTGTTGTGACGGGTTGTGGATG	124
cylE	F: TCGGAACAAGTAAAGAGGGTTCGG R: GGGTTTCCACAGTTGCTTGAATGT	130
PI-1	F: AACCACTAGCAGGCGTTGTCTTTG R: TGAGCCCGGAAATTCTGATATGCC	147
PI-2a	F: GCCGTTAGATGTTGTCTTCGTACT R: TTTACTGCGGTCCCAAGAGCTTC	117
PI-2b	F: AAGTCTTGACCAAGGATACGACGC R: ATCGTGTTACTTGCCCTGCGTA	152

4.6 Testes de resistência a antimicrobianos

A sensibilidade a antimicrobianos foi verificada utilizando a técnica de disco-difusão em Ágar Sangue Mueller Hinton, com sangue de carneiro desfibrinado a 5%, para os seguintes antimicrobianos: Penicilina, Cefepima, Vancomicina, Eritromicina e Clindamicina (CECON - Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico, São Paulo, Brasil).

Os halos de inibição foram confrontados com os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI. A resistência constitutiva ou induzida a Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas do tipo B (MLSB) foi determinada utilizando o teste de indução de resistência a Clindamicina, ou teste-D. Pares de discos de Eritromicina-Clindamicina foram semeados a 15-20 mm de distância, o achatamento do halo de crescimento é considerado positivo (FIEBELKORN et al., 2003), de acordo com as recomendações do BrCast (BRCAST, 2017; EUCAST, 2015)

4.7 Análise estatística

Os dados de sorotipos de cada cidade foram analisados usando o Software *GraphPad Prism 7.00.* Foi feito o teste de significância de Fisher, valores foram considerados significativos se $p<0.05$.

5. Resultados

5.1 Relação entre distribuição de sorotipos capsulares, gestação e localização geográfica

O perfil de bandas das cepas padrão dos sorotipos Ia, Ib, II, III, IV, V e VI utilizadas como controle nas reações, de PCR multiplex e estão representadas na Figura 1 conforme descrito por Monica Imperi (IMPERI et al., 2010).

.

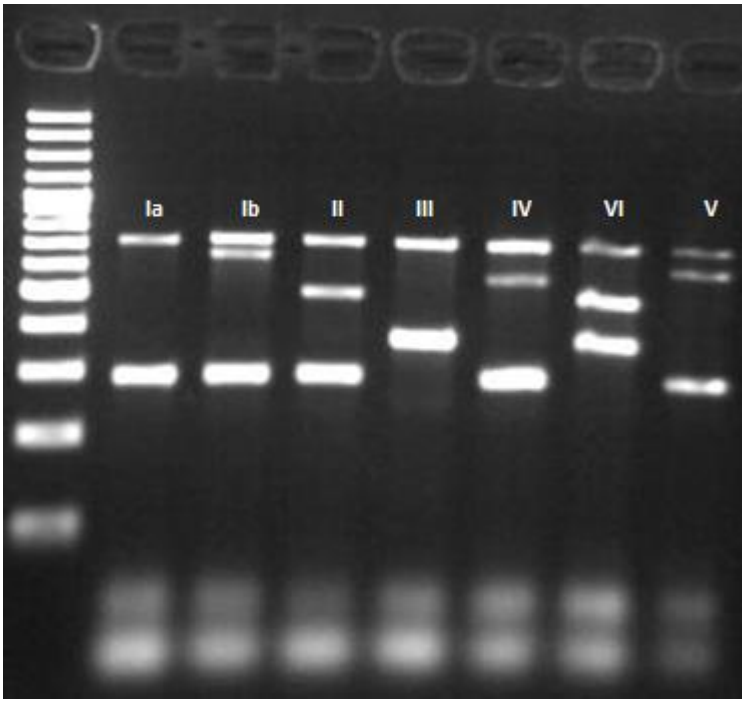

Figura 1: Gel de eletroforese com perfil de bandas dos sorotipos capsulares das cepas padrão de *S. agalactiae.* Fileira 1: Ladder 100bp; Fileira 2: sorotipo Ia; Fileira 3: sorotipo Ib; Fileira 4: sorotipo II; Fileira 5: sorotipo III; Fileira 6: sorotipo IV; Fileira 7: sorotipo VI; Fileira 8: sorotipo V.

Entre as 292 cepas analisadas nesse trabalho, o sorotipo mais encontrado foi o Ia (50%) seguido do sorotipo V (24,66%). A comparação da distribuição de sorotipos entre as diferentes localizações apresentou diferença significativa na prevalência do sorotipo V na

cidade de São José dos Campos quando comparada à cidade do Rio de Janeiro (p=0,0123) e São Paulo (0,0035) (Figura 2).

O sorotipo Ia foi considerado estatisticamente mais abundante (p<0,0001) quando comparado a todos os outros sorotipos no Rio de Janeiro. Em São Paulo o sorotipo Ia foi mais abundante do que todos os sorotipos, sendo p<0,0001 quando comparado aos sorotipos Ib, II, III, IV, VI, VII, VIII e IX, e p=0,0002 quando comparado ao sorotipo V .Na cidade de São José dos Campos a abundância do sorotipo Ia não foi significativamente maior quando comparada ao sorotipo V, mas foi estatisticamente maior se comparada aos outros sorotipos (p<0,0001).

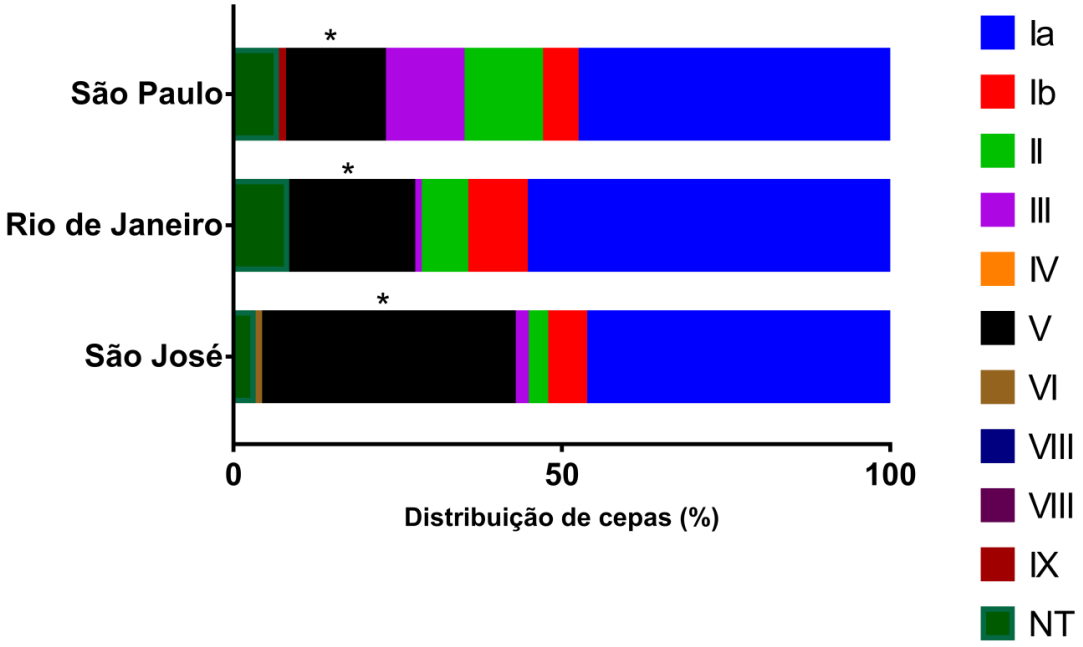

Figura 2: Distribuição dos sorotipos capsulares das 292 cepas nas cidades de São Paulo, Rio de Janeiro e São José dos Campos. (*p<0,05,para diferença na prevalência do sorotipo V entre as localidades)

Foram analisadas 99 cepas provenientes do Rio de Janeiro. O sorotipo mais comum encontrado foi o Ia, seguido do sorotipo V. Não há discriminação entre as mulheres gestantes e não gestantes quanto à origem destas cepas. Os resultados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição de sorotipos capsulares na cidade do Rio de Janeiro. (NT = cepas Não Tipáveis)

	Prevalência n(%)
Ia	55 (55,6)
Ib	9 (9,1)
II	7 (7,1)
III	1 (1,0)
V	19 (19,2)
NT	8 (8,1)
TOTAL	99 (100,0)

Foram determinados os sorotipos de 101 amostras de São José dos Campos, onde foi encontrada uma prevalência de amostras de sorotipos Ia e V em pacientes não gestantes, os resultados estão na Tabela 4. Na Figura 3 é possível visualizar em gel o perfil dessa cidade, com sorotipos mais comuns sendo Ia e V. O sorotipo Ia é o mais comum quando comparado com os outros sorotipos ($p<0,001$). Com exceção do grupo de mulheres não gestantes, onde $p=0,0248$ quando comparados os sorotipos Ia e V. A distribuição dos sorotipos Ia e V não mostrou diferença estatisticamente significativa em mulheres gestantes. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição de sorotipos comparando-se os grupos de mulheres gestantes e não gestantes (Figura 4b).

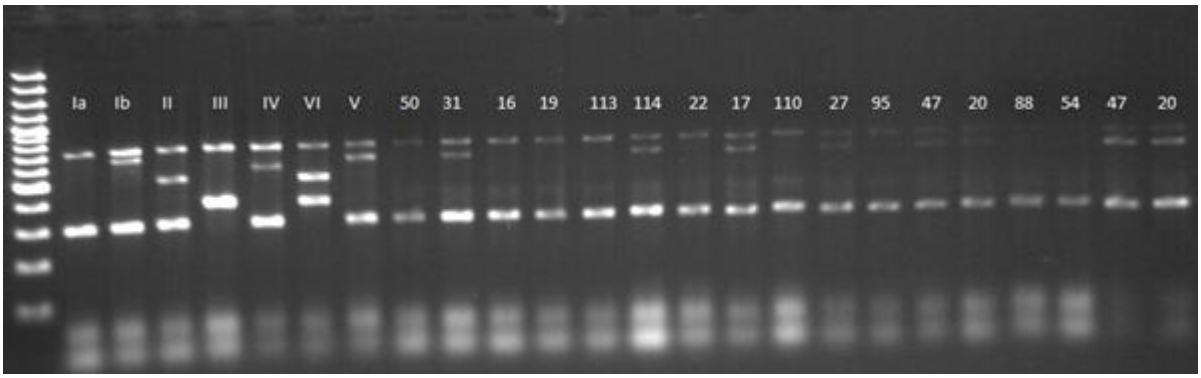

Figura 3: Gel de eletroforese representando cepas obtidas de bacterioteca da cidade de São José dos Campos. Fileiras 1: Ladder 100bp; Fileiras 2 a 8: cepas padrão dos sorotipos Ia, Ib, II a VI. Fileiras 9, 10, e 12 a 25: cepas isoladas de mulheres gestantes; Fileira 11: cepa isolada de mulher não gestante.

Tabela 4: Relação entre cepas e sorotipos capsulares na cidade de São José dos Campos, comparando-se os grupos de mulheres gestantes e não gestantes. (NT=cepas Não Tipáveis)

	Gestantes n (%)	Não gestantes n (%)	Total n (%)	p
Ia	18 (48,65)	29 (45,31)	**47 (46,5)**	0,3693
Ib	2 (5,41)	4 (6,25)	**6 (5,9)**	0,8179
II	0 (0,00)	3 (4,69)	**3 (3,0)**	0,2162
III	0 (0,00)	2 (3,13)	**2 (2,0)**	0,3990
IV	0 (0,00)	0 (0,00)	**0 (0,0)**	>0,9999
V	16 (43,24)	23 (35,94)	**39 (38,6)**	0,0670
VI	1 (2,70)	0 (0,00)	**1 (1,0)**	0,4648
VII	0 (0,00)	0 (0,00)	**0 (0,0)**	>0,9999
VIII	0 (0,00)	0 (0,00)	**0 (0,0)**	>0,9999
IX	0 (0,00)	0 (0,00)	**0 (0,0)**	>0,9999
NT	0 (0,00)	3 (4,69)	**3 (3,0)**	0,2162

Foram determinados os sorotipos de 92 cepas de São Paulo; assim como nos grupos anteriores, o sorotipo mais comum foi Ia, que foi significativamente mais abundante (p<0,005) quando comparado aos outros sorotipos capsulares (Tabela 5).

Tabela 5: Relação entre cepas e sorotipos capsulares na cidade de São Paulo, comparando-se os grupos de mulheres gestantes e não gestantes (NT=cepas Não Tipáveis)

	Gestantes n(%)	Não gestantes n(%)	Total n(%)	p
Ia	21 (47,43)	23 (47,92)	44 (47,83)	0,9793
Ib	1 (2,27)	4 (8,33)	5 (5,43)	0,4163
II	2 (4,55)	9 (18,75)	11 (11,96)	0,0750
III	9 (20,45)	2 (4,17)	11 (11,96)	0,0459*
IV	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	>0,9999
V	7 (15,91)	7 (14,58)	14 (15,22)	0,8561
VI	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	>0,9999
VII	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	>0,9999
VIII	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	>0,9999
IX	1 (2,27)	0 (0,00)	1 (1,09)	0,7573
NT	3 (6,82)	3 (6,25)	6 (6,52)	0,9380

A fim de avaliar a distribuição de sorotipos na população de mulheres quanto à gestação, foram comparadas as cidades de São Paulo e São José dos Campos (Figura 4). O sorotipo II foi significativamente mais abundante entre o grupo de mulheres não gestantes

(p=0,0493), como é ilustrado na Figura 4a. Na cidade de São Paulo, o sorotipo III é significativamente mais abundante em mulheres gestantes (p=0,0459) (Figura 4c).

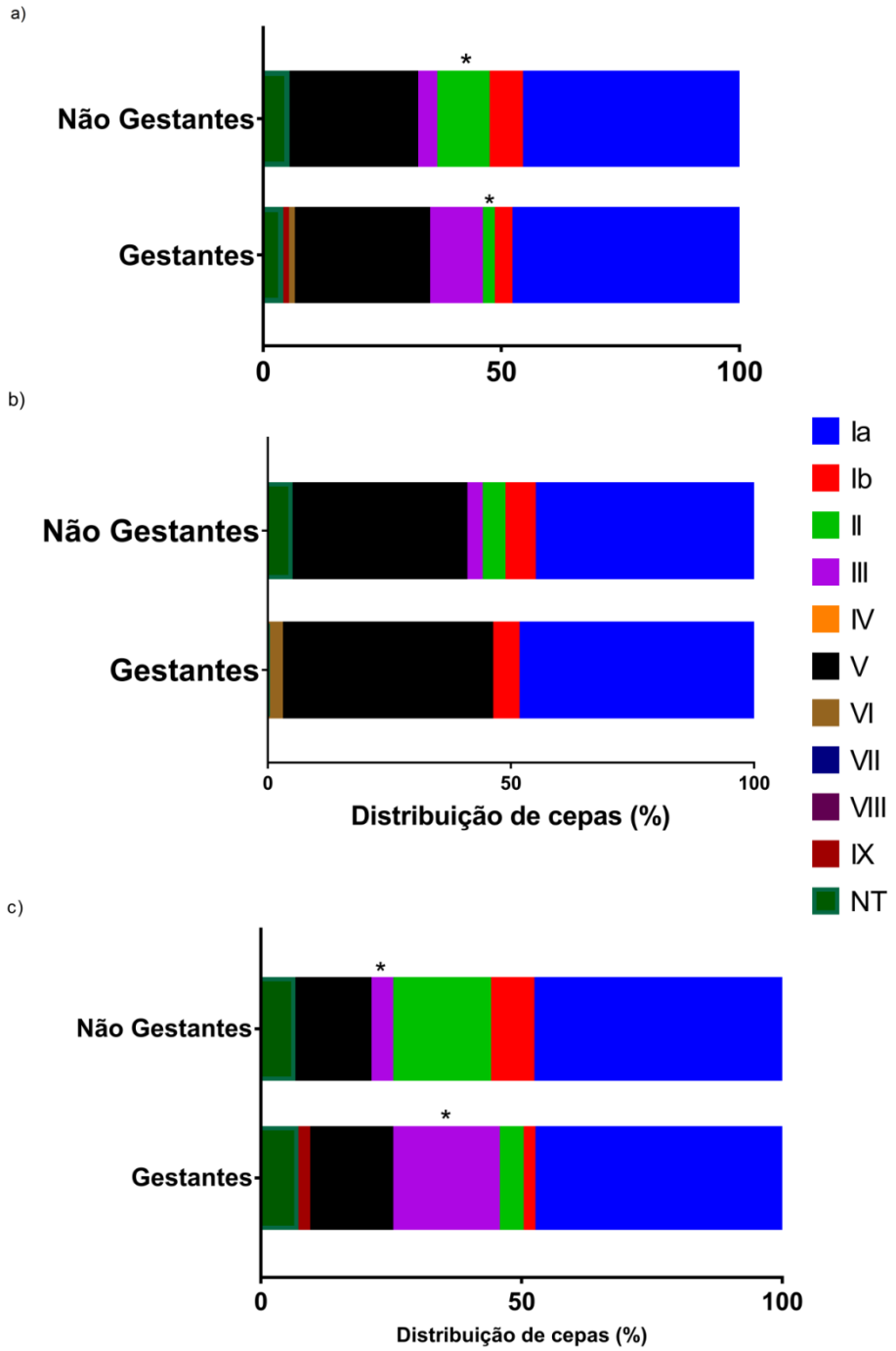

Figura 4: Distribuição de sorotipos entre os grupos de mulheres gestantes e não gestantes; (a) Resultados totais, (b) cidade de São José dos Campos, (c) cidade de São Paulo. (*p<0,05)

5.2 Sítio de isolamento

Na cidade do Rio de Janeiro as cepas foram isoladas tanto de amostras de secreção vaginal quanto de amostras de urina, como demonstrado na Figura 5. Os sorotipos II e III foram isolados somente em amostras de urina.

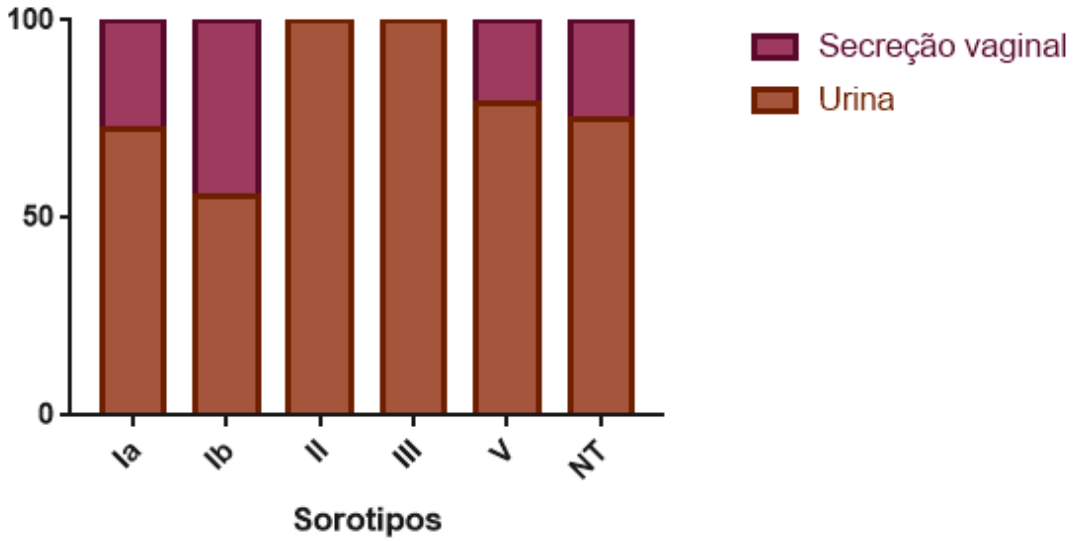

Figura 5: Distribuição de sorotipos capsulares quanto ao sítio de isolamento na cidade do Rio de Janeiro.

Na cidade de São José dos Campos a coleta de amostras foi feita dos sítios: anal, endocervical, introito vaginal, perianal, secreção anal, cervical e vaginal, urina e região vaginal (Figura 6). A análise dos resultados demonstra que o sítio de isolamento tem impacto significativo na distribuição de cepas em sorotipos nas mulheres gestantes (p=0,0306). Além disso, dentro do grupo de mulheres gestantes, a prevalência de cepas pertencentes ao sorotipo Ia foi significativamente maior em amostras de urina se comparada a anal (p=0,0227), endocervical (p=0,0042), introito vaginal (p=0,01), secreção cervical (p=0,0042) e secreção vaginal (p=0,0227).

A prevalência de cepas isoladas de urina não foi significativamente maior quando comparada a amostras vaginais. Não houve diferença significativa entre cepas pertencentes ao sorotipo Ib isoladas de urina e amostras vaginais. O sorotipo V foi significativamente mais

prevalente em urina quando comparada a perianal (p=0,0111), secreção vaginal (p=0,0276) e vaginal (p=0,0111). A prevalência de cepas isoladas de urina não foi significativamente maior quando comparada a amostras anais (Figura 6a).

Em mulheres não gestantes, a prevalência de cepas pertencentes ao sorotipo Ia foi significativamente maior em urina quando comparada aos outros sítios (p<0,0001). Também houve maior prevalência de cepas isoladas de urina entre os sorotipos II (p=0,0046) e V (p<0,0001). Cepas pertencentes ao sorotipo Ib, III e cepas NT foram isoladas somente em amostras de urina (Figura 6b).

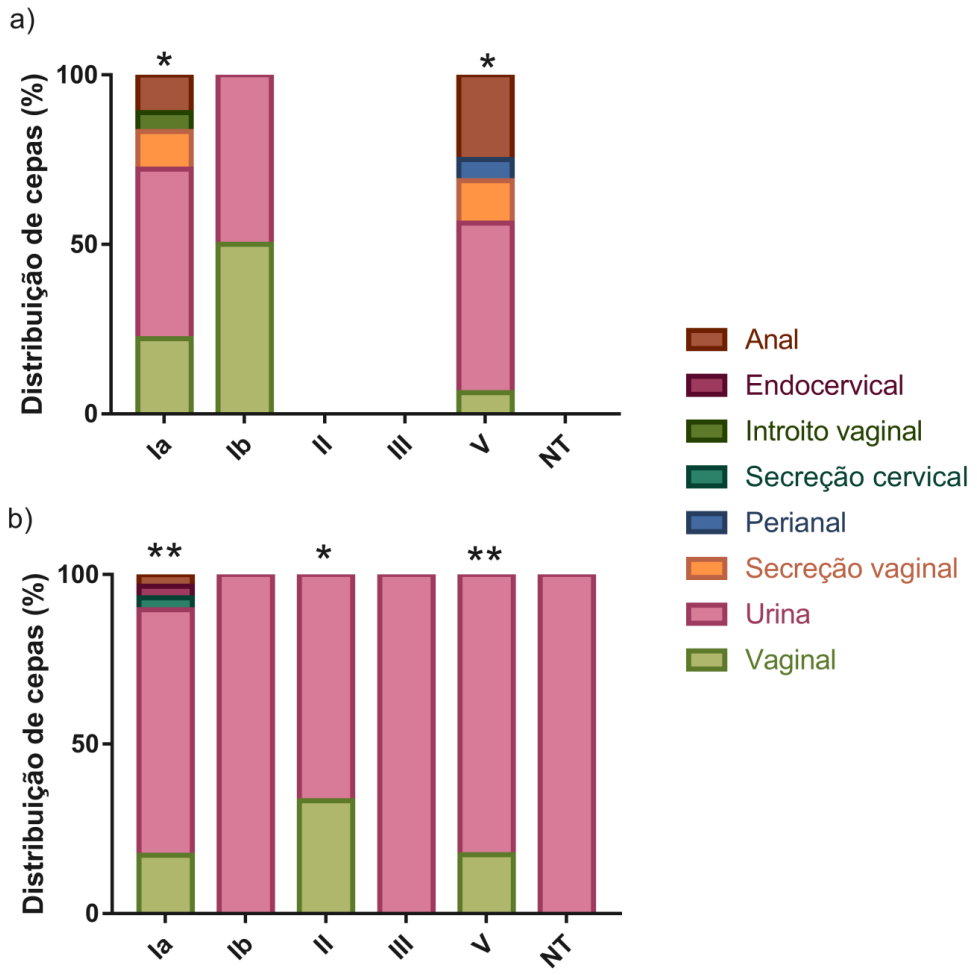

Figura 6: Distribuição de sorotipos capsulares quanto ao sítio de isolamento na cidade de São José dos Campos em (a) mulheres gestantes e (b) mulheres não gestantes. (*p<0,05; **p<0,0001)

Na cidade de São Paulo foram analisadas cepas foram isoladas de abcesso, região anal, perianal, fúrcula, secreção vaginal, urina e sangue; como pode ser observado na

Figura 7. Entre as mulheres gestantes o sorotipo III foi significativamente mais prevalente em cepas isoladas de fúrcula quando comparada a urina (p=0,0324). Entre as mulheres não gestantes o sorotipo II foi mais prevalente entre cepas isoladas de urina quando comparada a secreção vaginal (p=0,0083).

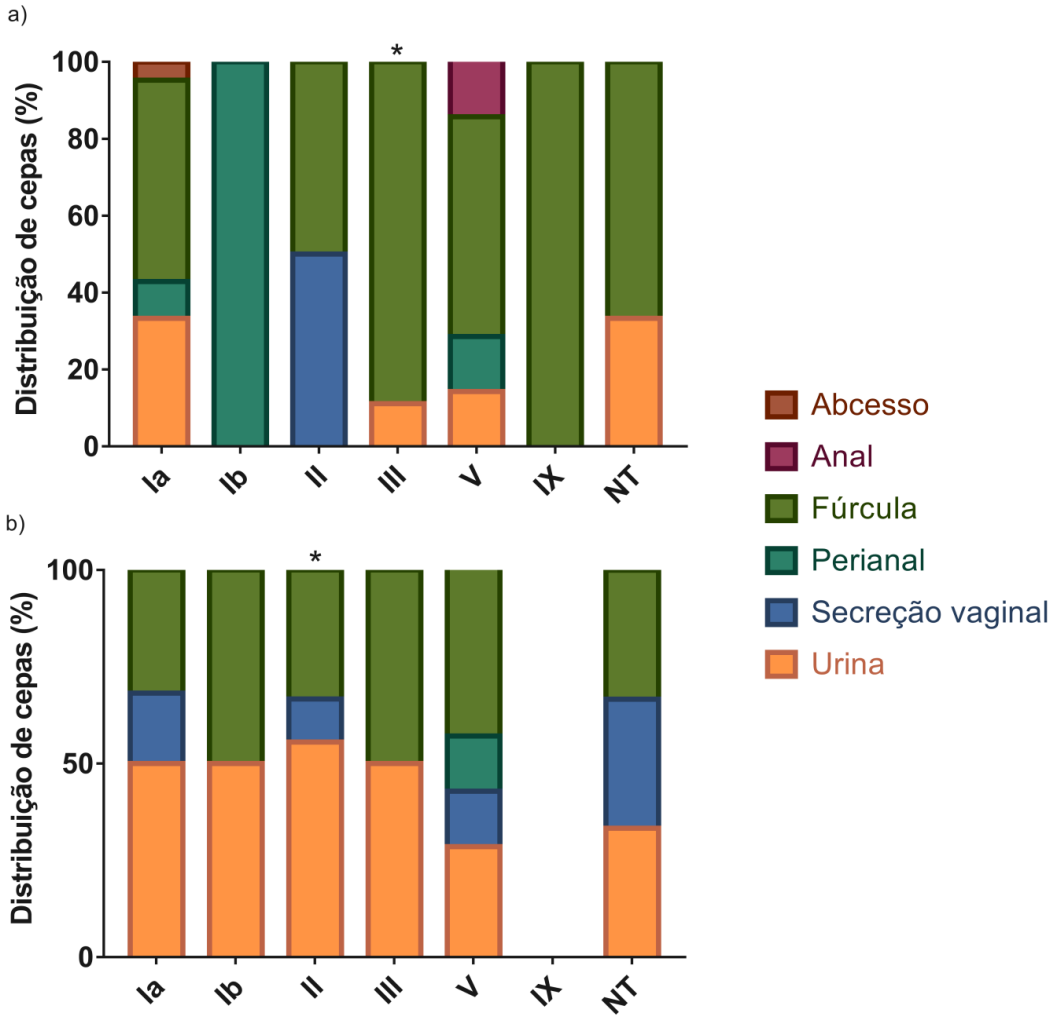

Figura 7: Distribuição de sorotipos capsulares quanto ao sítio de isolamento na cidade de São Paulo em (a) mulheres gestantes e (b) mulheres não gestantes. (p<0,05)

5.3 Virulência

Todos os genes de virulência foram encontrados nas cepas estudadas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os sorotipos e genes de virulência. Resultados das três localidades foram incluídos na Figura 8, o desvio padrão representa a diferença entre as cidades, porém não foram encontradas diferenças significativas.

O gene que codifica hialuronidase foi encontrado em 99,65% das cepas, com exceção de apenas uma cepa do Rio de Janeiro pertencente ao sorotipo Ia. O gene β-hemolisina/citolisina foi encontrado em 98,97% das cepas, com exceção de três cepas da cidade do Rio de Janeiro.

Não foram encontradas correlações significativas entre os fatores de virulência e gestação (Figura 9). Entre as cepas de mulheres gestantes foi isolada uma cepa do sorotipo VI, que possui todos os genes de virulência pesquisados e uma cepa do sorotipo IX que possui quase todos os genes de virulência, com exceção de pili 2A. Houve maior prevalência dos genes de virulência hialuronidase e β-hemolisina/citolisina entre as cepas do sorotipo III se comparados aos sorotipos Ib (p=0,0412) e II (p=0,0245) (Figura 9b).

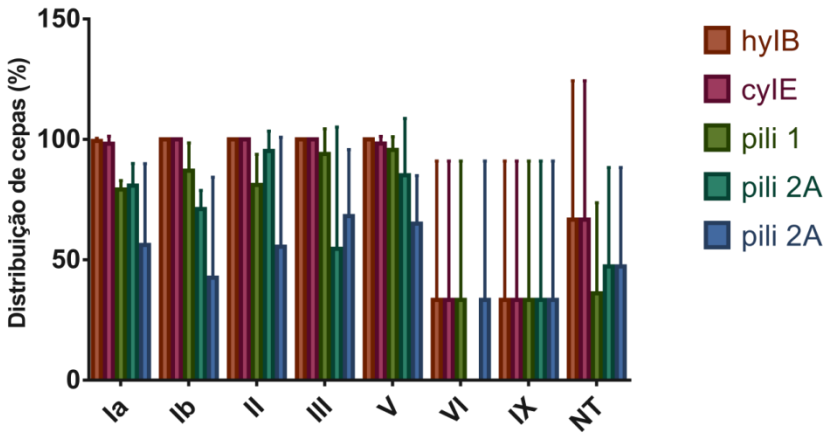

Figura 8: Prevalência de genes de virulência entre os sorotipos de EGB de três localidades (Rio de Janeiro, São José dos Campos e São Paulo).

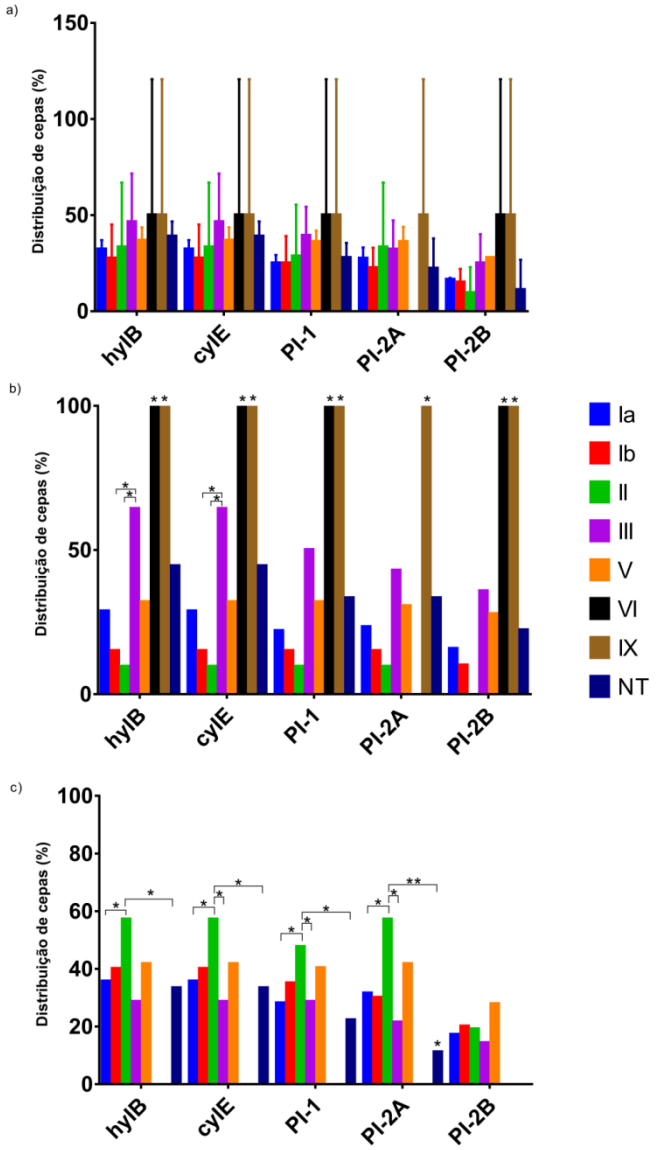

Figura 9: Distribuição de fatores de virulência de acordo com sorotipos capsulares em mulheres gestantes e não gestantes; (a) resultados totais, (b) mulheres gestantes, (c) mulheres não gestantes. (*p<0,05; **p<0,0001)

No grupo de mulheres não gestantes, a prevalência do gene hialuronidase foi maior entre o sorotipo II se comparado ao Ia (p=0,0247) e NT (p=0,0139). A prevalência do gene β-hemolisina/citolisina foi maior entre o sorotipo II se comparado ao Ia (p=0,0247), III (p=0,0039) e NT (p=0,0139). O mesmo aconteceu com a prevalência do gene pili 1, que foi maior entre o sorotipo II se comparado ao Ia (p=0,0400), III (p=0,0449) e NT (p=0,0092), e com o gene pili 2A, que foi maior entre o sorotipo II se comparado ao Ia (p=0,0082), III (p=0,0005) e NT (p<0,0001). A prevalência de pili 2A foi menor entre cepas NT se

comparadas ao sorotipo Ia (p=0,0326), Ib (p=0,0466), II (p<0,0001) e V (p=0,0022)(Figura 9c).

Os resultados da cidade do Rio de Janeiro estão representados na Tabela 6 e Figura 10a. Nenhuma cepa do sorotipo III possui a ilha de pili 2A, a prevalência de cepas positivas para ilha de pili 2B foi significativamente maior entre o sorotipo III quando comparado ao sorotipo V (p=0,0424).

Tabela 6: Número de cepas por sorotipos capsulares relacionados aos genes de virulência na cidade do Rio de Janeiro (NT= cepas Não Tipáveis)

	hyIB n(%)	cyIE n(%)	Pili 1 n(%)	Pili 2A n(%)	Pili 2B n(%)
Ia	54 (98,2)	52 (94,5)	45(81,8)	40 (72,7)	37 (67,27)
Ib	9 (100)	9 (100)	7 (77,8)	6 (66,7)	4 (44,44)
II	7 (100)	7 (100)	6 (85,7)	6 (85,7)	4 (57,14)
III	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100,0)
V	19 (100)	18 (94,7)	17 (89,5)	11 (57,9)	8 (42,11)
NT	8 (100)	8 (100)	6 (75)	6 (75)	6 (75,00)
TOTAL	98 (99)	95 (96)	82 (82,88)	69 (69,7)	60 (60,61)

Na cidade de São José dos Campos (Figura 10b, Tabela 7), tanto hialuronidase quanto citolisina/hemolisina estão presentes em todas as cepas, e em todos os sorotipos encontrados; quando comparada à pili 1, o gene pili 2A foi encontrado em maior prevalência nas cepas pertencentes ao sorotipo II, o inverso ocorre entre as cepas do sorotipo Ib, sendo que pili 1 é encontrada em um número maior de cepas. A prevalência do gene pili 1 foi significativamente menor em cepas NT se comparadas ao sorotipo III (p=0,0394), V (p=0,0469) e VI (p=0,0394). Somente uma cepa pertence ao sorotipo VI, e possui todos os genes de virulência pesquisados com exceção de pili 2A. Não houve correlação significativa entre sorotipos e pili 2B.

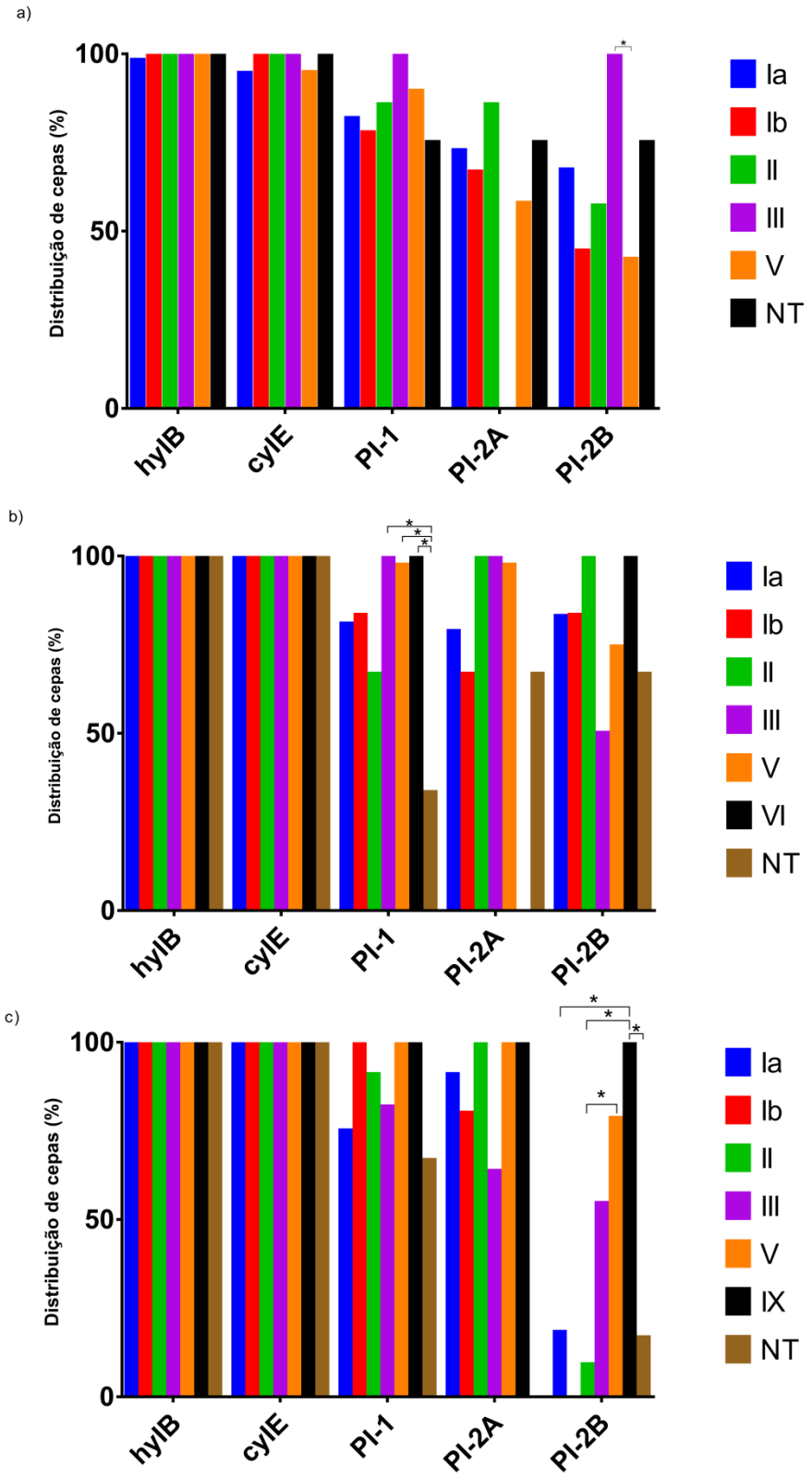

Figura 10: Prevalência de genes de virulência entre os sorotipos de Estreptococos do Grupo B (a) Na cidade do Rio de Janeiro, (b) São José dos Campos e (c) São Paulo. (*p<0,05)

Tabela 7: Número de amostras por sorotipos capsulares relacionados aos genes de virulência na cidade de São José dos Campos (NT= cepas Não Tipáveis)

	hyIB n (%)	cyIE n(%)	Pili 1 n(%)	Pili 2A n(%)	P1-2B n(%)
Ia	47 (100)	47 (100)	38 (80,85)	37 (78,72)	39 (82,98)
Ib	6 (100)	6 (100)	5 (83,33)	4 (66,67)	5 (83,33)
II	3 (100)	3 (100)	2 (66,67)	3 (100)	3 (100)
III	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (50)
V	39 (100)	39 (100)	38 (97,44)	38 (97,44)	29 (74,36)
VI	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)
NT	3 (100)	3 (100)	1 (3,33)	2 (66,67)	2 (66,67)
TOTAL	101 (100)	101 (100)	87 (86,14)	86 (85,15)	80 (79,21)

Na cidade de São Paulo (Figura 10c, Tabela 8), assim como visto em São José dos Campos, todas as cepas possuem hialuronidase e citolisina/hemolisina, independentemente de sua origem e sorotipo. Nenhuma cepa NT possui pili 2A. Entre as ilhas de patogenicidade, pili 2B foi mais prevalente entre o sorotipo VI se comparado ao Ia (p=0,0154), II (p=0,0079) e cepas NT (0,0138); pili 2B também foi mais abundante entre cepas do sorotipo V se comparado ao sorotipo II (p=0,0365).

Tabela 8: Número de amostras por sorotipos capsulares relacionados aos genes de virulência na cidade de São Paulo (NT= cepas Não Tipáveis)

	hyIB n(%)	cyIE n(%)	Pili 1 n(%)	Pili 2A n(%)	Pili 2B n(%)
Ia	44 (100)	44 (100)	33 (75)	40 (90,91)	8 (18,18)
Ib	5 (100)	5 (100)	5 (100)	4 (80)	0 (0)
II	11 (100)	11 (100)	10 (90,91)	11 (100)	1 (9,09)
III	11 (100)	11 (100)	9 (81,82)	7 (63,64)	6 (54,55)
V	14 (100)	14 (100)	14 (100)	14 (100)	11 (78,57)
IX	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
NT	6 (100)	6 (100)	4 (66,687)	0 (0)	1 (16,67)
TOTAL	92 (100)	92 (100)	76 (82,61)	77 (83,70)	28 (30,43)

Foi determinada a distribuição de fatores de virulência de acordo com o sítio de isolamento das cepas (Figura 11). Na cidade do Rio de Janeiro as cepas foram obtidas de

secreção vaginal e urina. Não houve diferença significativa entre a prevalência dos fatores de virulência e o sítio de isolamento das cepas (Figura 11a).

Em São José dos Campos, há uma correlação entre a prevalência dos genes de virulência cepas de acordo com o sítio de isolamento (Figura 11b); o predomínio da ilha de pili 2A foi significativamente menor (p=0,0237) em cepas isoladas de secreção vaginal quando comparadas às de secreção cervical, introito vaginal e endocervical; já a ilha de pili 2B foi significativamente menos dominante entre as cepas isoladas de introito vaginal quando comparadas a anal (p=0,0184), urina (p=0,0072), e endocervical (p=0,0037), secreção vaginal (p=0,0037), secreção cervical (p=0,0037).

Na cidade de São Paulo, entre as cepas isoladas de abcesso, nenhuma contém a ilha de pili 1. A prevalência de pili 2B foi significativamente maior entre cepas da região anal se comparada à secreção vaginal (p=0,0262) e urina (p=0,0088).

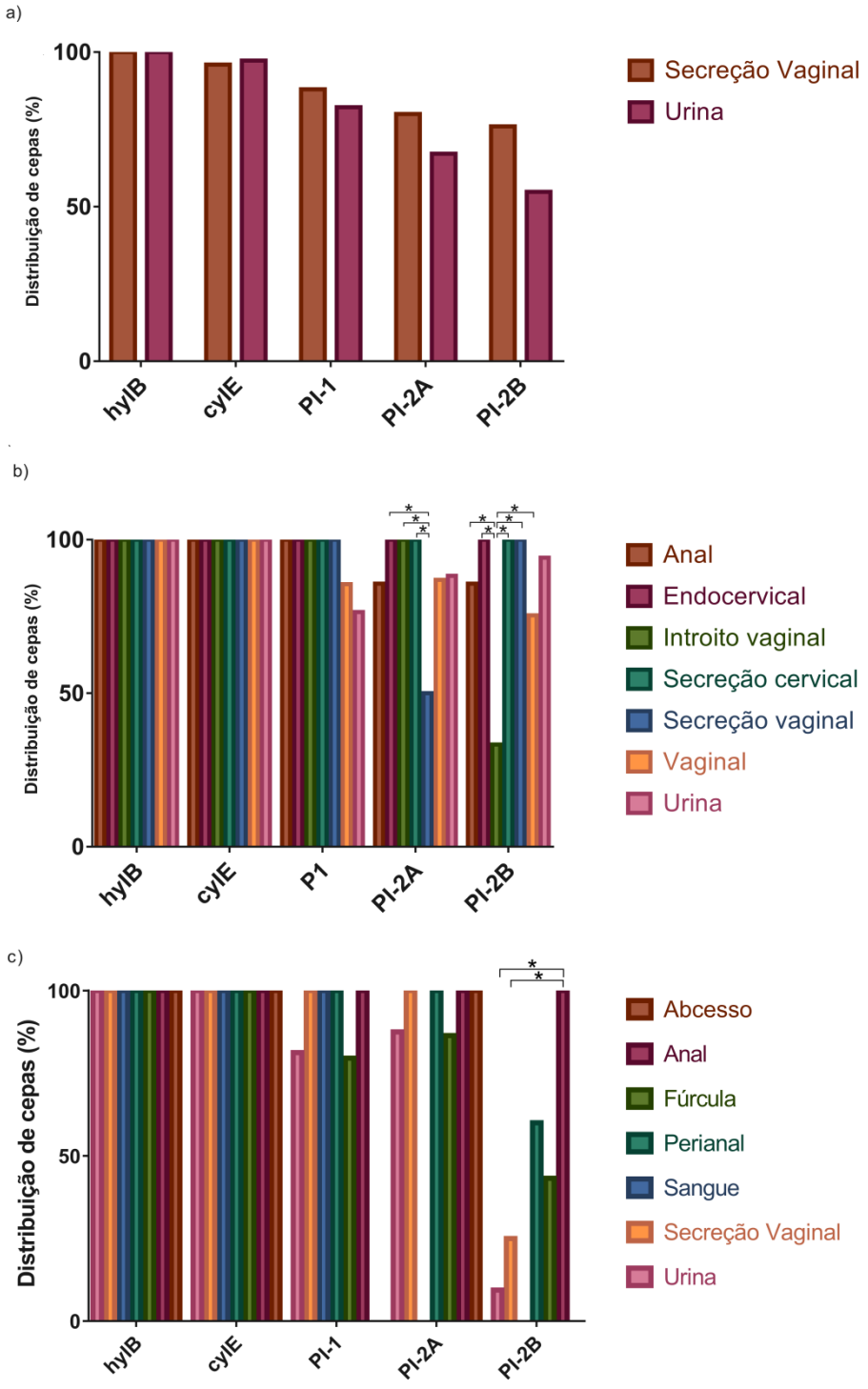

Figura 11: Prevalência de genes de virulência entre os sorotipos de Estreptococos do Grupo B de acordo com o sítio de isolamento da amostra no (a) Rio de Janeiro, (b) São José dos Campos e (c) São Paulo. (*p<0,05)

5.4 Resistência

Entre as 292 cepas, 7,5% foram consideradas resistentes à Cefepima, 21,91% das cepas são resistentes a Eritromicina. Resistência a Clindamicina foi encontrada em 22,26% das cepas. Não foram encontradas cepas resistentes a Penicilina e Vancomicina. Os resultados estão representados na Figura 12.

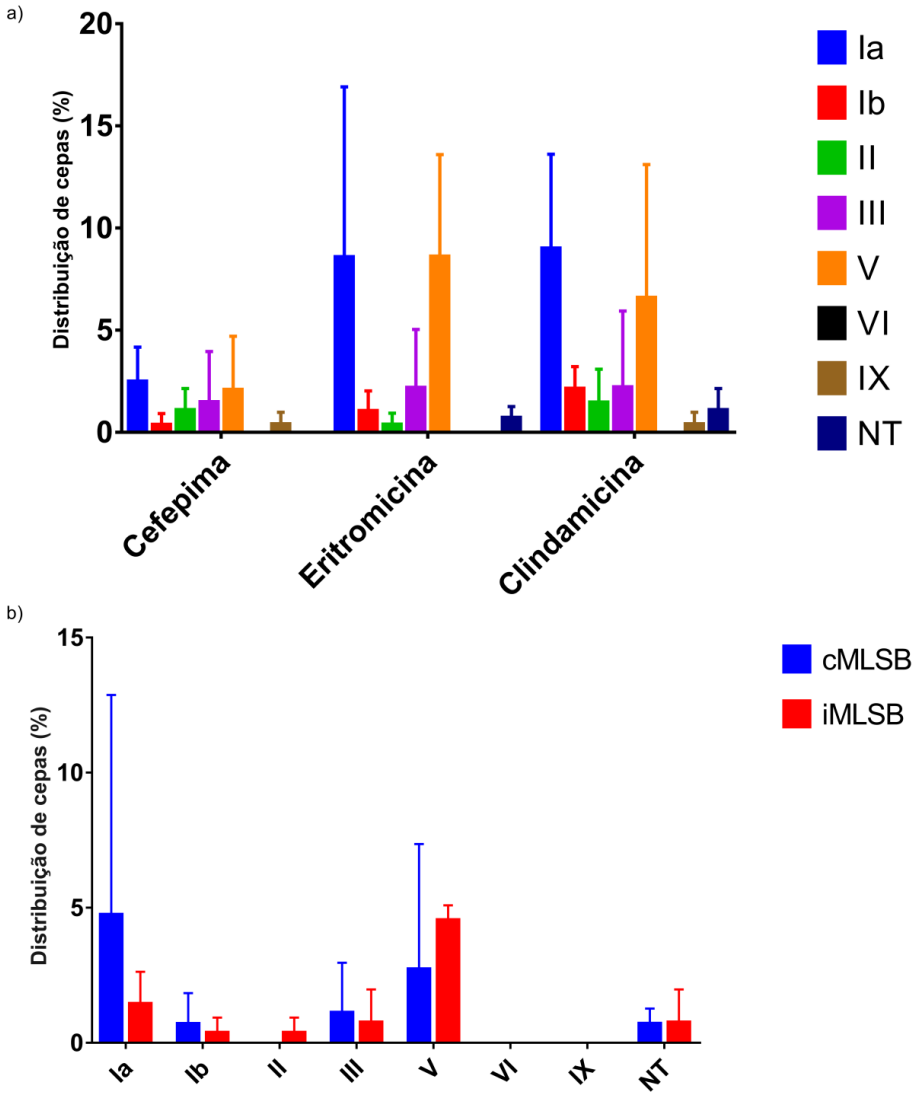

Figura 12: Cepas resistentes a antimicrobianos em três localidades. (a) Cepas resistentes por sorotipos e (b) Detecção fenotípica de resistência a Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas (MLSB).

Entre as cepas pertencentes ao sorotipo Ia e V, houve maior resistência a Eritromicina e Clindamicina. Nestes resultados foram incluídas as cepas com os fenótipos de resistência induzida à Clindamicina (iMLSB) e resistência constitutiva à Clindamicina (cMLSB).

Como representado na Figura 12a, resistência a Eritromicina foi significativamente maior entre as cepas do sorotipo Ia se comparado ao sorotipo Ib (p=0,0030), II (p=0,0013), III (p=0,0107) e NT (p=0,0020); e foi maior entre as cepas do sorotipo V se comparado ao sorotipo Ib (p=0,0029), II (p=0,0013), III (p=0,0103) e NT (p=0,0019).

Já a resistência a Clindamicina foi maior entre cepas do sorotipo Ia se comparado ao sorotipo Ib (p=0,0064), II (p=0,0029), III (0,0069), IX (p=0,0008) e NT (p=0,0019); e foi maior entre cepas do sorotipo V se comparado ao sorotipo II (p=0,0382), IX (p=0,0132) e NT (p=0,0269).

Não houve diferença significativa entre os fenótipos cMLSB e iMLSB e aos sorotipos capsulares. O fenótipo iMLSB foi encontrada em 7,87% das cepas e cMLSB foi encontrada em 9,93% das cepas. A maior prevalência do fenótipo iMLSB foi encontrada na cidade de São José dos Campos (25,51%); e a maior prevalência do fenótipo cMLSB foi encontrada na cidade de São Paulo (10,20%) (Figura 12b).

Entre o sorotipo Ia, houve diferença considerada significativa entre resistência à Eritromicina de São José dos Campos quando comparadas às de São Paulo (p=0,0136) e Rio de Janeiro (p=0,0082); entre cepas resistentes à Clindamicina de São José quando comparadas às do Rio de Janeiro (p=0,0461); e entre amostras com resistência constitutiva (cMLSB) da cidade de São José dos Campos quando comparadas às de São Paulo (p=0,0073) e Rio de Janeiro (p=0,0073).

Entre o sorotipo III houve diferença considerada significativa entre cepas resistentes à Cefepima da cidade de São Paulo quando comparadas às de São José (p=0,0441) e Rio de Janeiro (p=0,0441). Entre o sorotipo V houve diferença significativa entre cepas resistente à Cefepima da cidade de São José dos Campos quando comparadas às do Rio de Janeiro (p=0,0223); e entre cepas resistentes à Clindamicina da cidade de São José dos Campos

quando comparadas às do Rio de Janeiro (p=0,0065). Os resultados das três localidades estão representados na Figura 13.

Na cidade do Rio de Janeiro, aproximadamente 9% das cepas são positivas para o teste D, cinco destas cepas pertencem ao sorotipo V, duas pertencem ao sorotipo Ia, uma ao sorotipo II e uma ao sorotipo Ib. Foi encontrada apenas uma cepa resistente à Cefepima, pertencente ao sorotipo Ia. A resistência a Eritromicina foi significativamente maior entre cepas do sorotipo V se comparado ao Ib (p= 0,0356) e II (p=0,0356). Resultados estão ilustrados na Figura 13a.

Na cidade de São José dos Campos, a resistência a Clindamicina e Eritromicina foi maior entre os sorotipos Ia e V. A resistência a Eritromicina foi maior entre cepas do sorotipo Ia se comparado ao Ib (p=0,0133), III (p=0,0095) e NT (p=0,0095); e entre cepas do sorotipo V se comparado ao III (p=0,0361) e NT (p=0,0361). A resistência a Clindamicina foi maior entre cepas do sorotipo Ia se comparado ao II (p=0,0361) e NT p(=0,0361). Não houve correlação significativa entre sorotipos e resistência a Cefepima (Figura 13b).

Na cidade de São Paulo, entre as cepas resistentes a Clindamicina, cepas do sorotipo Ia foram significativamente mais abundantes do que as pertencentes aos sorotipos II (p=0,0224), IX (p=0,0020), e cepas NT (p=0,0067). Aquelas que pertencem ao sorotipo III foram mais abundantes do que as pertencentes aos sorotipos IX (p=0,0067) e cepas NT (p=0,0224). O sorotipo V foi significativamente mais abundante do que o sorotipo IX (p=0,0067) e NT (p=0,0224). Não houve uma correlação significativa entre sorotipos e resistência a Cefepima ou Eritromicina (Figura 13c).

No Rio de Janeiro, a resistência constitutiva a Clindamicina foi encontrada apenas entre cepas NT, apesar disso, não foi encontrada uma correlação significativa entre sorotipos e o fenótipo MLSB. Em São José dos Campos todas as cepas com fenótipo iMLSB pertencem ao sorotipo V. Entre as cepas com fenótipo cMLSB, a prevalência do sorotipo Ia foi significativamente maior quando comparada às cepas NT (p=0,0426), não houve diferença significativa entre os outros sorotipos. E em São Paulo todas as cepas com fenótipo cMLSB pertencem ao sorotipo III. Resultados estão representados na Figura 14

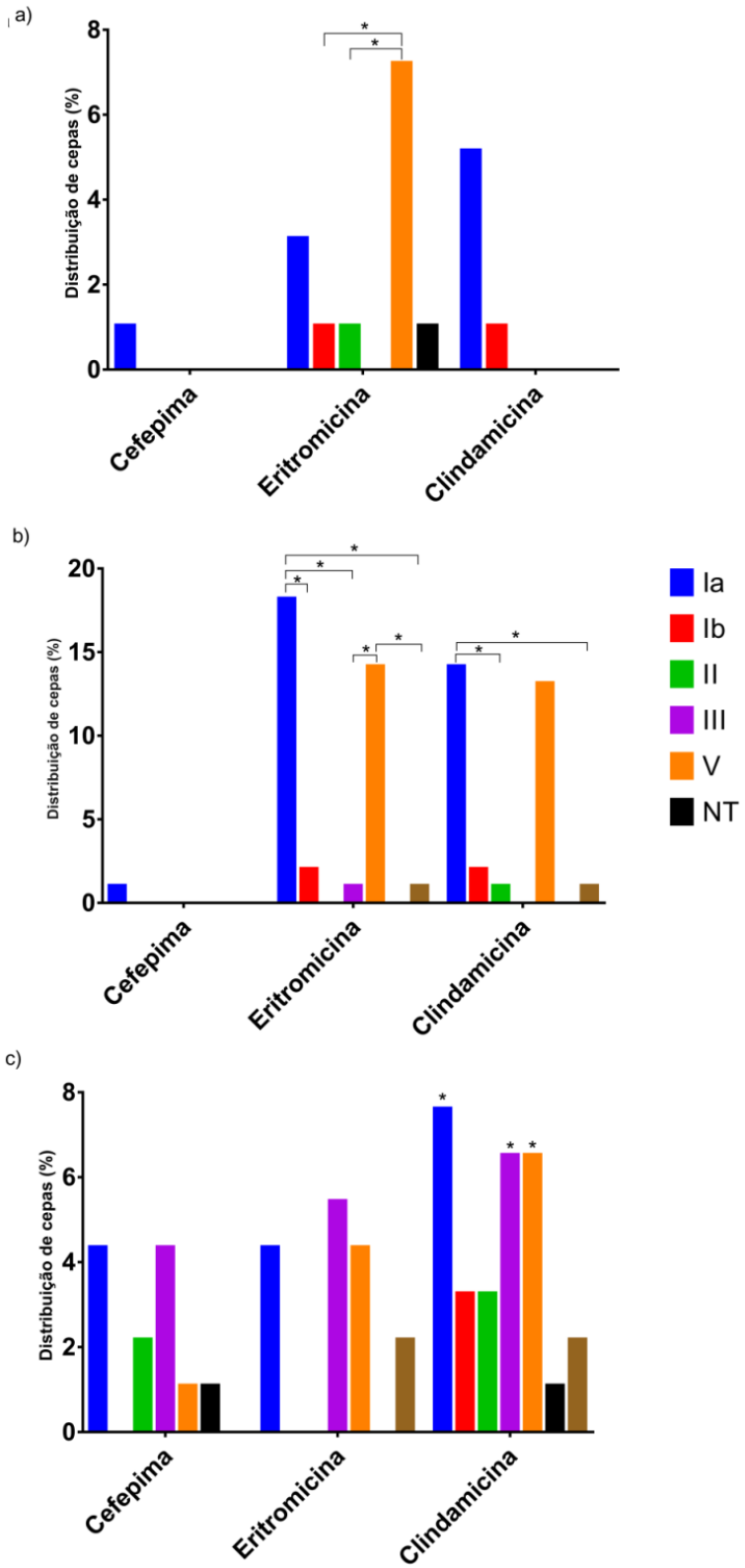

Figura 13: Distribuição de cepas resistentes a antimicrobianos de acordo com o sorotipo capsular na (a) cidade do Rio de Janeiro, (b) São José dos Campos e (c) São Paulo. (*p<0,005)

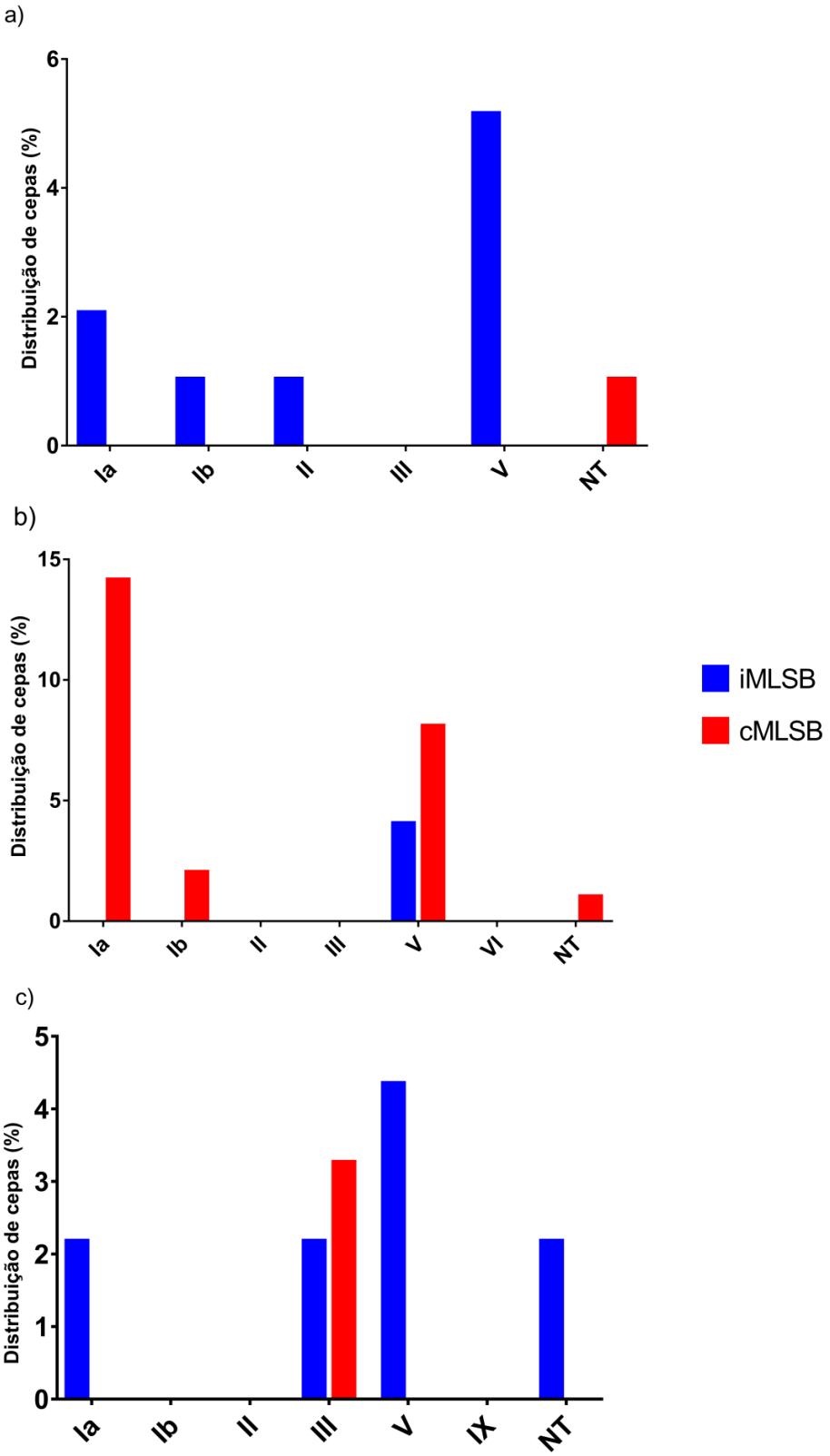

Figura 14: Detecção fenotípica de resistência a Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (MLS); sendo que iMLSB: resistência induzida, cMLSB: resistência constitutiva em cepas provenientes do (a) Rio de Janeiro, (b) São José dos Campos e (c) São Paulo.

6. Discussão

Desde antes do início dos estudos de Estreptococos do grupo B no Brasil (BENCHETRIT et al., 1982), este tem sido relacionado à sepse neonatal (EICKHOFF et al., 1964). Sabe-se que a fonte de infecção do neonato é a colonização materna, e o EGB pode ser transmitido durante, ou até mesmo antes do parto (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). Nos últimos anos, a prevalência de colonização por EGB no Brasil variou entre 4,2% (VENTURA et al., 2011) e 28,4% (MELO et al., 2018) entre mulheres gestantes e não gestantes.

A prevalência de *S. agalactiae* não varia entre gestantes e não gestantes, porém, foi demonstrado que há uma diferença entre a distribuição de sorotipos dentro desses grupos (Nascimento et al, dados em publicação). Há uma necessidade nacional de avaliar fenotípica e genotipicamente as cepas de *S. agalactiae* isoladas de gestantes e não gestantes, avaliando a relação entre virulência e sorotipos.

A recomendação do CDC é a obtenção de swab vaginal-retal para cultura de EGB em mulheres gestantes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010), contudo nesse estudo as cepas foram isoladas de diversos sítios diferentes, tanto em mulheres gestantes quanto não gestantes (Figura 5, Figura 6, Figura 7). A falta de um protocolo nacional pode ser a causa da irregularidade dessas cepas. Porém os dados dos sítios de isolamento das cepas juntamente com os resultados deste estudo podem ajudar na compreensão das características fenotípicas desse microrganismo, já que sua patogenicidade está relacionada com sua capacidade de adesão e invasão às células do hospedeiro, além de evasão do sistema imunológico. (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018).

No Rio de Janeiro o sorotipo II foi isolado somente em amostras de urina (Figura 5). No grupo de mulheres não gestantes, tanto da cidade de São Paulo (Figura 6) quanto de São José dos Campos (Figura 7) o sorotipo II foi significativamente mais abundante em cepas isoladas de urina quando comparada à secreção vaginal. Na cidade de São José dos

Campos o sorotipo Ia foi mais abundante em cepas isoladas de urina quando comparadas a outros sítios, com exceção do sítio anal. Isto também ocorre com o sorotipo V, mas somente em pacientes gestantes. Em mulheres não gestantes o sorotipo V foi mais abundante em cepas isoladas de urina quando comparado às do sítio vaginal. Em São Paulo, em mulheres gestantes, o sorotipo III foi mais abundante em cepas isoladas de urina quando comparada às isoladas de fúrcula. Infecções do trato urinário ocorrem em mulheres altamente colonizadas, o que aumenta o risco de infecções invasivas para o neonato durante a gestação (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011; SCHUCHAT, 1999).

Os sorotipos encontrados com maior prevalência na urina foram Ia, II, III e V, que correspondem à maioria das doenças invasivas em adultos e crianças (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011), e também foram os sorotipos com maior incidência de acordo com os resultados do presente estudo. O sorotipo Ia foi o mais prevalente, correspondendo a 50% das cepas, sendo significativamente mais abundante ($p<0,001$) que todos os outros sorotipos nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo. Na cidade de São José dos Campos sua prevalência não foi estatisticamente mais abundante quando comparado ao sorotipo V. A taxa de amostras do sorotipo Ia encontrada nesse estudo foi de 55,5% no Rio de Janeiro, 46,5% em São José dos Campos e 47,8% em São Paulo.

Quando comparada a resposta imune frente aos sorotipos Ia, Ib, II, III e V, a prevalência de anticorpos contra o sorotipo Ia é a menor (LEE; KIM; KIM, 2018). Há uma associação inversamente proporcional entre atividade fagocítica e infecção por EGB, isto é, quanto menor a atividade de opsonisação, maiores são as chances de infecção (KWATRA et al., 2015). A alta prevalência do sorotipo Ia encontrada neste estudo pode ser consequência da falta de produção de anticorpos específicos, ou da produção de anticorpos ineficientes, diminuindo assim a opsonização e consequente fagocitose do patógeno. A importância da produção de anticorpos na infecção por EGB pode direcionar estratégias para produção de vacinas anti-EGB (KWATRA et al., 2015). Desta forma, é importante o entendimento das diferentes respostas imunes frente aos diferentes sorotipos.

Um estudo brasileiro, que analisou amostras clínicas tanto de pacientes adultos colonizados quanto de infecções sintomáticas, encontrou uma alta prevalência do sorotipo Ia, que foi isolado em um número maior de amostras associadas à infecção quando comparado a amostras associadas à colonização (DUTRA et al., 2014).

O sorotipo Ia é o mais prevalente entre mulheres e também em pacientes pediátricos, além de estar associado à sepse neonatal precoce (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011; FURFARO; CHANG; PAYNE, 2018). Os sintomas de sepse precoce geralmente se manifestam nas primeiras 24 horas de vida, com uma taxa de fatalidade de 3% a 10% (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011). A colonização da mãe é considerada o maior fator de risco (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011), por isso a alta prevalência nos nossos resultados (50%) pode ser considerada um alerta ao risco de sepse precoce. Contudo, por também estar associado à colonização (DUTRA et al., 2014), mais estudos são necessários para compreensão da patogenicidade do sorotipo Ia.

O sorotipo V foi o segundo mais abundante. Durante a década de 1990 o sorotipo V era frequentemente associado a doenças invasivas tanto em adultos quanto em neonatos (BLUMBERG et al., 1996; EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011). Atualmente o sorotipo V é isolado de muitos casos de sepse neonatal precoce, além de ser o agente encontrado em uma grande parcela de casos de infecções em mulheres gestantes (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011), além de ser o sorotipo capsular mais comumente associado à doenças invasivas em adultos (TETTELIN et al., 2002).

A prevalência do sorotipo V foi significativamente maior na cidade de São José dos Campos ($p<0,05$) quando comparada às outras localidades. Um aumento na proporção deste sorotipo pode ser associado ao aumento na incidência de doenças invasivas em adultos (TETTELIN et al., 2002), portanto na cidade de São José dos Campos é necessária atenção quanto à infecção por EGB nessa população. Globalmente, o sorotipo V tem incidência de 9% em bebês de até três meses, e no continente Americano a incidência é maior, aproximadamente 15% (EDMOND et al., 2012). Paralelamente aos resultados apresentados aqui, estudamos as cepas de EGB isoladas de sepse neonatal da cidade de

São Paulo, e interessantemente, as maiores prevalências foram dos sorotipos Ia (57%) e V (21,4%) (dados não mostrados).

A incidência média do sorotipo V na Região Sudoeste é de 12,4% (DUTRA et al., 2014). Ao se avaliar a distribuição de sorotipos na cidade do Rio de Janeiro ao longo de oito anos (2008 a 2015), a maior prevalência encontrada foi de 12% (BOTELHO et al., 2018), a análise de cepas de origem humana e bovina, mostrou uma prevalência de 17,9% em amostras isoladas nos anos 2000 a 2006 (PINTO et al., 2013). As incidências do sorotipo V encontradas neste estudo nas cidades de São Paulo, São José dos Campos e Rio de Janeiro foram 15,22%, 38,61% e 19,19% respectivamente; portanto, a prevalência do sorotipo V nas três localidades abordadas neste estudo foi maior do que a perspectiva, de acordo com a literatura brasileira.

O sorotipo Ib corresponde a 6,85% das cepas deste estudo. Durante a década de 1980, o sorotipo Ib foi relacionado a uma epidemia de sepse neonatal tardia em uma UTI neonatal. Depois de diagnosticar cinco casos, o hospital decidiu implementar uma investigação, que procurou cepas de EGB entre todos os neonatos recém admitidos, mães e funcionários. Não foram encontradas evidências suficientes para ligar a epidemia a apenas uma cepa de EGB, mas as duas cepas suspeitas, isoladas de funcionários da enfermagem, pertenciam ao sorotipo Ib, ligando-o a possíveis infecções nosocomiais(NOYA et al., 1987). De acordo com Edmond e colaboradores, o sorotipo Ib corresponde a 7% das amostras de Estreptococos do Grupo B isoladas de bebês (EDMOND et al., 2012), incidência semelhante à encontrada neste estudo. São necessários mais estudos que possam relacionar a importância do sorotipo Ib com infecções hospitalares.

Durante um estudo com duração de sete anos nos Estados Unidos, o sorotipo II esteve profundamente relacionado com os casos de sepse neonatal precoce, sendo 13,1% dos isolados, também se mostrou prevalente entre doenças pediátricas e entre adultos, sendo 12,1% dos casos, o sorotipo associado à segunda maior fatalidade (PHARES et al., 2008). No presente estudo, o sorotipo II correspondeu a 7,19% das cepas; sendo que a prevalência entre as cidades foi variada. A menor prevalência foi de 2,97%, em São José

dos Campos, e a maior em São Paulo de 11,96%, e foi de 7,07% no Rio de Janeiro, contudo não houve diferença estatisticamente significativa nesses índices entre as cidades.

Foi observado que a gestação exerce influência quanto à prevalência dos sorotipos. O sorotipo II foi significativamente mais abundante em mulheres não gestantes quando comparado ao grupo de mulheres gestantes. São necessários estudos que correlacionem fatores do microrganismo à gestação para melhor compreender sua influência na colonização do sorotipo II.

O sorotipo III está associado a 60% - 85% dos casos de sepse tardia (ALHHAZMI; HURTEAU; TYRRELL, 2016b; BELLAIS et al., 2012; EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011). A proporção de amostras pertencentes ao sorotipo III encontradas nos Estados Unidos foi maior entre pacientes de sepse precoce e tardia quando comparada à dos pacientes com doenças pediátricas ou em adultos; e foi isolada em mais da metade dos casos de sepse tardia (PHARES et al., 2008). Entre os nossos resultados, o total de amostras identificadas como sorotipo III foi de 4,79%. Na cidade de São Paulo, houve maior prevalência do sorotipo III em mulheres gestantes quando comparado às não gestantes. É necessário um acompanhamento do perfil desta cidade para observar se o aumento do Sorotipo III entre as mulheres gestantes corresponde à um aumento nos casos de sepse tardia.

Houve variação na prevalência entre as localidades. No Rio de Janeiro e em São José dos Campos a prevalência foi de 1,01% e 1,98% respectivamente, em São Paulo a média foi muito superior à das outras cidades, sendo 11,96% das cepas isoladas pertencentes ao sorotipo III. Ao redor do mundo o sorotipo III é um dos mais prevalentes, seja no continente africano (GRAY et al., 2011; MOYO et al., 2000), no continente americano (DAVIES et al., 2001; IPPOLITO et al., 2010), no continente europeu (LIÉBANA-MARTOS et al., 2015) e asiático (WANG et al., 2015).

Nenhuma amostra do sorotipo IV foi encontrada; o que é inesperado, porque dados brasileiros anteriores registraram 17% de incidência (DUTRA et al., 2014). Contudo na literatura internacional, esse sorotipo corresponde a apenas 1% das amostras isoladas de

bebês (EDMOND et al., 2012). Portanto são necessários estudos futuros para melhor compreensão da prevalência do sorotipo IV entre mulheres e entre neonatos.

Não foram encontradas cepas dos sorotipos VII e VIII em nenhuma das localidades; um resultado corroborado pela literatura, já que a incidência e a dos sorotipos VII e VIII não chega a 1% em bebês com menos de três meses (KWATRA et al., 2016). Apenas uma cepa do sorotipo IX foi encontrada, em São Paulo; sendo o sorotipo mais recente, proposto em 2007, logo, há dificuldade em determinar sua prevalência (SLOTVED et al., 2007). Foi isolada uma cepa do sorotipo VI na cidade de São José dos Campos. Cepas pertencentes à este sorotipo são incomuns, com incidência de 1% em bebês (KWATRA et al., 2016), e normalmente não são encontrados entre mulheres brasileiras (BOTELHO et al., 2018; DUTRA et al., 2014).

Poucas diferenças foram encontradas entre os dados nacionais e internacionais quanto à incidência de sorotipos. Apesar da associação de sorotipos com determinadas infecções e seus efeitos (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011), não há um número de estudos analisando a prevalência de sorotipos suficiente para que se obtenha um panorama mundial (KWATRA et al., 2016); portanto, são necessários mais estudos, tanto nacionais quanto internacionais.

A relação entre a presença de genes de virulência e a distribuição dos sorotipos foi analisada nesse trabalho. Os genes de hialuronidase (*hylB*) e β-hemolisina/citolisina (*cylE*) estão presentes em praticamente todas as amostras, independentemente de seu sorotipo. Além disso, todos os genes pesquisados foram encontrados nas amostras, mostrando uma disseminação desses fatores de virulência entre as populações de microrganismos de diferentes origens. Uma alta atividade de hialuronidase representa maior capacidade de invasão e maior incidência de partos pré-termo, pois essa enzima participa não somente do processo de evasão do sistema imunológico, mas também da ascensão do microrganismo do trato geniturinário até o útero (KOLAR et al., 2015; VORNHAGEN; ADAMS; RAJAGOPAL, 2017).

Até o momento, não há relação entre sorotipos e prevalência do gene *hylB,* (OTAGUIRI et al., 2013; VORNHAGEN; ADAMS; RAJAGOPAL, 2017), sendo altamente disseminado entre amostras de origem clínica (OTAGUIRI et al., 2013), o que é observado nos nossos resultados.

Todos os genes de virulência foram encontrados entre os sorotipos mais comuns, sendo assim eles podem ser considerados potencialmente patogênicos. O fator β-hemolisina/citolisina contribui para o desenvolvimento de meningite, causa parto pré-termo (DORAN; LIU; NIZET, 2003; RANDIS et al., 2014) e de morte do feto (DORAN; LIU; NIZET, 2003).

De acordo com a literatura, amostras clínicas de EGB possuem ao menos uma ilha de pili (KHODAEI et al., 2018; OTAGUIRI et al., 2013; ROSINI et al., 2006), e isso foi observado nos nossos resultados. Atualmente, essas proteínas estão sendo amplamente estudadas para o desenvolvimento de vacinas (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011; KHODAEI et al., 2018; ROSINI et al., 2006).

Pili é mais comumente encontrada em bactérias GRAM negativas, sendo que poucas bactérias GRAM positivas possuem essa estrutura (HUI WU; FIVES-TAYLOR, 2001). Em EGB, a pili possui três componentes, uma adesina, uma proteína responsável pela ancoragem à parede celular, e uma proteína base (DRAMSI et al., 2006). Sendo que a síntese de adesina independe da síntese de pili, portanto a estrutura completa não é necessária para a adesão do microrganismo a células epiteliais humanas (DRAMSI et al., 2006).

Pili 1, 2A e 2B são ilhas genômicas que contém os três elementos que compõe a estrutura do pilus (DRAMSI et al., 2006; ROSINI; MARGARIT, 2015). As três sequências analisadas neste trabalho pertencem às ilhas 1 e 2, e pili 2A e pili 2B são variações da mesma ilha (pili 2) (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). A provocação de mutações no gene que codifica a proteína que forma o esqueleto da pilus, ou seu bloqueio utilizando anticorpos, impede a formação de biofilme; portanto pilus é essencial para formação de biofilme, o que contribui para a patogenicidade de EGB (ROSINI; MARGARIT, 2015).

Cada ilha de pili está associada com diferentes mecanismos de patogenicidade de EGB (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). Pili 1, apesar de não contribuir para na adesão ao epitélio vaginal, promove a evasão da resposta imune inata (JIANG et al., 2012; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). Pili 2A contribui na adesão e formação de biofilme (KONTO-GHIORGHI et al., 2009; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018), e pili 2B tem um papel na sobrevivência intracelular bacteriana no macrófago (CHATTOPADHYAY et al., 2011; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018), na invasão celular (LAZZARIN et al., 2017; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018) e na penetração da barreira hematoencefálica (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018; SPRINGMAN et al., 2014).

As cepas analisadas neste estudo possuem, em sua maioria, uma ilha de pili 1 e uma variante de pili-2, evidenciando a capacidade do EGB de evadir o sistema imune, ou aderir ao epitélio, mecanismos que são essenciais para que esse microrganismo passe de comensal a patógeno (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018).

No Rio de Janeiro houve maior prevalência de cepas que possuem pili 2B entre o sorotipo III. Em São José dos Campos, cepas pertencentes ao sorotipo II possuem pili 2A em maior abundância se comparada a pili 1, e entre o sorotipo Ib pili 1 é mais abundante se comparada à pili 2A. A diferença encontrada entre a prevalência de fatores de virulência, associada à prevalência de sorotipos pode levar à conclusão que cepas de diferentes sorotipos podem possuir um perfil patogênico diferente.

Na cidade de São José dos Campos a menor prevalência de pili 2A foi encontrada em cepas isoladas de secreção vaginal, quando comparada aos outros sítios. Pili 2A está relacionada à formação de biofilme, diferentemente de pili 1 e 2B (RINAUDO et al., 2010). Assim como cepas isoladas de urina pode ser traduzido como um risco de infecção neonatal (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011), a ausência de pili 2A de cepas de secreção vaginal pode significar que cepas colonizando a microbiota vaginal possuem menos recursos para infectar o feto durante a gestação, já que a distribuição de ilhas de pili determina a capacidade de colonização e de causar infecções invasivas (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). Da mesma forma a menor prevalência de pili 2B foi encontrada em cepas isoladas de

introito vaginal, sendo que pili 2B está relacionada à capacidade de invadir células do hospedeiro (LAZZARIN et al., 2017), pode-se inferir que cepas desse sítio terão menor capacidade de causar doenças invasivas.

Depois da implementação das diretrizes do CDC quanto à antibioticoterapia intraparto, houve uma diminuição significativa na incidência dos casos de sepse neonatal precoce nos Estados Unidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010). O antibiótico de escolha para o tratamento profilático de EGB é a Penicilina, caso a paciente seja alérgica, Clindamicina ou Vancomicina são possíveis alternativas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010).

A prevalência de cepas resistentes a Eritromicina e Clindamicina tem aumentado ao redor do mundo (MANNING et al., 2003; MURDOCH; BARTH RELLER, 2001; TEATERO et al., 2017) e no Brasil (CORRRÊA et al., 2011; MELO et al., 2016; NAKAMURA et al., 2011). Em 2011, 28% de todas as amostras de EGB isoladas nos Estados Unidos eram resistentes a Clindamicina. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). Tanto Eritromicina quanto Clindamicina podem deixar de ser uma alternativa à Penicilina no tratamento de infecções por EGB (MURDOCH; BARTH RELLER, 2001). Para determinar o verdadeiro grau de resistência com maior sensibilidade, e os mecanismos de resistência presentes nas cepas isoladas no presente trabalho, são necessárias análises mais aprofundadas.

Como esperado, não foram encontradas cepas resistentes a Penicilina e Vancomicina, porém, nas três localidades estudadas, foram encontradas cepas resistentes a Clindaminica, Eritromicina e Cefepima. Entre os sorotipos, a resistência a Clindamicina foi mais expressiva no sorotipo V, mas também foi significativamente maior no sorotipo Ia.

Além disso, em São Paulo e no Rio de Janeiro, cepas resistentes a Clindamicina apresentaram perfil de resistência induzida (iMLSB) com mais frequência, sendo que o oposto ocorreu em São José dos Campos, onde o fenótipo de resistência constitutiva (cMLSB) foi o mais prevalente. Nesta cidade, todas as cepas com fenótipo iMLSB pertencem ao sorotipo V.

No Rio de Janeiro todas as cepas com fenótipo cMLSB foram consideradas não tipáveis e em São Paulo, todas pertencem ao sorotipo III. Essas divergências refletem não somente o aumento da prevalência de cepas resistentes, mas também a diferença entre as localidades, o que pode ser resultado de seleção através do uso indiscriminado de antibióticos, o que vem de políticas públicas locais. Não há resultados prévios na literatura relacionando à resistência com diferentes sorotipos capsulares e localização geográfica.

Em geral, os resultados obtidos contribuem para um melhor entendimento da distribuição fenotípica de Estreptococos do Grupo B com relação à localidade e sua relação com a gestação. Este trabalho visa mostrar que é possível, através da análise de amostras de mulheres sadias, gestantes e não gestantes, traçar um perfil do microrganismo. É possível observar que há diferenças na distribuição de sorotipos quanto à localidade e quanto à gestação, pode-se concluir que há uma relação entre patogenicidade e sorotipo, contudo mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese. Nossos resultados contribuem para a pressuposição de que a patogenicidade das cepas não se limita à composição do polissacarídeo capsular.

Este estudo inclui limitações, tais como: cepas foram obtidas de banco de cepas e não houve contato entre o nosso grupo e as pacientes, a pesquisa de genes de virulência avaliou a presença não a expressão desses genes, foi avaliada a sensibilidade a antimicrobianos mas não o seu mecanismo de resistência.

7. Conclusão

- De acordo com a classificação de sorotipos, os sorotipos Ia e V foram os mais prevalentes;
- Todos os fatores de virulência foram encontrados nas cepas. Hialuronidase e β-citolisina/hemolisina só não foram encontradas em três cepas do Rio de Janeiro. Entre as ilhas de pili pesquisadas, pili 1 teve a maior prevalência (79,45%). Houve diferenças entre Pili 2A e Pili 2B e alguns sorotipos.
- Não foram encontradas cepas resistentes a Penicilina ou Vancomicina. A resistência a Eritromicina e Clindamicina ficou em torno de 20%; os fenótipos constitutivo (cMLSB) e induzido (iMLSB) tiveram prevalências semelhantes entre os sorotipos. Além disso, foram encontradas cepas resistentes a Cefepima.
- Foram encontradas diferenças entre a resistência a Eritromicina e Clindamicina, sendo maior entre os sorotipos Ia e V, principalmente em São José dos Campos.
- A comparação entre os sítios de isolamento mostrou que há variações tanto na distrubuição de sorotipos quanto na distribuição de genes de virulência. Estes resultados podem ser correlacionados com a patogenicidade das diferentes cepas de EGB.
- Comparando-se os grupos de mulheres gestantes e não gestantes, houve diferença na prevalência do sorotipo III. E comparando os resultados de sorotipos entre as localidades, o sorotipo V foi significativamente mais abundante na cidade de São José dos Campos.

“Declaro que o documento de defesa de dissertação apresentado foi escrito por mim e que as citações de outros autores estão devidamente indicadas e referenciadas no texto. Declaro, ainda, que esse documento foi submetido a análise de similaridade pela ferramenta CopySpider para garantir sua integridade quanto à ocorrência de plágio".

9. Referências

ALHHAZMI, A.; HURTEAU, D.; TYRRELL, G. J. Epidemiology of invasive group b streptococcal disease in Alberta, Canada, from 2003 to 2013. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1774–1781, 2016a.

ALHHAZMI, A.; HURTEAU, D.; TYRRELL, G. J. Epidemiology of invasive group b streptococcal disease in Alberta, Canada, from 2003 to 2013. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1774–1781, 2016b.

ANVISA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica - Módulo 5. **Files.Microbiologia.Webnode.Com**, 2004.

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

BAKER, J. R.; PRITCHARD, D. G. Action pattern and substrate specificity of the hyaluronan lyase from group B streptococci. **Biochemical Journal**, v. 348, n. 2, p. 465–471, 2000.

BELLAIS, S. et al. Capsular switching in group B streptococcus CC17 hypervirulent clone: A future challenge for polysaccharide vaccine development. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 11, p. 1745–1752, 2012.

BENCHETRIT, L. C. et al. Carriage of Streptococcus agalactiae in Women and Neonates and Distribution of Serological Types : a Study in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 787–790, 1982.

BENITZ, W. E.; GOULD, J. B.; DRUZIN, M. L. Risk Factors for Early-onset Group B Streptococcal Sepsis: Estimation of Odds Ratios by Critical Literature Review. **Pediatrics**, v. 103, n. 6, p. e77–e77, 1999.

BERALDO, C. et al. Prevalência da colonização vaginal e anorretal por estreptococo do grupo B em gestantes do terceiro trimestre. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 7, p. 543–549, 2004.

BLUMBERG, H. M. et al. Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype

V. **J Infect Dis**, v. 173, n. 2, p. 365–373, 1996.

BORGER, I. L. et al. Streptococcus agalactiae em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 10, p. 575–579, 2005.

BOTELHO, A. C. N. et al. Streptococcus agalactiae carriage among pregnant women living in Rio de Janeiro, Brazil, over a period of eight years. **PloS one**, v. 13, n. 5, p. e0196925, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Atenção ao pré-natal de baixo risco**. Brasilia: Editora do Ministério da Saúde, 2012.

BRCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST Tabelas de pontos de corte para interpreta. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, p. 1–58, 2017.

BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. **Morbidity and Mortality Weekly**, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. Revised Guidelines from CDC, 2010. **Morbidity and Mortality Weekly**, v. 59, n. No. RR-10, p. 1–32, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. Atlanta, Georgia: [s.n.]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>.

CHARREL-DENNIS, M. et al. TLR-Independent Type I Interferon Induction in Response to an Extracellular Bacterial Pathogen via Intracellular Recognition of Its DNA. **Cell Host and Microbe**, v. 4, n. 6, p. 543–554, 2008.

CHATTOPADHYAY, D. et al. Phylogenetic lineage and pilus protein Spb1/SAN1518 affect opsonin-independent phagocytosis and intracellular survival of Group B Streptococcus.

Microbes and Infection, v. 13, n. 4, p. 369–382, 2011.

CHRISTINE, R.; ATKINS, N.; MUNCH-PETERSEN, E. A note on a lytic phenomenon shown by group B Streptococci. **Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science**, v. 22, p. 197–200, 1944.

CIESLEWICZ, M. J. et al. Structural and genetic diversity of group B Streptococcus capsular polysaccharides. **Infection and Immunity**, 2005.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** 28. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

CORRRÊA, A. B. DE A. et al. The genetic diversity and phenotypic characterization of Streptococcus agalactiae isolates from Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 1002–1006, 2011.

COSTA, A. L. DOS R. et al. Prevalência de colonização por estreptococos do grupo B em gestantes atendidas em maternidade pública da região Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 6, p. 274–280, 2008.

COSTA, H. DE P. F. **Prevenção da Doença Perinatal Pelo Estreptococo do Grupo BSociedade Brasileira de Pediatria**, 2011.

DAVIES, H. D. et al. Antibodies to capsular polysaccharides of group B Streptococcus in pregnant Canadian women: relationship to colonization status and infection in the neonate. **The Journal of infectious diseases**, v. 184, n. 3, p. 285–291, 2001.

DORAN, K. S.; LIU, G. Y.; NIZET, V. Group B streptococcal beta-hemolysin/ cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 5, p. 736–744, 2003.

DORAN, K. S.; NIZET, V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: No longer in its infancy. **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 23–31, 2004.

DRAMSI, S. et al. Assembly and role of pili in group B streptococci. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1401–1413, 2006.

DUTRA, V. G. et al. Streptococcus agalactie in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobiol suscetibility. **BMC Infect Dis**, v. 14, n. 1, p. 323–30, 2014.

EDMOND, K. M. et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: Systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 379, n. 9815, p. 547–556, 2012.

EDWARDS, M. S.; NIZET, V.; BAKER, C. J. Group B Streptococcal Infections. In: **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn**. 6. ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2011. p. 419–469.

EICKHOFF, T. C. et al. Neonatal Sepsis and Other Infections Due to Group B Beta-Hemolytic Streptococci. **New England Journal of Medicine**, v. 271, n. 24, p. 1221–1228, 1964.

EUCAST. Método de disco-difusão EUCAST para Teste sensibilidade aos antimicrobianos. v. 0, p. 23, 2015.

FIEBELKORN, K. R. et al. Practical Disk Diffusion Method for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci. **Journal of Clinical Investigation**, v. 41, n. 10, p. 4740–4744, 2003.

FUNÇÃO, J.; NARCHI, N. **Pesquisa do estreptococo do Grupo B em gestantes da Zona Leste de São Paulo**.

FURFARO, L. L.; CHANG, B. J.; PAYNE, M. S. Perinatal Streptococcus agalactiae Epidemiology and Surveillance Targets. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–18, 2018.

GIMÉNEZ, M. et al. Evolución de la sepsis neonatal precoz por Streptococcus agalactiae en el área de Barcelona (2004-2010). Análisis de los fallos del cumplimiento del protocolo de prevención. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica Monografias**, v. 33, n. 7, p. 446–450, 2015.

GRAY, K. J. et al. Group B Streptococcus and HIV infection in pregnant women, Malawi, 2008-2010. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1932–5, 2011.

HALL, J. et al. Maternal Disease With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide : Systematic Review and. v. 65, n. 1, 2017.

HENSLER, M. E. et al. CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B Streptococcus. **Microbial Pathogenesis**, v. 44, n. 1, p. 84–88, 2008.

HUI WU; FIVES-TAYLOR, P. M. Molecular Strategies for Fimbrial Expression and Assembly. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 12, n. 2, p. 101–115, mar. 2001.

IMPERI, M. et al. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of Streptococcus agalactiae. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 2, p. 212–214, 2010.

IPPOLITO, D. L. et al. Group B streptococcus serotype prevalence in reproductive-age women at a tertiary care military medical center relative to global serotype distribution. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, 2010.

JIANG, S. et al. Regulation and function of pilus island 1 in group B Streptococcus. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 10, p. 2479–2490, 2012.

JURGENS, B. Y. D.; STERZIK, B.; FEHRENBACH, F. J. UNSPECIFIC BINDING OF GROUP B STREPTOCOCCAL COCYTOLYSIN (CAMP FACTOR) TO IMMUNOGLOBULINS AND ITS POSSIBLE ROLE IN PATHOGENICITY. v. 165, n. March, 1987.

KAPATAI, G. et al. Comparison of molecular serotyping approaches of Streptococcus agalactiae from genomic sequences. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2017.

KHODAEI, F. et al. Pilus–encoding islets in S. agalactiae and its association with antibacterial resistance and serotype distribution. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, n. October 2017, p. 189–194, 2018.

KOLAR, S. L. et al. Group B Streptococcus Evades Host Immunity by Degrading Hyaluronan. **Cell Host and Microbe**, v. 18, n. 6, p. 694–704, 2015.

KONTO-GHIORGHI, Y. et al. Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in Streptococcus agalactiae. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 5, 2009.

KWATRA, G. et al. Natural acquired humoral immunity against serotype-specific group B Streptococcus rectovaginal colonization acquisition in pregnant women. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 6, p. 568.e13-568.e2, 2015.

KWATRA, G. et al. Prevalence of maternal colonisation with group B streptococcus: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. 1076–

1084, 2016.

LANCEFIELD, R. C. A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND OTHER GROUPS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI. **The Journal of experimental medicine**, 1933.

LANG, S. et al. Streptococcus agalactiae CAMP factor binds to GPI-anchored proteins. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 196, n. 1, p. 1–10, 2007.

LANG, S.; PALMER, M. Characterization of Streptococcus agalactiae CAMP factor as a pore-forming toxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 40, p. 38167–38173, 2003.

LAUER, P. Genome Analysis Reveals Pili in Group B Streptococcus. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 105–105, 2005.

LAZZARIN, M. et al. Contribution of pilus type 2b to invasive disease caused by a Streptococcus agalactiae ST-17 strain. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 2–9, 2017.

LECLERCQ, R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 482–492, 2002.

LEE, J. H.; KIM, H. W.; KIM, K. H. Seroprevalence of opsonophagocytic antibodies against serotype Ia, Ib, II, III, and V Group B streptococcus among Korean population. **Journal of Korean Medical Science**, v. 33, n. 16, p. 1–10, 2018.

LIÉBANA-MARTOS, M. D. C. et al. Serotypes and antibiotic resistance patterns in beta-hemolytic Streptococcus agalactiae isolates in colonized mothers and newborns with invasive disease. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica**, v. 33, n. 2, p. 84–88, 2015.

LINHARES, J. J. et al. Prevalência de colonização por Streptococcus agalactiae em gestantes atendidas em maternidade do Ceará, no Brasil, correlacionando com os resultados perinatais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 33, n. 12, p. 395–400, 2011.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms, 13th Edition**. 13. ed. Upper Saddle River, NJ, USA: Benjamin-Cummings, 2012.

MAGON, N.; KUMAR, P. Hormones in pregnancy. **Nigerian Medical Journal**, 2012.

MANNING, S. D. et al. Correlates of antibiotic-resistant group B streptococcus isolated from pregnant women. **Obstetrics and Gynecology**, v. 101, n. 1, p. 74–79, 2003.

MANNING, S. D. et al. DNA polymorphism and molecular subtyping of the capsular gene cluster of group B [i]Streptococcus[/i]. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 6113–6116, 2005.

MARCONI, C. et al. Detection of Streptococcus agalactiae colonization in pregnant women by using combined swab cultures: cross-sectional prevalence study. **Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, v. 128, n. 2, p. 60–62, 2010.

MARIMÓN, J. M. et al. Erythromycin resistance and genetic elements carrying macrolide efflux genes in Streptococcus agalactiae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5069–5074, 2005.

MARTINS, E. R.; MELO-CRISTINO, J.; RAMIREZ, M. Reevaluating the serotype II capsular locus of Streptococcus agalactiae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3384–3386, 2007.

MELO, S. C. C. S. DE et al. ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF Streptococcus agalactiae ISOLATED FROM PREGNANT WOMEN. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. 1, p. 83, 2016.

MELO, S. C. C. S. DE et al. Prevalence of Streptococcus agalactiae colonization in pregnant women from the 18 th Health Region of Paraná State. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 60, n. 2, p. 2–7, 2018.

MOYO, S. R. et al. Prevalence, capsular type distribution, anthropometric and obstetric factors of group B Streptococcus (Streptococcus agalactiae) colonization in pregnancy. **Cent Afr J Med**, 2000.

MURDOCH, D. R.; BARTH RELLER, L. Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated from patients with invasive disease: 10-Year perspective. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3623–3624, 2001.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 7. ed. Rio de

Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005.

NAKAMURA, P. A. M. et al. Antimicrobial resistance profiles and genetic characterisation of macrolide resistant isolates of Streptococcus agalactiae. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 119–122, 2011.

NOMURA, M. L. et al. Colonização materna e neonatal por estreptococo do grupo B em situações de ruptura pré-termo de membranas e no trabalho de parto prematuro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 8, p. 397–403, 2009.

NOYA, F. J. D. et al. Unusual occurrence of an epidemic of type ib/c group b streptococcal sepsis in a neonatal intensive care unit. **Journal of Infectious Diseases**, v. 155, n. 6, p. 1135–1144, 1987.

NURIEL-OHAYON, M.; NEUMAN, H.; KOREN, O. Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1–13, 2016.

OLIVEIRA, M. V.; TELES, M. F.; VIANA, T. A. PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À COLONIZAÇÃO POR Streptococcusagalactiae EM GESTANTES ATENDIDAS NO HOSPITAL MUNICIPAL ESAÚ MATOS EM VITÓRIA DA CONQUISTA – BA. **C&D-Revista Eletrônica da Fainor,** v. 6, n. 1, p. 172–184, 2013.

OPLUSTIL, C. P. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 3. ed. São Paulo, SP - Brasil: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda., 2010.

OTAGUIRI, E. S. et al. Commensal Streptococcus agalactiae isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: Capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, 2013.

PHARES, C. R. et al. Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Disease in the United States, 1999-2005. **JAMA**, v. 2008, n. 17, p. 2056–2065, 2008.

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

POGERE, A. Prevalência da colonização pelo estreptococo do grupo B em gestantes atendidas no ambulatório de pré-natal do Hospital Universitário da Universidade Federal de

Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 4, p. 229–229, 2005.

PRITZLAFF, C. A. et al. Genetic basis for the beta-haemolytic/cytolytic activity of group B Streptococcus. **Molecular microbiology**, v. 39, n. 2, p. 236–47, 2001.

RANDIS, T. M. et al. Group B Streptococcus β-hemolysin/cytolysin breaches maternal-fetal barriers to cause preterm birth and intrauterine fetal demise in vivo. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 2, p. 265–273, 2014.

RINAUDO, C. D. et al. Specific Involvement of Pilus Type 2a in Biofilm Formation in Group B Streptococcus. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. 1–11, 2010.

ROSEN, G. H. et al. Group B Streptococcus and the Vaginal Microbiota. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 6, p. 744–751, 2017.

ROSINI, R. et al. Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in Streptococcus agalactiae. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 126–141, 2006.

ROSINI, R.; MARGARIT, I. Biofilm formation by Streptococcus agalactiae: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. February, p. 2013–2016, 2015.

RUSSELL, N. J. et al. Maternal Colonization With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide : Systematic Review and. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. Suppl 2, p. S100–S111, 2017.

SCHRAG, S. et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. MMWR Recomm Rep. **MMWR Recomm Rep**, v. 51, p. 1–22, 2005.

SCHUCHAT, A. Epidemiology of Group B Streptococcal Disease in the United States: Shifting Paradigms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 497–513, 1 jul. 1998.

SCHUCHAT, A. Group B streptococcus. **The Lancet**, v. 353, p. 51–56, 1999.

SHABAYEK, S.; SPELLERBERG, B. Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 437, p. 1–14, 14 mar. 2018.

SIMOES, J. A. et al. Phenotypical characteristics of group B streptococcus in parturients. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 261–266, 2007.

SLOTVED, H. C. et al. Serotype IX, a proposed new Streptococcus agalactiae serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2929–2936, 2007.

SPRINGMAN, A. C. et al. Pilus distribution among lineages of Group B Streptococcus: An evolutionary and clinical perspective. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2014.

TAMINATO, M. et al. Screening for group b streptococcus in pregnant women: A systematic review and meta-analysis. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 19, n. 6, p. 1470–1478, 2011.

TEATERO, S. et al. Serotype Distribution, Population Structure, and Antimicrobial Resistance of Group B Streptococcus Strains Recovered from Colonized Pregnant Women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 412–422, fev. 2017.

TETTELIN, H. et al. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V Streptococcus agalactiae. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 19, p. 12391–12396, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. San Francisco: Pearson, 2012.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo, SP - Brasil: Editora Atheneu, 2004.

VENTURA, M. S. M. et al. Colonização por Streptococcus do Grupo B em Gestantes com Trabalho de Parto Prematuro e/ou Ruptura Prematura das Membranas. **Arquivos de Medicina**, v. 25, n. 2, p. 61–66, 2011.

VERANI, J. R.; MCGEE, L.; SCHRAG, S. J. Morbidity and Mortality Weekly Report Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. v. 59, 2010.

VORNHAGEN, J.; ADAMS, K. M. A.; RAJAGOPAL, L. Perinatal Group B Streptococcal Infections: Virulence Factors, Immunity, and Prevention Strategies. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 919–931, 2017.

WANG, P. et al. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles

of Streptococcus agalactiae isolates circulating in Beijing, China. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.

WESSELS, M. R. Biology of streptococcal capsular polysaccharides. **Society for Applied Bacteriology symposium series**, v. 26, p. 20S–31S, 1997.

YAMAMOTO, Y. et al. Respiration metabolism of Group B Streptococcus is activated by environmental haem and quinone and contributes to virulence. **Molecular Microbiology**, 2005.