

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOPATOLOGIA  
E TOXICOLOGIA)  
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Cilicia Silvério Nascimento

Interação de cepas de *Lactobacillus crispatus* com *Streptococcus agalactiae* em  
culturas celulares mimetizando o ambiente vaginal

São Paulo

2024

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOPATOLOGIA  
E TOXICOLOGIA)  
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Cilicia Silvério Nascimento

Interação de cepas de *Lactobacillus crispatus* com *Streptococcus agalactiae* em  
culturas celulares mimetizando o ambiente vaginal

Versão Corrigida

Tese para obtenção do título de doutor;  
Universidade de São Paulo; área de  
concentração Departamento de  
Fisiopatologia e Toxicologia

Orientador: Carla R. Taddei

São Paulo

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP  
Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

N244i Nascimento, Cilicia  
Interação de cepas de *Lactobacillus crispatus* com *Streptococcus agalactiae* em culturas celulares mimetizando o ambiente vaginal / Cilicia Nascimento. - São Paulo, 2024.  
93 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Farmácia.  
Orientador: Taddei, Carla

1. microbiologia médica. 2. STREPTOCOCCUS. 3. LACTOBACILLUS. I. T. II. Taddei, Carla, orientador.

Cilicia Nascimento

Interação de cepas de *Lactobacillus crispatus* com *Streptococcus agalactiae* em culturas celulares mimetizando o ambiente vaginal; Tese para obtenção do título de doutor; Universidade de São Paulo; área de concentração 9142;

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Carla R. Taddei

---

1o. Examinador

---

2o. Examinador

---

3o. Examinador

---

4o. Examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2024.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho à Cirene, mulher, mãe, exemplo em tudo, que sempre acreditou nos meus sonhos.

Saudades, mãe.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu ar para respirar, sabedoria para trabalhar, forças para continuar e resiliência para permanecer em pé.

Agradeço ao meu pai, e ao meu irmão, que seguraram a minha mão e enxugaram as minhas lágrimas.

Aos meus amigos, ouvintes pacientes de todos os meus desabafos.

Aos meus colegas de laboratório, pela constante disposição em ajudar, pelo sustento e companheirismo.

À professora Dra. Tatiane Pinto, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e a todos os seus alunos, que, com grande entusiasmo me receberam e ofereceram treinamento e apoio.

À professora Dra. Silvy Stuchi, da Universidade de São Paulo, e aos seus alunos, por me receberem em seu laboratório, e pela disposição em me ensinar.

Ao professor Dr. Waldir Elias Pereira Junior, do Instituto Butantã, que me recebeu em seu laboratório e possibilitou a realização dos ensaios de proteínas.

À Dr. Carolina Ramos Moreno, pelo fornecimento das células Hela e pelo suporte no decorrer do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Finalmente, à minha orientadora, que investiu em mim desde o início, e enxergou em mim o potencial que nem eu mesma enxerguei.

## **EPÍGRAFE**

*“A ciência não é ameaçada por Deus; ela é aprimorada. Certamente Deus não é ameaçado pela ciência; Ele a possibilitou por completo”.*

(Collin, Francis S., 2007, p. 237)

## RESUMO

**NASCIMENTO, C. S.** Interação de cepas de *Lactobacillus crispatus* com *Streptococcus agalactiae* em culturas celulares mimetizando o ambiente vaginal. 2023. 93f. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

A microbiota vaginal é dominada pelo gênero *Lactobacillus*, mantendo um pH ácido crucial para a saúde. Alterações hormonais e a menopausa podem impactar essa microbiota. Estreptococos do Grupo B (EGB) são associados a infecções neonatais e podem colonizar a microbiota vaginal. A interação entre *Lactobacillus* e EGB é complexa, com resultados conflitantes em estudos *in vitro* e *in vivo*. O uso de probióticos contendo *Lactobacillus* pode ter benefícios, como alterar a positividade para EGB em um grupo que recebeu o tratamento. Contudo a replicabilidade deste resultado é limitada, e os mecanismos envolvidos nessa interação ainda são pouco elucidados. Portanto o objetivo desse estudo foi caracterizar cepas de EGB, avaliar sua interação com *L. crispatus* em diversas condições. Neste estudo foram selecionadas seis cepas, pertencentes aos sorotipos Ia, II, III e V. Essas cepas foram caracterizadas de acordo com o sorotipo capsular, presença de genes de virulência (hialuronidase,  $\beta$ -citolisina/hemolisina, e ilhas de pili 1, 2a e 2b), resistência a antimicrobianos (penicilina, cefepima, vancomicina, eritromicina e clindamicina), curva de crescimento, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST). O resultado de MLST identificou os *sequence types* ST1, ST23 ST28 e ST182, e os *clonal complexes* CC1, CC19 e CC23. Cepas possuem a maior parte dos genes de virulência testados. Somente uma cepa apresentou alguma resistência, no caso à eritromicina e clindamicina. Resultados que estão de acordo com a literatura como os principais descritos em isolados clínicos. Os ensaios de interação realizados foram: crescimento em co-cultura, formação de biofilme, ensaios de adesão e exclusão em cultura celular e por fim, análise do perfil proteico. Alguns efeitos de *L. crispatus* no EGB observados foram aumento na formação de biofilme de EGB e diminuição da sua proliferação quando em co-cultura. Contudo esses resultados variaram de acordo com a cepa de EGB. Nos ensaios de competição em cultura celular, a presença de *L. crispatus* levou à diminuição da adesão em uma cepa pertencente ao sorotipo III, e aumento de adesão em uma cepa pertencente ao sorotipo V. Quando a cultura de células recebeu tratamento prévio de *L. crispatus*, nos ensaios de exclusão, houve menor adesão de EGB. Contudo todos os efeitos observados são cepa-dependente; não foram encontradas associações entre o comportamento das cepas e seu sorotipo capsular ou fenótipo MLST. Estudos futuros podem elucidar as respostas ativadas na presença de microrganismos comensais.

Palavras-chave: microbiota vaginal, Estreptococos, MLST, *Lactobacillus*, virulência, colonização.



## ABSTRACT

**NASCIMENTO, C. S.** Interaction between *Lactobacillus crispatus* and *Streptococcus agalactiae* strains in cell cultures mimicking the vaginal environment. 2023. 93f. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The vaginal microbiota is dominated by the genus *Lactobacillus*, which helps to maintain a crucial acidic pH for health. Hormonal changes and menopause can impact this microbiota. Group B Streptococcus (GBS) are associated with neonatal infections and can colonize the vaginal microbiota. The interaction between *Lactobacillus* and GBS is complex, with conflicting results in *in vitro* and *in vivo* studies. The use of probiotics containing *Lactobacillus* may have benefits, such as altering GBS positivity in a treated group. However, the replicability of this result is limited, and the mechanisms involved in this interaction are still poorly understood. The use of probiotics containing *Lactobacillus* may have some benefits, but further research is needed. These strains were characterized based on capsular serotype, presence of virulence genes (hyaluronidase,  $\beta$ -cytolysin/hemolysin, and pili islands 1, 2a, and 2b), antimicrobial resistance (penicillin, cefepime, vancomycin, erythromycin, and clindamycin), growth curve, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), and Multi-Locus Sequence Typing (MLST). Therefore, the aim of this study was to characterize GBS strains, evaluate their interaction with *L. crispatus* under various conditions. Six strains were selected for this study, belonging to serotypes Ia, II, III, and V. MLST results identified sequence types ST1, ST23, ST28, and ST182, and clonal complexes CC1, CC19, and CC23. Most strains possessed the tested virulence genes, with only one strain showing resistance to erythromycin and clindamycin. These results are in line with the literature. Interaction assays included co-culture growth, biofilm formation, adhesion and exclusion assays in cell culture, and, finally, protein profile analysis. Some observed effects of *L. crispatus* on GBS included an increase in GBS biofilm formation and a decrease in GBS proliferation during co-culture. However, these results varied according to the GBS strain. GBS interaction with *L. crispatus* resulted in increased biofilm formation and decreased proliferation in co-culture. In cell culture competition assays, the presence of *L. crispatus* led to decreased adhesion in one GBS strain belonging to serotype III and increased adhesion in one strain belonging to serotype V. When cell culture received pre-treatment with *L. crispatus*, exclusion assays showed lower GBS adhesion. However, all observed effects are strain-dependent; no associations were found between strain behavior and capsular serotype or MLST phenotype. Future studies may elucidate the responses activated in the presence of commensal microorganisms.

Keywords: vaginal microbiome, *Streptococcus*, MLST, *Lactobacillus*, virulence, colonization.

# Sumário

1	Introdução .....	12
1.1	Microbiota Vaginal .....	12
1.2	<i>L. crispatus</i> .....	16
1.3	Estreptococos do Grupo B (EGB) .....	18
1.4	EGB e a microbiota vaginal.....	21
1.5	<i>Lactobacillus</i> e EGB.....	23
2	Objetivos .....	28
2.1	Gerais .....	28
2.2	Específicos .....	28
3	Métodos.....	29
3.1	Microrganismos e linhagens celulares .....	30
3.2	Caracterização de EGB.....	32
3.3	Curva de Crescimento .....	34
3.4	Ensaio de co-cultura.....	35
3.5	Biofilme .....	36
3.6	Ensaio de interação com células epiteliais .....	37
3.6.1	Competição.....	37
3.6.2	Exclusão .....	37
3.7	Quantificação bacteriana .....	38
3.7.1	Contagem de microrganismos viáveis .....	38
3.7.2	Contagem visual .....	39
3.8	Análise de proteínas do sobrenadante.....	40
3.8.1	Precipitação de proteínas .....	40
3.8.2	Preparo do gel de acrilamida .....	41
3.8.3	Corrida de eletroforese .....	41
3.8.4	Coloração dos géis.....	41
3.9	Análise .....	43
4	Resultados .....	44
4.1	Caracterização das cepas de Estreptococos do Grupo B (EGB).....	44
4.2	Curva de crescimento .....	49
4.3	Biofilme .....	50
4.4	Co-cultura.....	52
4.5	Ensaio de Competição .....	54
4.6	Ensaio de Exclusão.....	58

4.7	Proteínas do sobrenadante .....	63
5	Discussão .....	68
6	Conclusão.....	77
7	Referências.....	78

# 1 Introdução

## 1.1 Microbiota Vaginal

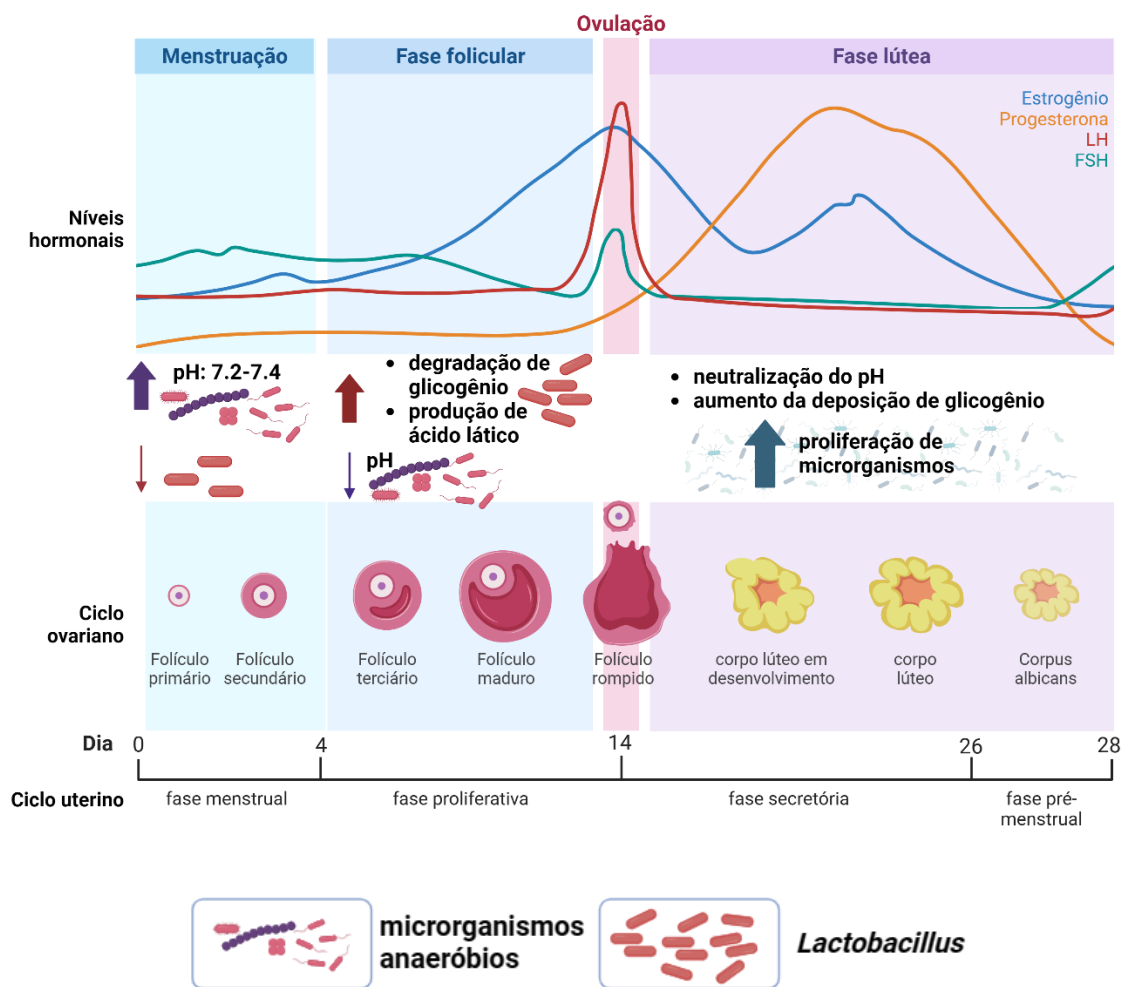
A microbiota vaginal humana é um ambiente complexo que contém mais de 200 espécies de bactérias (MENDLING, 2016). Apesar da sua diversidade, diferentemente da microbiota de outros sítios do corpo humano, o ambiente vaginal é geralmente dominado pelo gênero *Lactobacillus*. (FRANCE *et al.*, 2022; MENDLING, 2016; RAVEL *et al.*, 2011). Os principais *Lactobacillus* encontrados na microbiota vaginal são: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii* (FRANCE *et al.*, 2022; MENDLING, 2016; RAVEL *et al.*, 2011).

A mucosa vaginal é constituída por um epitélio pavimentoso estratificado, apoiado em um denso tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). É uma região que, quando estimulada por estrogênio, produz grandes quantidades de glicogênio, substrato utilizado por *Lactobacillus* para a produção de ácido lático, um importante regulador de pH da região vaginal (FRANCE *et al.*, 2022; GODHA *et al.*, 2018). O pH é um parâmetro significativo para a compreensão da homeostase do corpo humano (GODHA *et al.*, 2018). O valor de pH da região vaginal considerado normal está na faixa entre 3.8 e 4.5 (GODHA *et al.*, 2018; THE NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY, 2007). Esse pH ácido é mantido por microrganismos produtores de ácido lático, também conhecidos como LAB (*Lactic Acid Bacteria*) (TIWARI, 2022), cujo representante mais comum é o gênero *Lactobacillus*, mas que compreende outros gêneros, como *Bifidobacterium*. (TIWARI, 2022).

Muitas flutuações hormonais acontecem no corpo feminino, tanto no ciclo menstrual quanto em períodos como idade reprodutiva e menopausa (FRANCE *et al.*, 2022). O epitélio vaginal responde ao estímulo hormonal gerando proliferação de células, cujo ápice ocorre na ovulação, sendo assim ocorrem flutuações no nível de glicogênio livre durante o ciclo menstrual, o que pode afetar a abundância de LAB (CHOPRA *et al.*, 2022; FRANCE *et al.*, 2022).

Durante a menstruação, o fluido menstrual interage com a parede vaginal, o que leva à neutralização do pH ácido normalmente encontrado nesse ambiente, levando ao seu aumento para entre 7.2 e 7.4 (CHOPRA *et al.*, 2022). Estas alterações levam ao aumento da proliferação de microrganismos anaeróbios, e à diminuição da prevalência de *Lactobacillus* (CHOPRA *et*

al., 2022). Durante a fase folicular, a diminuição do fluxo menstrual resulta na diminuição do pH novamente, no aumento na degradação de glicogênio e na produção de ácido láctico pelas LAB (CHOPRA *et al.*, 2022). Já na fase lútea ocorre o espessamento tanto do endométrio quanto do epitélio vaginal, resultando no aumento da deposição de glicogênio nessa região, levando à possível neutralização de pH; há também a queda súbita de LH e FSH, resultando em um cenário propício para proliferação de diversos microrganismos (CHOPRA *et al.*, 2022). O ciclo menstrual e suas pertinentes características estão ilustrados na Figura 1.



**Figura 1: Fases do ciclo menstrual incluindo níveis hormonais, ciclos uterino e ovariano e flutuações no pH e microbiota vaginal (adaptado de Chopra et al, 2022).**

Além disso, a idade também pode impactar a composição da microbiota vaginal, sendo que meninas na pré-menarca e mulheres pós-menopausa têm menor probabilidade de possuir uma microbiota dominada pelo gênero *Lactobacillus*; o que pode estar associado ao menor

nível de estrogênio circulante, quando comparado ao de mulheres em idade reprodutiva (CHOPRA *et al.*, 2022; FRANCE *et al.*, 2022).

Existem muitas variações na composição da microbiota vaginal durante a idade reprodutiva (FRANCE *et al.*, 2022). No início da puberdade, os filos dominantes são Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria, e nos estágios mais tardios da puberdade há dominância de Firmicutes (CHOPRA *et al.*, 2022). Em um estudo brasileiro que avaliou a microbiota de mulheres em idade reprodutiva, sendo um grupo de gestantes e um grupo de não gestantes, foi observada a dominância de Firmicutes e predominância do gênero *Lactobacillus* (>80%) (SPARVOLI *et al.*, 2020).

Considerando tais variabilidades, para melhor compreender a comunidade microbiana vaginal, Ravel et al obtiveram *swabs* vaginais de 396 mulheres norte americanas, dos quais foram feitos a extração de DNA genômico, o sequenciamento de duas regiões variáveis do gene 16srRNA, e análise das sequências obtidas (RAVEL *et al.*, 2011). O grupo então classificou cada comunidade em cinco *Community State Types* (CSTs), sendo que quatro destas são dominadas por *Lactobacillus spp.* (RAVEL *et al.*, 2011). As CSTs I, II, III e V são dominadas por *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii*, respectivamente; já a CST IV é caracterizada pela baixa prevalência de lactobacilos e pela presença de microrganismos associados à vaginose bacteriana (RAVEL *et al.*, 2011). Atualmente, CSTs são comumente utilizadas para avaliar a microbiota vaginal humana, tanto da perspectiva homeostática quanto da epidemiológica.

A CST IV está associada à presença de bactérias anaeróbias e ao pH elevado (>4.5); alguns sintomas como corrimento anormal e odor podem ocorrer, porém a comunidade CST IV pode se apresentar de forma assintomática (FRANCE *et al.*, 2022; RAVEL *et al.*, 2011). Os principais microrganismos associados à CST IV são pertencentes aos gêneros *Prevotella*, *Dialister*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, *Eggerthella*, *Aerococcus*, *Fingoldia*, e *Mobiluncus* (CHOPRA *et al.*, 2022; RAVEL *et al.*, 2011). Apesar de não ser a espécie dominante, *L. iners* e *L. crispatus* foram detectados em mais da metade das comunidades pertencentes a CST IV (RAVEL *et al.*, 2011). A comunidade IV também está associada à presença de microrganismos patogênicos não anaeróbios, como *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae* (MENDLING, 2016).

Estudos da microbiota vaginal apontaram a necessidade de subdividir a CST IV em dois grupos: CST IV-A e CST IV-B. CST IV-A contém os gêneros *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Fingoldia* e *Streptococcus*. CST IV-B é caracterizada pela

presença de *Atopobium*, *Gardnerella*, *Sneathia*, *Mobiluncus*, *Megasphaera* e alguns microrganismos da ordem *Clostridiales* (KALIA; SINGH; KAUR, 2020).

A compreensão da composição da microbiota vaginal é essencial, contudo, ainda há muitas lacunas de conhecimento na compreensão de como esses microrganismos interagem entre si (CHOPRA *et al.*, 2022). Por isso são necessários estudos que demonstrem como microrganismos que dominam a microbiota vaginal (*Lactobacillus*) influenciam o metabolismo de microrganismos associados a doenças.

## 1.2 *L. crispatus*

Como mencionado anteriormente, a microbiota vaginal é predominantemente composta pelo gênero *Lactobacillus*, com exceção apenas da CST IV, que é caracterizada pela presença de bactérias anaeróbias (FRANCE *et al.*, 2022; MENDLING, 2016; RAVEL *et al.*, 2011). Contudo, há variações na prevalência de CSTs, de acordo com a região geográfica; na América do Norte, Europa e Índia, a CST I (dominada por *L. crispatus*) é a mais prevalente (SARAF *et al.*, 2021), já no México e no Brasil, há maior abundância da CST III (dominada por *L. iners*) (MARCONI *et al.*, 2020; SARAF *et al.*, 2021).

Uma microbiota dominada por *L. iners* está relacionada a uma maior vulnerabilidade à determinadas doenças, como vaginose bacteriana (CHEE *et al.*, 2020); além disso, *L. iners* produz apenas o isômero L-ácido lático, que é ineficaz na inibição de patógenos (CHEE *et al.*, 2020). Já o *L. crispatus* produz ambos os isômeros L- e D-ácido lático, e possui maior efeito protetor da microbiota vaginal contra patógenos (CHEE *et al.*, 2020; ZALAMBANI *et al.*, 2023). Por este motivo, esse microrganismo será o foco deste trabalho.

Além da importante função de manter o pH vaginal, o ácido lático também pode penetrar a membrana celular de patógenos, acidificando seu citosol, enfraquecer a parede bacteriana e induzir mudanças epigenéticas que podem afetar a expressão gênica da célula alvo (ZALAMBANI *et al.*, 2023). Em ensaios *in vitro*, cepas de *L. crispatus* foram as mais eficazes na inibição de infecção por *Chlamydia trachomatis*, seja por mecanismo de produção de ácido lático (ZALAMBANI *et al.*, 2023) ou pela ação de metabólitos secretados por esse microrganismo (NARDINI *et al.*, 2016).

Outro recurso presente nos *Lactobacillus* é a camada-S, subunidades proteicas repetidas que são encontradas na superfície do envelope celular de procariotos (SLEYTR *et al.*, 1993). A inibição da camada-S afeta significativamente a capacidade do *L. crispatus* de aderir em células HeLa, portanto ela está envolvida na capacidade desse microrganismo de aderir em células eucarióticas (CHEN *et al.*, 2007). Além disso, o *L. crispatus* demonstrou capacidade de inibir a adesão de *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium* a células HeLa em cultura, portanto é um microrganismo capaz de inibir a colonização de patógenos por meio de competição, e a camada-S é um componente chave dessa interação (CHEN *et al.*, 2007).



O genoma do *L. crispatus* possui seis genes codificadores de bacteriocinas (ARGENTINI *et al.*, 2022), que são peptídeos antimicrobianos secretados no ambiente, e promovem competição entre microrganismos (ARGENTINI *et al.*, 2022; TIWARI, 2022), sendo que normalmente inibem o crescimento de outras espécies próximas geneticamente (curto espectro), contudo algumas bacteriocinas com ação de amplo espectro já foram descritas (TIWARI, 2022).

A capacidade de inibição de microrganismos patogênicos varia entre os diferentes *loci* codificadores de bacteriocinas; contudo foram observadas atividades antimicrobianas de bacteriocinas presentes em *L. crispatus* contra *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae* (ARGENTINI *et al.*, 2022). O mecanismo pelo qual essa inibição ocorre não foi completamente elucidado, pode estar associado à acidificação do meio (ARGENTINI *et al.*, 2022), contudo mais estudos são necessários para melhor compreensão da ação das bacteriocinas.

Um último componente do *L. crispatus* envolvido na modulação da microbiota vaginal é o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Estudos epidemiológicos mostram uma associação entre mulheres colonizadas com *Lactobacillus* produtores de peróxido de hidrogênio e menor incidência de vaginose bacteriana, *Neisseria gonorrhoeae* e HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) (MIKO; BARAKONYI, 2023). O peróxido de hidrogênio está associado à inibição do crescimento de patógenos *in vitro*, e também tem efeito anti-inflamatório, participando da regulação do sistema imunológico do hospedeiro (ARGENTINI *et al.*, 2022; MIKO; BARAKONYI, 2023).

### 1.3 Estreptococos do Grupo B (EGB)

Estreptococos do Grupo B (EGB) ou *Streptococcus agalactiae* foi identificado na década de 1960 como causador de doença em recém-nascidos e permanece sendo a principal causa de infecção neonatal (ARMISTEAD; OLER; WALDORF, 2019; EDMOND *et al.*, 2012; EICKHOFF *et al.*, 1964; ROSEN *et al.*, 2017), sendo o agente responsável por um terço dos casos de sepse neonatal (STEPHENS; CHARNOCK-JONES; SMITH, 2023). A estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) é que 150.000 mortes e natimortos são causados por EGB (SEALE *et al.*, 2017).

No Brasil, *S. agalactiae* coloniza de 4 a 28,4% das mulheres brasileiras, dependendo da região geográfica (NASCIMENTO; TADDEI, 2019). O principal fator de risco para infecção neonatal é a colonização materna, pois EGB é um membro comensal da microbiota vaginal (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010; FILKINS *et al.*, 2020; NAN *et al.*, 2015). EGB é uma bactéria GRAM positiva cujo potencial patogênico depende de fatores de virulência encontrados no seu genoma; alguns desses fatores que promovem colonização no trato vaginal podem causar danos mais graves ao neonato (ARMISTEAD; OLER; WALDORF, 2019).

Um desses fatores de virulência é o chamado fator CAMP, que se liga à membrana celular de eritrócitos, causando hemólise (CHRISTINE; ATKINS; MUNCH-PETERSEN, 1944), esse efeito é amplificado pela esfingomielinase, secretada por *S. aureus* (CHRISTINE; ATKINS; MUNCH-PETERSEN, 1944; HENSLER *et al.*, 2008). Um importante fator envolvido na ascensão de EGB do ambiente vaginal para o útero é a hialuronidase (PATRAS; NIZET, 2018), responsável pela degradação de ácido hialurônico, um importante componente da matriz extracelular (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011). A ancoragem à matriz extracelular é facilitada por ilhas de pili, que promovem a adesão aos seus componentes, como colágeno, fibrinogênio e fibronectina (PATRAS; NIZET, 2018). Outro fator de virulência envolvido na invasão de EGB é a  $\beta$ -hemolisina/citolisina, que apresenta toxicidade para diversas células imunológicas (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011; PATRAS; NIZET, 2018).

Por ser um patógeno oportunista, EGB pode permanecer na microbiota vaginal como um microrganismo comensal, contudo ele possui sistemas de transdução de sinais, que são rigorosamente regulados, e respondem a estímulos ambientais, provocando alterações na expressão gênica de fatores específicos (como adesinas, pili, enzimas etc.) que levarão a sua

ascensão de microrganismo comensal para patógeno causador de infecções (ARMISTEAD; OLER; WALDORF, 2019).

As principais doenças causadas por EGB são encontradas em mulheres e neonatos. Em mulheres, gestantes ou não, EGB é responsável por infecções do trato urinário, podendo ser recorrente (BOTELHO *et al.*, 2018; RAABE; SHANE, 2019). Em bebês, EGB é responsável pela sepse neonatal, que tem duas manifestações: precoce e tardia. A sepse neonatal precoce é a manifestação dos sintomas durante a primeira semana de vida, já a sepse neonatal tardia ocorre entre 8 dias e três meses de vida (ARMISTEAD; OLER; WALDORF, 2019; RAABE; SHANE, 2019; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018).

Nos casos de sepse neonatal precoce a pneumonia é um dos principais sintomas (CHOI *et al.*, 2022). O “padrão ouro” para diagnóstico é o isolamento de EGB de sangue, fluido cefalorraquidiano ou outros fluidos estéreis através de cultura, porém atualmente há o aumento do uso de PCR quantitativo no contexto clínico (STEPHENS; CHARNOCK-JONES; SMITH, 2023). Um diagnóstico laboratorial positivo para EGB resulta de colônias com morfologia característica em ágar sangue e teste CAMP positivo; adicionalmente testes bioquímicos e aglutinação em látex podem ser feitos (FILKINS *et al.*, 2020). Devido ao alto risco do diagnóstico de sepse neonatal precoce, o tratamento pode ser iniciado antes da obtenção do resultado da cultura, caso haja um quadro clínico suspeito ou sejam identificados fatores de risco (STEPHENS; CHARNOCK-JONES; SMITH, 2023). Os sintomas são a forma primária de diagnóstico de sepse neonatal tardia (CHOI *et al.*, 2022), sendo meningite o principal sintoma. Além disso, 20% dos pacientes que sobreviveram após o diagnóstico de sepse neonatal tardia, apresentam severas sequelas no seu desenvolvimento neurológico (STEPHENS; CHARNOCK-JONES; SMITH, 2023).

As diretrizes publicadas pelo *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* são direcionadas para o tratamento de mulheres gestantes colonizadas por EGB devido ao seu principal fator de risco ser a colonização da mãe (ARMISTEAD; OLER; WALDORF, 2019). A implementação das diretrizes diminuiu significativamente a incidência de sepse neonatal nos últimos 27 anos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010). Em 2020 o protocolo foi atualizado pela *American Society for Microbiology (ASM)*, entre outras mudanças, o período da coleta foi alterado de 35 a 37 semanas para 36 0/7 a 37 6/7 semanas, por ser o período que melhor indicará colonização por EGB durante o parto. Além disso foi

determinado que o melhor método de coleta é utilizando swab único primeiro no canal vaginal depois no canal retal (FILKINS *et al.*, 2020).

No caso de diagnóstico positivo, é feita a profilaxia intraparto com Penicilina; caso a paciente seja alérgica deve ser feito o teste de susceptibilidade antimicrobiana, sendo que clindamicina e eritromicina são os antimicrobianos alternativos utilizados nesse caso (FILKINS *et al.*, 2020). O teste de sensibilidade recomendado pela ASM é necessário pois o uso frequente de antibióticos gerou um aumento na resistência a clindamicina e eritromicina (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013), principalmente no Brasil (NASCIMENTO *et al.*, 2019). A presença de EGB na microbiota vaginal, além de levar ao risco de infecção neonatal, altera a sua composição e homeostase (ROSEN *et al.*, 2017; VRBANAC *et al.*, 2018).

## 1.4 EGB e a microbiota vaginal

A composição da microbiota vaginal é influenciada por fatores relacionados ao hospedeiro, como níveis hormonais, idade e gestação (CHOPRA *et al.*, 2022; FRANCE *et al.*, 2022; MENDLING, 2016; SPARVOLI *et al.*, 2020), e por fatores externos, como a presença de microrganismos patogênicos (MENDLING, 2016; RAZZAK; AL-CHARRAKH; AL-GREITTY, 2011). Porém o grau de influência que EGB exerce sobre a composição da microbiota ainda é um assunto controverso.

Apesar da importância clínica do EGB (ARMISTEAD; OLER; WALDORF, 2019), uma revisão sistemática de estudos publicados avaliando a microbiota vaginal, mostrou que menos de 30% reportam o *status* da colonização por EGB, sendo por métodos de cultura ou métodos moleculares, então é incerto se a presença desse microrganismo afeta os resultados destes estudos ou não (LIM *et al.*, 2021).

Além disso, maioria dos estudos sobre microbiota utilizam métodos de sequenciamento de regiões específicas do gene codificador do RNA 16S, o que pode tanto limitar a identificação de algumas espécies de microrganismos, quanto aumentar a variabilidade de resultados em estudos diferentes (LIM *et al.*, 2021). Ademais, algumas publicações estão limitadas a identificação de gêneros e não atingem o nível de espécies, o que seria necessário para delinear o perfil da microbiota vaginal e identificar a presença de *S. agalactiae* (LIM *et al.*, 2021).

Uma publicação de Rosen et al faz parte da minoria, pois avaliou 428 amostras de microbiota vaginal, e além do sequenciamento das regiões V3 e V4 do gene 16S, fez também a pesquisa de EGB durante o pré-natal. Cada amostra foi classificada dentro de uma CST de acordo com a sua composição, e não foi encontrada uma correlação entre a presença de EGB e as CSTs. Contudo, ao observar os subgrupos da CST IV, foi encontrada maior proporção de amostras positivas para EGB na comunidade CST IV-A quando comparada à CST IV-B. Apesar dos resultados indicarem uma correspondência entre a presença de EGB e a abundância de algumas espécies, como *Prevotella bivia*, o grupo não conseguiu relacionar EGB com nenhuma espécie de *Lactobacillus spp.* (ROSEN *et al.*, 2017).

Além disso, foram encontradas diferenças significativas na microbiota vaginal de um grupo de 22 mulheres colonizadas por EGB, comparando-as a um grupo de 44 mulheres não colonizadas (MU *et al.*, 2019). A abundância relativa do gênero *Lactobacillus* foi

significativamente maior no grupo de mulheres não colonizadas por EGB; já os gêneros *Prevotella*, *Megasphaera* e *Streptococcus* foram significativamente mais abundantes no grupo de mulheres colonizadas por EGB (MU *et al.*, 2019).

Já Roesch *et al* avaliou a microbiota vaginal de mulheres que receberam a profilaxia intraparto utilizando Penicilina. Foram coletadas amostras de mulheres com *status* de EGB positivo e negativo, que receberam ou não a antibioticoterapia. No grupo que recebeu a profilaxia, a  $\alpha$ -diversidade e a riqueza foram maiores do que nos grupos que não receberam antibióticos. A explicação dos autores é que a microbiota saudável, composta em sua maioria por lactobacilos, de diversas espécies, foi afetada após o tratamento, abrindo espaço para crescimento de outras espécies de bactérias, o que aumentou a variabilidade dentro dessas comunidades. Neste caso, a influência de EGB na microbiota não foi observada de forma direta, mas sim indiretamente através do tratamento utilizando Penicilina (ROESCH *et al.*, 2017).

Para uma observação direta, um estudo coletou 1860 swabs vaginais de mulheres gestantes no terceiro trimestre (STARC *et al.*, 2022). Foram utilizados diversos meios de cultura e identificação por espectrometria de massa (MALDI-tof) para isolar diferentes espécies de *Lactobacillus* e alguns microrganismos patogênicos (STARC *et al.*, 2022). Resultados demonstraram que *L. crispatus* foi isolado com maior frequência em mulheres não colonizadas por EGB. Contudo outros patógenos, como *Gardnerella vaginalis*, não tiveram correlação com o *status* de colonização por EGB. Os autores propõem que a presença de *L. crispatus* possa ter efeito protetivo, prevenindo o estabelecimento da colonização por EGB (STARC *et al.*, 2022).

Sendo assim, é possível concluir que ocorrem mudanças significativas na microbiota vaginal quando há presença de EGB, mais estudos *in vitro* são necessários para compreender os mecanismos envolvidos em tais mudanças.

## 1.5 *Lactobacillus* e EGB

A despeito das incertezas sobre a interação destes dois microrganismos *in vivo*, muitos experimentos tentam demonstrar a influência dos lactobacilos em EGB *in vitro*, tais resultados também são discordantes. Em uma pequena revisão sobre o assunto, foram selecionados onze artigos publicados nos últimos anos, com resultados controversos, a Tabela 1 contém um resumo dessas propostas.

**Tabela 1: Amostragem de artigos publicados sobre interação entre *Lactobacillus* e EGB**

<b>Tipo de ensaio</b>	<b>Microrganismos</b>	<b>Interação</b>	<b>Referência</b>
Adesão em células epiteliais vaginais primárias ( <i>in vitro</i> )	<i>Lactobacillus fermentum</i> ; <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Ambos reduziram a adesão de EGB às células epiteliais	(ORTIZ <i>et al.</i> , 2014)
Administração de probiótico oral durante a gestação ( <i>in vivo</i> )	Florajen3® ( <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Bifidobacterium lactis</i> ; <i>Bifidobacterium longum</i> )	Não houve alteração no número de mulheres colonizadas entre os grupos; contagem de colônias entre o grupo probiótico foi menor	(HANSON <i>et al.</i> , 2014)
Influência do microrganismo e do sobrenadante no crescimento de patógenos ( <i>in vitro</i> )	<i>Lactobacillus casei</i>	Somente o sobrenadante inibe o crescimento; contudo resultado depende do ensaio	(JURADO; GÚZMAN; JARRÍN, 2015)
Administração de probiótico oral durante a gestação ( <i>in vivo</i> )	<i>L. rhamnosus</i> ; <i>Lactobacillus reuteri</i>	Houve redução na positividade de EGB no grupo que fez uso de probióticos	(HO <i>et al.</i> , 2016)
Administração de probiótico oral durante a gestação ( <i>in vivo</i> )	<i>L. rhamnosus</i> ; <i>L. reuteri</i> ; <i>L. fermentum</i>	Não houve diferença na prevalência de colonização por EGB entre os grupos	(OLSEN <i>et al.</i> , 2018)

Efeito de <i>Lactobacillus</i> sobrenadante na viabilidade de EGB	de e na	<i>Bacillus clausii</i> , <i>Bifidobacterium adolescentes</i> , <i>B. bifidus</i> , <i>B. infantis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. casei Shirota</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. paracaseae</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>S. thermophilus</i>	Foram observados halos de inibição para algumas cepas de <i>Lactobacillus</i>	(BONIN; PENTEAD O; QUEIROZ, 2019)
Administração de probiótico oral durante a gestação ( <i>in vivo</i> )	de	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Houve diminuição no número de mulheres colonizadas por EGB após administração de probiótico	(MARTÍN <i>et al.</i> , 2019)
Viabilidade de EGB na presença de lactobacilos e sobrenadante ( <i>in vitro</i> )	de e	<i>Lactobacillus crispatus</i> ; <i>Lactobacillus gasseri</i> ; <i>Lactobacillus vaginalis</i>	Algumas cepas de <i>Lactobacillus</i> inibiram o crescimento de EGB	(MARZIALI <i>et al.</i> , 2019)
Administração de probiótico oral durante a gestação ( <i>in vivo</i> )	de	<i>L. rhamnosus</i> ; <i>L. reuteri</i>	Colonização por EGB não variou significativamente entre os grupos	(SHARPE <i>et al.</i> , 2019)
Efeito de lactobacilos no crescimento e formação de biofilme de EGB em células endometriais ( <i>in vitro</i> )		<i>L. crispatus</i> ; <i>L. gasseri</i> ; <i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i> aumentou a adesão de EGB às células; somente o sobrenadante inibiu o crescimento, formação de biofilme e invasão celular	(SHIRODA <i>et al.</i> , 2020)
Adesão em células epiteliais vaginais primárias e vk2/E6E7 ( <i>in vitro</i> )		<i>Lactobacillus crispatus</i> ; <i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus</i> inibiram a adesão de EGB a células em todos os ensaios	(HE <i>et al.</i> , 2020)



Efeito de lactobacilos na adesão de EGB a células HeLa e na diminuição do seu descolamento ( <i>in vitro</i> )	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i> diminui deformações celulares causadas por EGB	(CAJULAO; CHEN, 2021)
Administração de probiótico oral durante a gestação ( <i>in vivo</i> )	Florajen3 <sup>®</sup> ( <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Bifidobacterium lactis</i> ; <i>Bifidobacterium longum</i> )	Não houve alteração na colonização de EGB entre os grupos	(HANSON <i>et al.</i> , 2023)

Desses artigos, nove demonstraram alguma forma de interação entre os Estreptococos do Grupo B e lactobacilos, porém quatro não tiveram resultados significativos. Alguns dos trabalhos fizeram intervenções em mulheres gestantes, administrando probióticos oralmente durante a gestação, dos seis artigos encontrados, apenas dois obtiveram resultados positivos (HO *et al.*, 2016; MARTÍN *et al.*, 2019).

Martín *et al* avaliou cepas de *L. salivarius* para determinar a produção de compostos antimicrobianos e o potencial de inibição do crescimento de EGB *in vitro*, algumas dessas tiveram resultados positivos, uma foi selecionada para administração como probiótico. O grupo da intervenção possuía 25 mulheres, para as quais foi administrado o probiótico. O grupo controle foi dividido em dois, sendo que 14 mulheres foram diagnosticadas com EGB positivo, controle 18 possuíam cultura de EGB negativa. Sendo assim o *n* dessa pesquisa é pequeno e mais estudos serão necessários para determinar se os resultados são reproduzíveis (MARTÍN *et al.*, 2019).

O artigo de Ho *et al* relatou um efeito significativo da administração de placebo, mas é importante considerar que o grupo controle possuía 50 voluntárias e somente 9 apresentaram exame de EGB negativo; o grupo que recebeu probióticos possuía 49 voluntárias e 21 apresentaram exame de EGB negativo após o tratamento. Apesar de resultados significativos, o número de mulheres nos grupos ainda é pequeno, e a efetividade desse probiótico é menor que 50% (HO *et al.*, 2016).

Todos os artigos que fizeram intervenções utilizaram probióticos orais, o que não reflete a verdadeira interação entre esses microrganismos e os microrganismos da microbiota,

patógenos ou não. Desta forma, foram pesquisados também, artigos com experimentos *in vitro*, na tentativa de observar diretamente o efeito de lactobacilos em Estreptococos do Grupo B. E todos observaram influências significativas de lactobacilos probióticos na viabilidade e adesão de EGB a células epiteliais (BONIN; PENTEADO; QUEIROZ, 2019; CAJULAO; CHEN, 2021; HE *et al.*, 2020; JURADO; GÚZMAN; JARRÍN, 2015; MARZIALI *et al.*, 2019; ORTIZ *et al.*, 2014; SHIRODA *et al.*, 2020).

Marziali *et al* observou uma inibição significativa, *in vitro*, de EGB na presença de diferentes cepas de *L. crispatus* e *L. gasseri*, contudo a atividade anti-EGB dessas cepas depende do pH do meio (MARZIALI *et al.*, 2019). E Bonin *et al* avaliou a atividade *in vitro* de diversos probióticos e não observou eficiência de *L. crispatus* contra EGB, mas sim da espécie *L. casei Shirota*, disponível comercialmente (BONIN; PENTEADO; QUEIROZ, 2019). A eficácia de *L. crispatus* e *L. gasseri* foi observada *in vitro* em cultura de células vk2/e6e7 e célula epiteliais obtidas de mulheres saudáveis (HE *et al.*, 2020).

Foram encontrados três tipos de ensaios de adesão bacteriana a células vaginais: exclusão, competição e deslocamento. A principal diferença entre eles é a ordem em que os microrganismos são colocados na cultura. A eficiência dos lactobacilos na prevenção da adesão de EGB a células epiteliais depende também do tipo de experimento (ORTIZ *et al.*, 2014).

A interação entre EGB e disbiose, com conseqüente diminuição da prevalência de *Lactobacillus* ainda não foi demonstrada (ROSEN *et al.*, 2017). Porém, há evidências da eficiência de lactobacilos probióticos no combate a infecções vaginais, especialmente vaginose bacteriana, na literatura (FALAGAS; BETSI; ATHANASIOU, 2007; VITALI; ABRUZZO; MASTROMARINO, 2017; YA; REIFER; MILLER, 2010).

Utilizar os lactobacilos probióticos como auxílio no tratamento de EGB poderia diminuir a frequência do uso de antibióticos. Nos Estados Unidos, a resistência as antibióticos alternativos, como Clindamicina e Eritromicina, tem aumentado constantemente desde o início dos anos 2000, sendo que a taxa de resistência a Eritromicina atingiu 50% e à Clindamicina a 30% em 2010 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). Um aumento significativo da resistência também tem sido observado no Brasil (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Apesar de muitos artigos publicados sobre o assunto, a relação entre probióticos vaginais, como *Lactobacillus spp.*, e EGB apresenta muita variabilidade de resultados.

Portanto, novos estudos precisam determinar a verdadeira influência dos principais *Lactobacillus spp.* vaginais atualmente usados como probióticos na viabilidade de diversos sorotipos de EGB e na sua capacidade de aderir ao epitélio vaginal.

## 2 Objetivos

### 2.1 Gerais

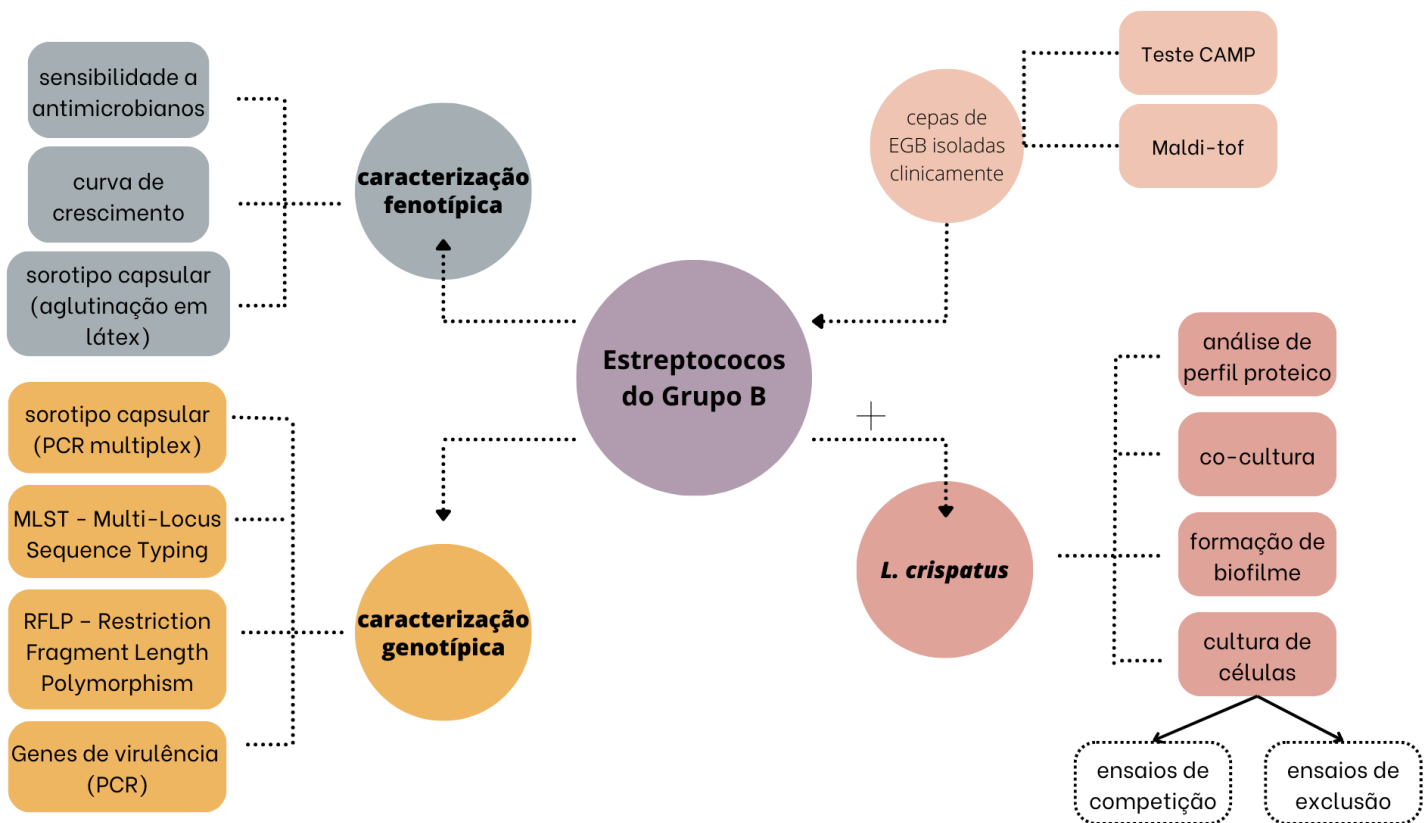
Avaliar a interação entre cepas de lactobacilos probióticos disponíveis comercialmente e EGB.

### 2.2 Específicos

- a. Caracterizar as cepas de EGB fenotípica e geneticamente
- b. Determinar quali e quantitativamente a influência de lactobacilos probióticos na viabilidade de EGB *in vitro*;
- c. Determinar quali e quantitativamente a influência de lactobacilos probióticos na adesão de EGB dos sorotipos Ia, II, III e V a células epiteliais *in vitro*;
- d. Avaliar a influência de lactobacilos probióticos na expressão de proteínas de EGB dos sorotipos Ia, II, III e V aderidos a cultura de células Hela;

### 3 Métodos

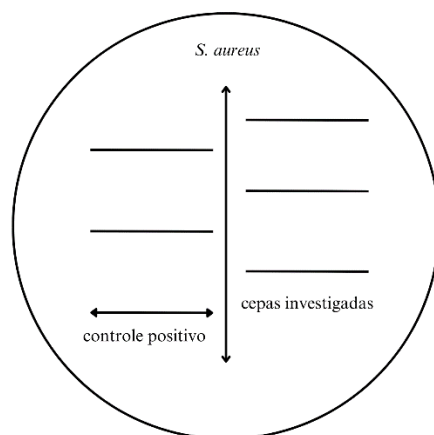
Todos os ensaios foram realizados conforme descrito anteriormente, com auxílio de diferentes departamentos da Universidade de São Paulo, do Instituto Butantã e da Universidade Federal do Rio de Janeiro, conforme ilustrado na **Figura 2.**



**Figura 2:** Delineamento experimental do projeto, ilustrando os diferentes processos e ensaios.

### 3.1 Microrganismos e linhagens celulares

*Streptococcus agalactiae* (EGB): as cepas foram isoladas de mulheres gestantes. Foram utilizadas cepas pertencentes aos sorotipos: Ia (cepa 1), II (cepa 4), III (cepas 2 e 5) e V (cepas 3 e 6). Estas cepas foram caracterizadas anteriormente (NASCIMENTO; TADDEI, 2019). As cepas estavam armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e foram descongeladas e repicadas para cada ensaio. Para confirmar se as cepas estavam devidamente conservadas e descartar a possibilidade de contaminação, foi feito o teste CAMP (CHRISTINE; ATKINS; MUNCH-PETERSEN, 1944) e Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight mass spectrometry (MALDI-tof) (LAY, 2001) de todas as cepas. O teste CAMP consiste em semear as cepas em ágar sangue *overnight* a  $37^{\circ}\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$ . No dia seguinte, a cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* foi semeada em uma linha central em placa de ágar sangue, foi selecionada uma colônia de cada cepa a ser investigada, que foram semeadas de forma perpendicular conforme ilustração (Figura 3); placa de ágar sangue foi incubada em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$ , leitura foi feita após incubação *overnight* (CHRISTINE; ATKINS; MUNCH-PETERSEN, 1944).



**Figura 3: Semeadura de cepas utilizadas na realização do teste CAMP**

Já a técnica de *MALDI-tof* consiste em selecionar colônias das cepas a serem investigadas, que foram previamente semeadas em ágar sangue, e aplicá-las em placa de aço inoxidável. A placa foi mantida em temperatura ambiente para permitir a secagem das colônias, em seguida foi aplicado  $1\mu\text{l}$  de matriz, descrita previamente (TO *et al.*, 2019). Após incidência de lasers (autoflex® maX, Bruker Daltonique, França), o perfil espectrofotômetro foi analisado utilizando software MALDI Biotyper 1.1(Bruker Daltonique, França), que gera resultados de

identificação bacteriana. Cepas foram confirmadas como *Streptococcus agalactie* caso seu *score* seja maior que 2,00 (LARTIGUE *et al.*, 2009; LAY, 2001; TO *et al.*, 2019).

*Lactobacillus spp.*: foram obtidas cepas probióticas de *L. crispatus* (LCr86) (Jiangsu Wecare Biotechnology Co, Jiangsu, China).

HeLa: Células foram gentilmente cedidas pela Professora Dra. Ana Carolina Moreno (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo). Células HeLa foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil), a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> (MANJU *et al.*, 2018).

### 3.2 Caracterização de EGB

Sorotipo capsular: todos os sorotipos capsulares foram determinados utilizando aglutinação em látex (Pastorex™, Bio-Rad, California, EUA), seguindo instruções do fabricante. Foi realizado PCR Multiplex com primers descritos na Tabela 2, seguindo os protocolos previamente descritos (IMPERI *et al.*, 2010; NASCIMENTO; TADDEI, 2019).

**Tabela 2: Nome e sequência dos primers que foram utilizados na reação de Multiplex PCR para a sorotipagem capsular:**

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

Fatores de virulência: os genes de virulência pesquisados por PCR foram: hialuronidase, β-citolisina/hemolisina, ilhas de pili 1, 2a e 2b (Tabela 3), seguindo protocolo de amplificação descrito na literatura (NASCIMENTO; TADDEI, 2019; OTAGUIRI *et al.*, 2013)



**Tabela 3: Sequência de nucleotídeos de cada *primer* e tamanho amplicon esperado:**

<i>Primer</i>	Sequência (5'–3')	Tamanho do amplicon (bp)
<i>hylB</i>	F: TGTCTCCGAGGTGACACTTGA R: TTGTGTTGTGACGGTGTGGATG	124
<i>cylE</i>	F: TCGGAACAAGTAAAGAGGGTTCGG R: GGGTTTCCACAGTTGCTTGAATGT	130
<i>PI-1</i>	F: AACCACTAGCAGGCGTTGTCTTTG R: TGAGCCCGGAAATTCTGATATGCC	147
<i>PI-2a</i>	F: GCCGTTAGATGTTGTCTTCGTA R: TTTACTGCGGTCCCAAGAGCTTC	117
<i>PI-2b</i>	F: AAGTCTTGACCAAGGATACGACGC R: ATCGTGTTACTTGCCCTGCGTA	152

Resistência a antimicrobianos: a sensibilidade aos seguintes antimicrobianos: Penicilina, Cefepima, Vancomicina, Eritromicina e Clindamicina, foi testada utilizando o método de disco-difusão conforme descrito previamente (BRCAST, 2016; NASCIMENTO; TADDEI, 2019).

*Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*: foi feito de acordo com protocolo disponível (BEAURUELLE *et al.*, 2018). O locus *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR1)* foi amplificado utilizando a técnica de PCR (primer Forward: 5'-GAAGACTCTATGATTTACCGC-3'; primer Reverse: 5'-CAGCAATCACTAAAAGAACCAAC-3'), resultando em fragmentos de diversos tamanhos. O produto da reação foi então digerido pela enzima de restrição *DdeI*, e os diversos fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. A imagem resultante foi analisada utilizando software *Bionumerics* (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

*Multi-Locus Sequence Typing (MLST)*: sete genes foram amplificados utilizando PCR, primers estão descritos na Tabela 4, a seguir. Cada fragmento foi sequenciado e analisado conforme protocolo previamente descrito (JONES *et al.*, 2003). Os arquivos FASTA resultantes dos sequenciamentos foi visualizado e organizado utilizando o software *Geneious Prime 2023.0.4* (*geneious by Dotmatics*, Nova Zelândia). A sequência de cada fragmento foi submetida ao banco de dados PubMLST, que gera um número de alelo para cada sequência, a combinação do número do alelo de cada um dos sete *loci* resulta em um *Sequence Type* e *Clonal Complex* (JOLLEY; BRAY; MAIDEN, 2018).

**Tabela 4: Primers utilizados para a reação de MLST com seus respectivos *locus* e funções:**

<i>Locus</i>	Função	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>adhP</i>	Álcool desidrogenase	GTTGGTCATGGTGAAGCACT	ACTGTACCTCCAGCACGAAC	672
<i>pheS</i>	Fenilalanil tRNA sintetase	GATTAAGGAGTAGTGGCACG	TTGAGATCGCCCATTGAAAT	723
<i>atr</i>	Transporte de amino ácidos	CGATTCTCTCAGCTTTGTTA	AAGAAATCTCTTGTGCGGAT	627
<i>glnA</i>	Glutamina sintetase	CCGGCTACAGATGAACAATT	CTGATAATTGCCATTCCACG	589
<i>sdhA</i>	Serina desidratase	AGAGCAAGCTAATAGCCAAC	ATATCAGCAGCAACAAGTGC	646
<i>glcK</i>	Glicoquinase	CTCGGAGGAACGACCATTAA	CTTGTAACAGTATCACCGTT	607
<i>tkk</i>	Transquetolase	CCAGGCTTTGATTTAGTTGA	AATAGCTTGTTGGCTTGAAA	859

### 3.3 Curva de Crescimento

Para avaliar a progressão do crescimento dos EGB utilizados, foi construída uma curva de crescimento para cada sorotipo. Microrganismos armazenados em freezer a -20°C foram semeados em Ágar sangue *overnight*, e semeados em meio DMEM, com 10% de soro fetal bovino, referido aqui como DMEM+sfb, durante três horas, para obtenção de microrganismos em fase Log. Após esse período, a concentração das culturas foi ajustada para  $1 \times 10^8$  UFC/ml utilizando espectrofotômetro, considerando a absorvância de 0,1 na faixa da densidade óptica (OD) de 600nm. Em comprimento de onda de 600nm (OD<sub>600</sub>) e absorvância de 1, a concentração de EGB (KOTHARY *et al.*, 2017) e de Lactobacilos (DIMOV *et al.*, 2007) é de  $1 \times 10^9$  UFC/ml. Para obter a concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/ml desses microrganismos foi utilizada absorvância de 0,1. A curva foi construída a partir da cultura a  $1 \times 10^8$  UFC/ml, sendo que a absorvância foi medida a cada 60min durante 8h. Foram feitas quintuplicatas de todas as curvas.

### 3.4 Ensaios de co-cultura

Os microrganismos, *Lactobacillus* e EGB foram semeados overnight em caldo DMEM+sfb. A fim de obter bactérias em fase log, as culturas overnight foram semeadas novamente em seus respectivos meios de cultura durante 3 horas (PAOLETTI; ROSS; JOHNSON, 1996). A concentração inicial de  $1 \times 10^8$  UFC/ml, de ambos os microrganismos, foi obtida utilizando espectrofotômetro, conforme descrito anteriormente.

Após a obtenção da concentração adequada, foram preparadas diluições de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^2$  UFC/ml de ambos os microrganismos, utilizando solução salina. Os ensaios de interação foram feitos em placa de 12-wells. Cada solução com a concentração adequada foi semeada em placa contendo meio de cultura DMEM+sfb. Cada ensaio foi feito combinando EGB e uma cepa probiótica de lactobacilo. As cepas de EGB foram semeadas em ágar sangue e incubadas overnight; para obtenção de microrganismos em fase log as cepas de EGB e as cápsulas de lactobacilos vaginais foram incubadas em 5ml de meio líquido (DMEM+sfb), durante 3h em estufa de CO<sub>2</sub>.

O conteúdo de cada poço é de 800µl de meio líquido (DMEM+sfb), 100µl da solução de cada microrganismo nas concentrações descritas (ORTIZ *et al.*, 2014), placas foram incubadas durante 1h, e quantificação foi feita utilizando método descrito a seguir.

Os resultados dos primeiros ensaios de competição mostraram que o crescimento bacteriano de EGB na concentração inicial de  $10^8$  UFC/ml é muito alto, por isso baseado no que foi observado nas placas, a concentração ideal escolhida foi de  $10^3$  UFC/ml, assim os ensaios foram feitos com a concentração constante de EGB como visto na Tabela 5, essa combinação de concentrações foi utilizada em todos os ensaios seguintes. Foram utilizados quatro sorotipos de EGB (Ia, II, III e V) e uma cepa de *L. crispatus* (LC), sendo no total seis combinações para cada ensaio. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

**Tabela 5: Concentração inicial constante de EGB e concentração variável de Lactobacilos.**

<b>EGB:</b>	<b><math>1,0 \times 10^3</math></b>	<b><math>1,0 \times 10^3</math></b>	<b><math>1,0 \times 10^3</math></b>	<b><math>1,0 \times 10^3</math></b>
<b>Lactobacilo:</b>	<b><math>1,0 \times 10^6</math></b>	<b><math>1,0 \times 10^5</math></b>	<b><math>1,0 \times 10^4</math></b>	<b><math>1,0 \times 10^3</math></b>

<b>EGB:</b>	<b>1,0x10<sup>3</sup></b>	<b>controle</b>	-	-
<b>Lactobacilo:</b>	-	<b>negativo</b>		

### 3.5 Biofilme

A produção de biofilme das cepas de EGB e de lactobacilos foi avaliada em ensaio. Cepas de EGB foram semeadas em ágar sangue *overnight*. Essas cepas e o lactobacilo liofilizado foram repicados em meio Todd-Hewitt Broth (THB) com adição de 1% de glicose. A concentração inicial dos microrganismos foi ajustada utilizando a escala de McFarland de 0,5, e todas as culturas foram transferidas para uma placa de 96-well (conforme Tabela 6), que foi incubada *overnight*. Foi analisada a capacidade de formação de biofilme de cada cepa isoladamente e das cepas de EGB na presença de LC em diferentes concentrações (50% e 90%) conforme tabela. O biofilme foi corado utilizando cristal violeta preparado para esse ensaio. Resultados foram aferidos utilizando espectrofotômetro, com comprimento de onda de OD<sub>570</sub> (CRISTINA *et al.*, 2019).

**Tabela 6: Distribuição das cepas de EGB e *L. crispatus* em diferentes concentrações para ensaio de formação de biofilme**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	C1	C1 + LC 50%	C1 + LC 90%	C4	C4 + LC 50%	C4 + LC 90%	C2	C2 + LC 50%	C2 + LC 90%	C5	C5+LC 50%	C5+LC 90%
<b>B</b>	C1	C1 + LC 50%	C1 + LC 90%	C4	C4 + LC 50%	C4 + LC 90%	C2	C2 + LC 50%	C2 + LC 90%	C5	C5+LC 50%	C5+LC 90%
<b>C</b>	C1	C1 + LC 50%	C1 + LC 90%	C4	C4 + LC 50%	C4 + LC 90%	C2	C2 + LC 50%	C2 + LC 90%	C5	C5+LC 50%	C5+LC 90%
<b>D</b>	C1	C1 + LC 50%	C1 + LC 90%	C4	C4 + LC 50%	C4 + LC 90%	C2	C2 + LC 50%	C2 + LC 90%	C5	C5+LC 50%	C5+LC 90%
<b>E</b>	C3	C3+LC 50%	C3+LC 90%	C6	C6+LC 50%	C6+LC 90%	Sag10*	Sag19*			Lc	C-
<b>F</b>	C3	C3+LC 50%	C3+LC 90%	C6	C6+LC 50%	C6+LC 90%	Sag10	Sag19			Lc	C-
<b>G</b>	C3	C3+LC 50%	C3+LC 90%	C6	C6+LC 50%	C6+LC 90%	Sag10	Sag19			Lc	C-
<b>H</b>	C3	C3+LC 50%	C3+LC 90%	C6	C6+LC 50%	C6+LC 90%	Sag10	Sag19			Lc	C-

\* Cepas controle, forte e fraca formadora de biofilme, respectivamente.

### 3.6 Ensaios de interação com células epiteliais

Células HeLa foram cultivadas em placa de 12-wells; foram aplicadas  $5,0 \times 10^4$  células por poço, e a placa foi incubada overnight. Para obter confluência ideal de aproximadamente 80%, células foram coradas com Trypan e contadas em câmara de Neubauer (Louis & Siegel, 2011).

#### 3.6.1 Competição

Para os ensaios de competição foram adicionados simultaneamente culturas de lactobacilos e EGB na concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC/ml em proporção 1:1. No primeiro ensaio a cultura celular foi incubada com microrganismos a 37°C durante 1h, porém o tempo foi insuficiente para infecção. Após resultados da curva de crescimento, para os ensaios seguintes o tempo de incubação foi aumentado para 3h. Ao final da incubação culturas foram lavadas com PBS duas vezes a fim de remover células não aderidas. Os resultados foram analisados conforme descrito no item 3.7.

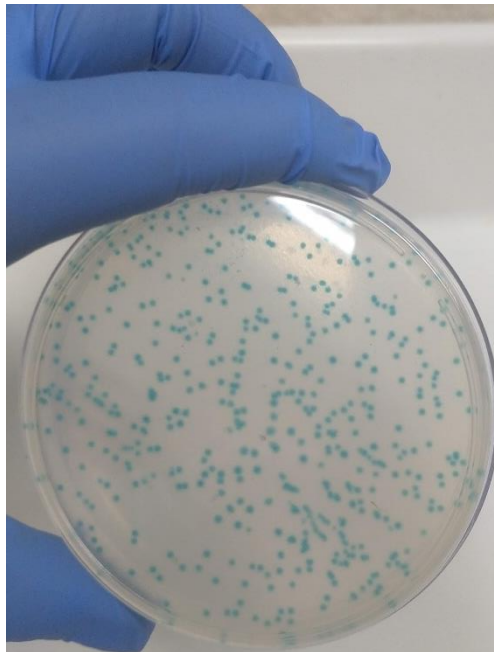
#### 3.6.2 Exclusão

Ensaios de exclusão foram feitos em duas etapas, primeiramente lactobacilos foram adicionados à cultura celular em concentração de  $10^8$  UFC/ml, células infectadas foram incubadas overnight. Em seguida células foram infectadas com EGB (sorotipos Ia, II, III e V) na concentração de  $10^8$  UFC/ml, e a placa foi incubada durante 3h. Os resultados foram analisados conforme método descrito no item 3.7.

### 3.7 Quantificação bacteriana

#### 3.7.1 Contagem de microrganismos viáveis

Ao fim de cada ensaio de co-cultura entre diferentes microrganismos, foi feita a quantificação dos microrganismos que permaneceram viáveis através uma contagem em placa. Foi feita semeadura em meio específico para EGB (StrepB ChromoSelect Selective Agar Base, Sigma-Aldrich, EUA). Foram aplicados 100µl do conteúdo de cada poço, utilizando alça de Drigalski de vidro para espalhar o conteúdo. Após incubação overnight, foram contadas as colônias de cada placa (Figura 4).



**Figura 4: Foto de placa de EGB com colônias visíveis (azuladas) para contagem manual de células viáveis.**

### 3.7.2 Contagem visual

Uma lamínula circular estéril foi posicionada em cada poço antes dos ensaios em cultura de células. Após o ensaio o conteúdo do poço foi desprezado e cada poço foi lavado com PBS para remover microrganismos e células não aderidos. O conteúdo remanescente foi fixado utilizando metanol absoluto, lamínulas foram incubadas durante 5 minutos. O corante GIEMSA foi diluído em água destilada e deionizada em proporção 1:20, lamínulas foram coradas durante 1h. Após lavadas com água destilada e deionizada, lamínulas foram fixadas em lâmina utilizando esmalte incolor. A quantidade de EGB aderidos em células HeLa foi estimada utilizando contagem manual com o auxílio do software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012); foram contadas ao menos 25 células HeLa viáveis (Figura 6), e foi feita a média de EGB aderidos por célula Hela.



**Figura 5: Lamínulas coradas e aderidas na lâmina para contagem visual**



**Figura 6: Contagem manual feita no programa ImageJ**

### 3.8 Análise de proteínas do sobrenadante

A fim de avaliar se a presença de LC influencia na produção proteica de EGB, foram feitas eletroforeses proteicas (*SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*) do sobrenadante de alguns ensaios de co-cultura e de competição em células HeLa. Foram utilizados os sobrenadantes das co-culturas das cepas 1, 4 e 6; e foram obtidos sobrenadante de dos ensaios de competição de todas as cepas.

#### 3.8.1 Precipitação de proteínas

Nos ensaios de proteínas, a obtenção do sobrenadante foi realizada a partir de co-cultura overnight ou ensaios com células. O procedimento envolveu pipetar amostras em alíquotas de 1 ml, em tubos Eppendorf de 1,5 ml, seguido pela centrifugação a 3.000g por 20 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado e o pellet foi descartado. Posteriormente, o sobrenadante foi armazenado a -20°C para análises posteriores. Para a precipitação de proteínas do sobrenadante, preparou-se uma solução de ácido tricloroacético (TCA) na proporção 1:1, onde 200 µl de TCA (100%) foram adicionados a cada uma das alíquotas de 1 ml. As amostras foram homogeneizadas suavemente por inversão, e então incubadas a -20°C durante a noite ou até que estivessem congeladas. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 25 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado, permitindo que as amostras escorressem em papel absorvente. Em seguida, 500 µl de acetona pura, mantida a 4°C, foram adicionados às amostras, sem a necessidade de homogeneização. As amostras foram centrifugadas novamente a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Esse processo foi repetido por mais duas vezes. Posteriormente, os tubos contendo os pellets foram deixados secar, com as tampas abertas, até que a acetona evaporasse, o que levou aproximadamente 5 minutos. Após a etapa de secagem, os pellets foram ressuspensos em Tris-HCl 1,5M pH 8.8, e todas as alíquotas foram pipetadas para o mesmo tubo. Para a desnaturação da amostra, aplicou-se uma mistura de amostra e um tampão de amostra (Sample buffer) na proporção 1:1 em tubos Eppendorf de 1,5 ml. Essas amostras foram, então, desnaturadas em um banho seco a 96°C por 5 minutos.



### 3.8.2 Preparo do gel de acrilamida

Foram preparados géis de acrilamida nas concentrações de 10, 12 e 15%, conforme descrito anteriormente (SAMBROOK; RUSSEL, D, 2000).

### 3.8.3 Corrida de eletroforese

O tampão de corrida foi preparado pelo processo de diluição da Tris glicina 10%, que consistiu em misturar 100 ml de Tris com 10 ml de SDS, completando com água destilada até atingir 1 litro. Primeiramente, o suporte com o gel foi fixado na cuba. No gel, procedeu-se à aplicação de 5µl de *ladder* e 20µl de amostra. Após essas etapas, a corrida foi realizada a 90V por aproximadamente 120 minutos, mantendo constante observação da separação das bandas de *ladder* pré-coradas.

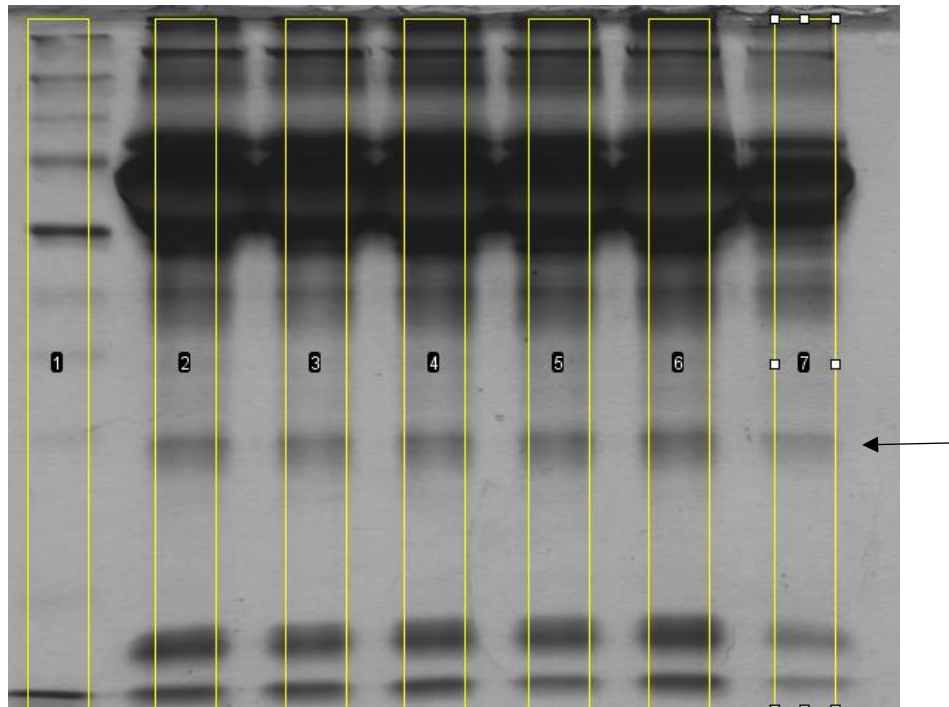
### 3.8.4 Coloração dos géis

O método utilizado foi a coloração rápida por prata (SAMBROOK; RUSSEL, D, 2000). As soluções utilizadas foram: solução fixadora, solução tiosulfato, solução corante e solução *stop*, preparadas conforme descrito anteriormente. Primeiramente, o gel foi colocado em 100 ml de solução fixadora e aquecido no micro-ondas por 30 segundos. Em seguida, o gel foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, a solução fixadora foi descartada, e adicionou-se 100 ml de etanol a 30% ao gel, que foi aquecido no micro-ondas por 30 segundos e o mantido sob agitação à temperatura ambiente por 5 minutos. A etapa seguinte consistiu em descartar o etanol e acrescentar tiosulfato de sódio ao gel, que foi aquecido por 30 segundos e o mantido sob agitação à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, a solução de tiosulfato foi descartada, e o gel recebeu água destilada. Novamente, o gel foi aquecido no micro-ondas por 30 segundos mantido sob agitação à temperatura ambiente por 2 minutos. Esse processo foi repetido, descartando a água destilada e acrescentando mais água destilada, seguida pelo aquecimento e o gel foi mantido sob agitação. Após essas etapas, o gel foi submetido à solução corante, aquecendo-o no micro-ondas por 30 segundos e o mantendo sob agitação à temperatura ambiente por 5 minutos. A solução corante foi descartada,

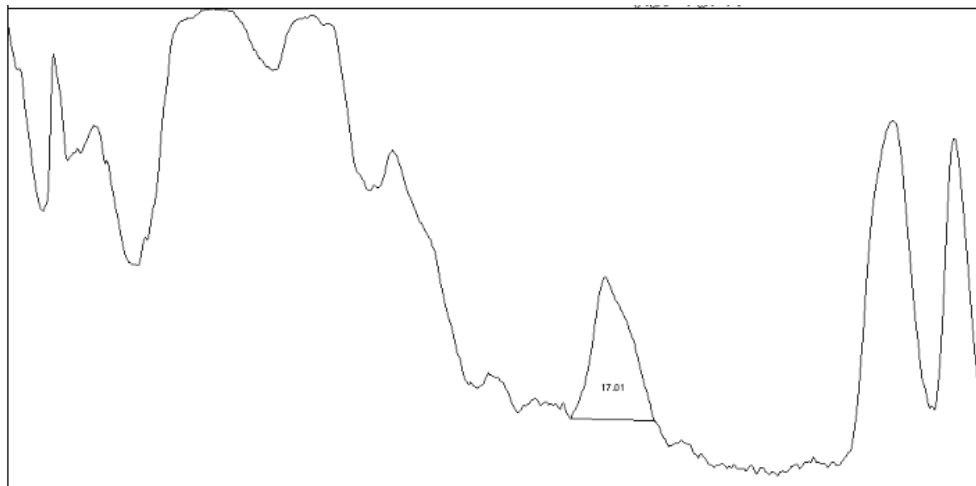
e o gel recebeu água destilada, o gel foi mantido sob agitação por mais 1 minuto. A etapa final envolveu a adição da solução reveladora ao gel. O gel foi mantido sob agitação sempre observando a coloração. O processo foi interrompido acrescentando a solução de parada, e o gel foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 10 minutos. Após a conclusão de todas as etapas, as soluções anteriores foram descartadas, e o gel foi submerso em água destilada e mantido sob agitação por 10 minutos. Por fim, as bandas foram observadas e o gel foi escaneado.

A fim de determinar se há alteração nas concentrações proteicas dos microrganismos quando em co-cultura, a concentração proteica foi dosada diretamente do sobrenadante utilizando kit *Bradford Protein Assay* (BioRad, California, Estados Unidos), seguindo instruções do fabricante. A concentração dos sobrenadantes foi ajustada para 40µg/ml, foram aplicados 30µl de amostra por poço em gel de 12% de acrilamida. A corrida de eletroforese foi realizada a 80V durante 2h30min.

Para determinação quantitativa do gel SDS-Page as imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Foi feita a quantificação de uma das bandas, de aproximadamente 20kDa, utilizada para referência. Cada coluna foi selecionada manualmente (Figura 7), foi construído um gráfico com picos de intensidade de cada banda, uma linha foi acrescentada manualmente na base do pico de interesse de cada coluna e foi calculada a sua área (Figura 8). O valor da área foi utilizado pelo software para calcular o percentual de cada pico de acordo com a coluna de referência (coluna 1). Por último, a densidade relativa de cada banda foi obtida dividindo o seu percentual pelo percentual da coluna de referência;



**Figura 7:** Gel de eletroforese processado utilizando o software ImageJ, seta indica banda selecionada para análise.



**Figura 8:** Exemplo de gráfico de densidade de uma das colunas do gel SDS-Page, incluindo cálculo da área de um dos picos

### 3.9 Análise

Para avaliar o efeito de LC em EGB todos os resultados foram avaliados utilizando o teste 2way-ANOVA (Analysis Of Variance), com teste post-Hoc Tukey. O software utilizado para análise foi o GraphPad Prism versão 10.0.0 para Windows (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 4 Resultados

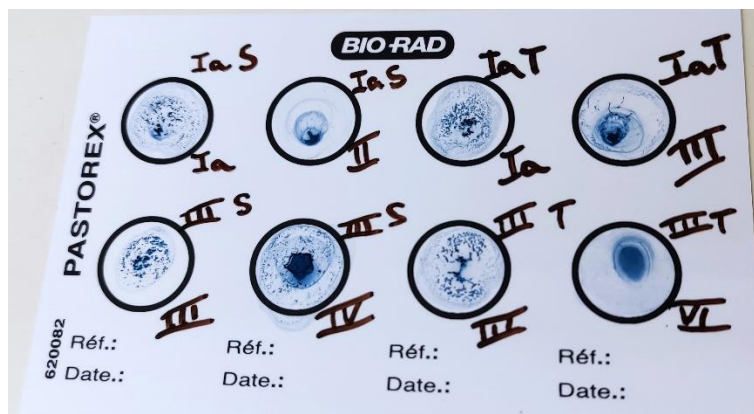
### 4.1 Caracterização das cepas de *Streptococcus* do Grupo B (EGB)

A caracterização das cepas de EGB demonstrou que as cepas selecionadas pertencem a diferentes sorotipos, *Sequence Types* e *Clonal Complexes*. E essas características não estão conectadas entre si.

Todas as cepas utilizadas nesse estudo foram positivas para o teste CAMP (Figura 11), e foram identificadas como *Streptococcus agalactiae* pelo *MALDI-ToF* (Tabela 7). Os resultados do PCR multiplex e aglutinação em látex (Figura 9) para sorotipo capsular foram os mesmos entre si, confirmando que ambos são métodos válidos para obtenção deste dado (Tabela 9). No que se refere aos genes de virulência e sensibilidade a antimicrobianos, as cepas selecionadas têm um padrão consideravelmente uniforme, de alta positividade para fatores de virulência e baixa resistência aos antimicrobianos testados. Com exceção da cepa 2, que não possui a ilha de pili 2b e possui resistência a eritromicina e clindamicina, sendo o fenótipo de resistência induzível a Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas B (iMLSB).

**Tabela 7: Resultado dos scores de cada cepa de acordo com *MALDI-ToF*:**

cepa	Resultado	Maldi-Tof score
1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2,149
2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2,445
3	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2,39
4	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2,359
5	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2,47
6	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2,241



**Figura 9:** Exemplo do cartão utilizado nos testes de aglutinação em látex; é possível observar a aglutinação característica de resultados positivos.

De acordo com o resultado do sequenciamento MLST, as seis cepas selecionadas pertencem a quatro diferentes *Sequence Types* (STs) e três diferentes *Clonal Complexes* (CCs) (Tabela 8 e Tabela 9). O ST 23 foi encontrado em duas cepas, pertencentes aos sorotipos Ia e III, o ST1 foi encontrado em duas cepas, ambas pertencentes ao sorotipo V, o ST182 foi encontrado em uma cepa pertencente ao sorotipo III e o ST28 em uma cepa pertencente ao sorotipo II. Assim como o ST23, e CC23 foi encontrado nas mesmas duas cepas pertencentes aos sorotipos Ia e III, o CC1 também foi encontrado nas mesmas cepas que o ST1, já o CC19 foi encontrado em duas cepas, uma pertencente ao sorotipo III (ST182) e uma pertencente ao sorotipo II (ST28) (Tabela 8 e Tabela 9).

**Tabela 8:** Resultados de ST e CC com número do alelo e *locus* correspondente de acordo MLST:

Cepa	adhP	pheS	atr	glnA	sdhA	glcK	tkf	ST	CC
1	5	4	6	3	2	1	3	ST23	CC23
2	1	1	3	2	18	2	2	ST182	CC19
3	1	1	2	1	1	2	2	ST1	CC1
4	1	1	3	5	2	2	2	ST28	CC19
5	5	4	6	3	2	1	3	ST23	CC23
6	1	1	2	1	1	2	2	ST1	CC1

Resultados de RFLP demonstraram que as cepas são distintas geneticamente, com exceção das cepas 2 e 5, que apresentaram altíssima similaridade, o que pode ser explicado pelo fato das suas pertencerem ao sorotipo III.

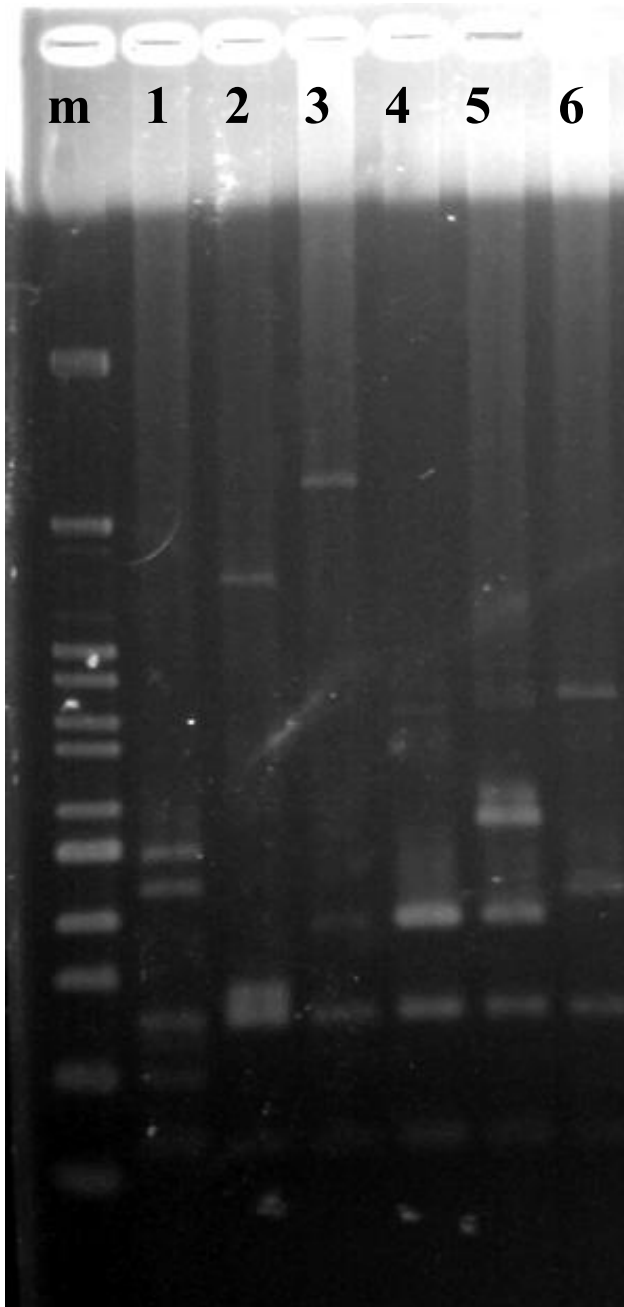
**Tabela 9: Resumo dos resultados de caracterização das cepas de EGB utilizadas nesse trabalho:**

<b>Cepas</b>	<b>Sorotipo capsular (PCR Multiplex)</b>	<b>Sorotipo capsular (aglutinação em látex)</b>	<b>Genes de virulência</b>	<b>Resistência a antimicrobianos</b>	<b>Sequence Type</b>	<b>Clonal Complex</b>
1	Ia	Ia	hyIB, cyIE, P1, P1-2A, P1-2B	Susceptível a todos os antimicrobianos testados	ST23	CC23
2	III	III	hyIB, cyIE, P1, P1-2A	Resistente à eritromicina e clindamicina (fenótipo iMLSb)	ST182	CC19
3	V	V	hyIB, cyIE, P1, P1-2A, P1-2B	Susceptível a todos os antimicrobianos testados	ST1	CC1
4	II	II	hyIB, cyIE, P1, P1-2A, P1-2B	Susceptível a todos os antimicrobianos testados	ST28	CC19
5	III	III	hyIB, cyIE, P1, P1-2A, P1-2B	Susceptível a todos os antimicrobianos testados	ST23	CC23
6	V	V	hyIB, cyIE, P1,	Susceptível a todos os	ST1	CC1

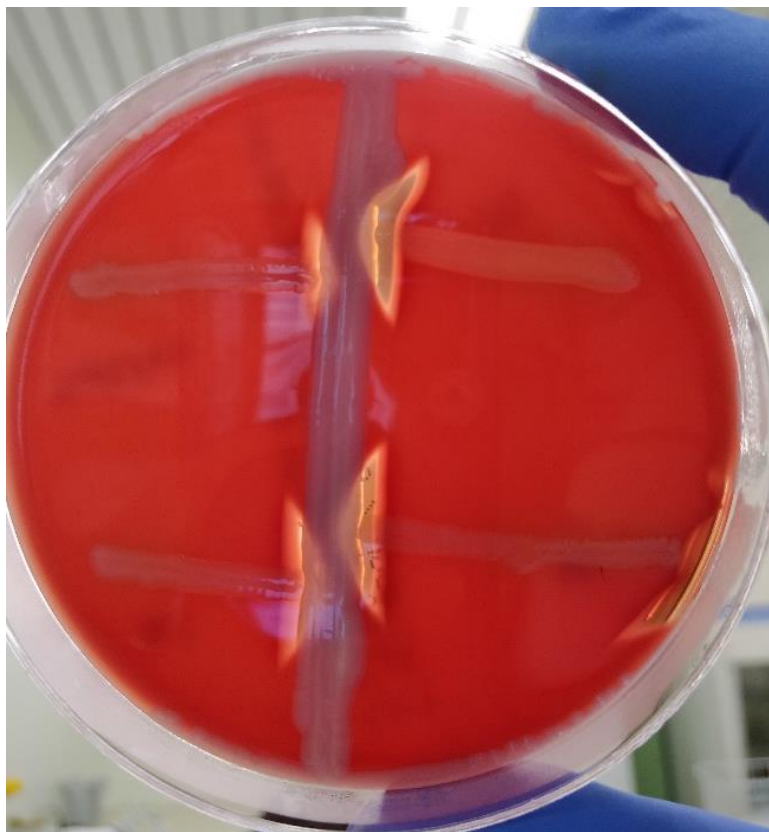
---

P1-2A, P1- antimicrobianos  
2B testados

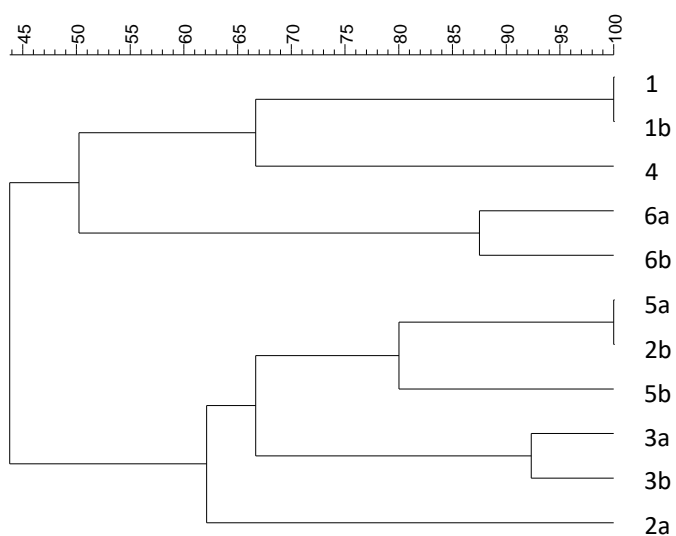
---



**Figura 10:** Gel de eletroforese resultante da reação de RFLP. M: Marcador de peso molecular (100pb); números indicam cepas de EGB.



**Figura 11: Placa de ágar sangue com cepa de *Staphylococcus aureus* no centro e cepas investigadas semeadas perpendicularmente a ele. Todos os resultados mostrados na figura são positivos.**



**Figura 12: Similaridade entre as cepas de acordo com o resultado do RFLP; a e b correspondem a duplicatas do mesmo ensaio.**



## 4.2 Curva de crescimento

Dentre as cepas de EBG avaliadas, o perfil de crescimento foi concordante, após quatro horas de crescimento, a maioria das cepas atingiu a fase estacionária; com exceção da cepa 4 (única pertencente ao sorotipo II) que possui um padrão de crescimento mais lento, permanecendo com absorvância constante até os tempos T6, T7 e T8, quando houve crescimento, porém, ainda reduzido (Figura 13, Tabela 10). Foram feitas cinco replicatas biológicas, sendo cada ensaio feito em unicata, porém para todos os cálculos estatísticos, foram selecionados três dos pontos da curva com maior similaridade entre si.

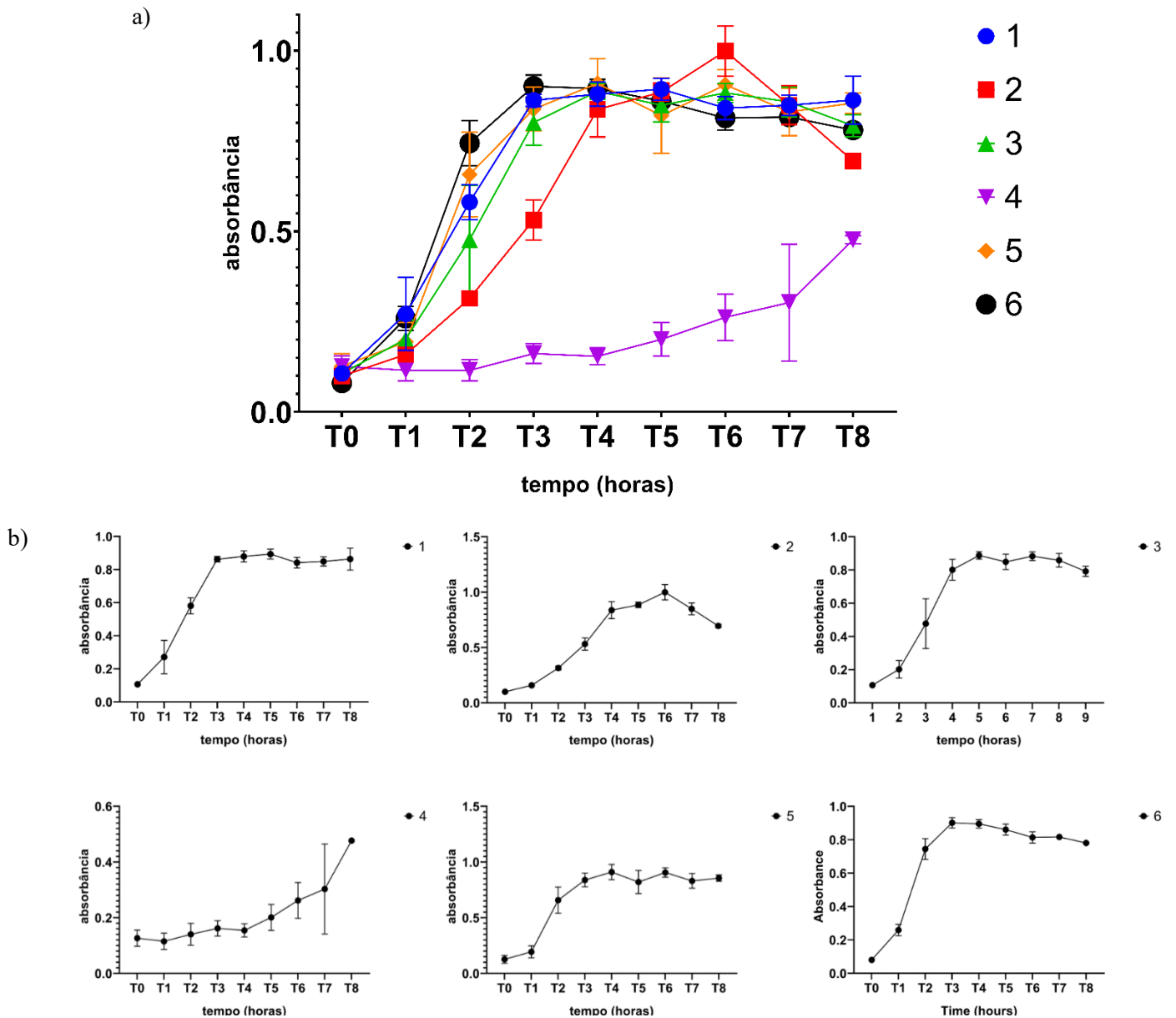


Figura 13: absorvância da cultura de EGB, obtida a cada 60min; (a) curvas vistas em conjunto, (b) curvas vistas separadamente

Tabela 10: Média das absorvâncias das triplicatas das curvas de crescimento

cepa	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
1	0,106667	0,271333	0,581	0,862667	0,879667	0,893667	0,841333	0,849	0,863333
2	0,1	0,159	0,314667	0,531667	0,837333	0,885333	0,999	0,849333	0,694667
3	0,106667	0,202	0,477	0,477	0,887667	0,849	0,883	0,858667	0,792
4	0,126667	0,115333	0,115333	0,161667	0,154333	0,201	0,262	0,303	0,476667
5	0,126667	0,193667	0,657333	0,838667	0,909333	0,820333	0,905667	0,830667	0,855333
6	0,080333	0,259	0,744333	0,901667	0,895333	0,860667	0,813667	0,816333	0,780333

### 4.3 Biofilme

Foram feitos quatro ensaios separados de formação de biofilme. Foram encontradas diferenças significativas na formação de biofilme na presença e ausência de LC para as cepas 1, 2, 3 e 4 (Figura 14).

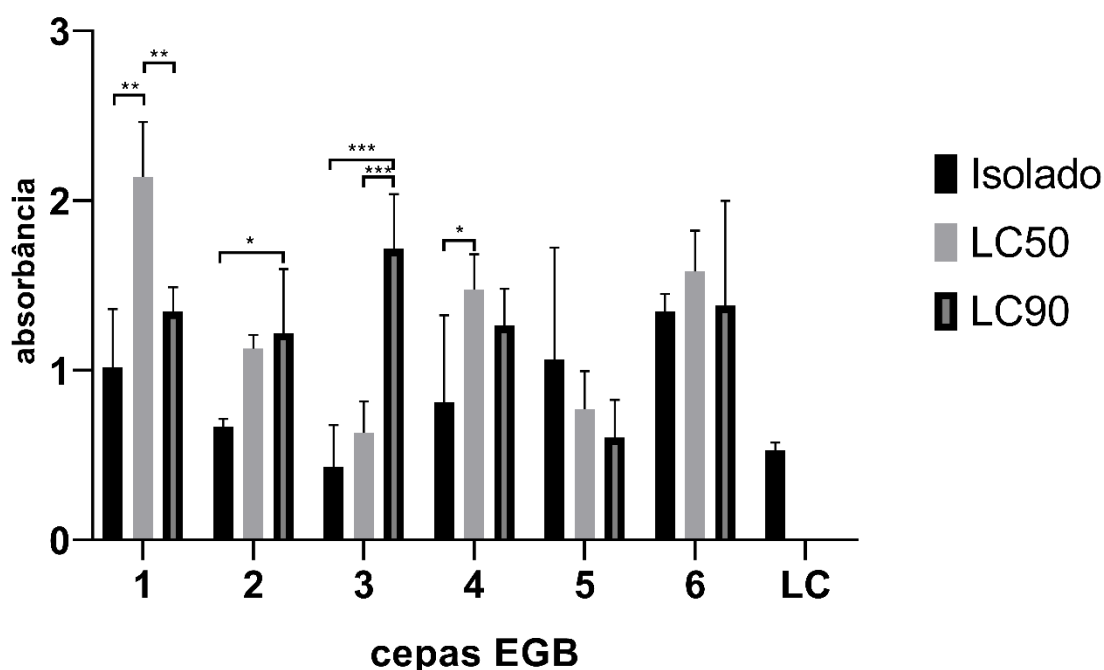


Figura 14: Formação de biofilme na presença e ausência de LC. LC 50%: proporção de EGB e LC é de 1:1; LC 90%: proporção de EGB e LC é de 1:10 (“\*” =  $p < 0,05$ ; “\*\*\*” =  $p < 0,001$ ; “\*\*\*\*\*” =  $p < 0,0001$ ).

O teste Tukey demonstra que diferentes cepas possuem distinta capacidade de formação de biofilme (Tabela 11). Além disso, foi observada a capacidade de formação de biofilme da cepa LC, o que é incomum.

**Tabela 11: Comparação entre valores de p em diferentes condições de formação de biofilme (“\*” = p<0,05; “\*\*\*” = p<0,001; “\*\*\*\*” = p<0,0001):**

<b>cepa</b>	<b>biofilme isolado vs biofilme LC50</b>	<b>biofilme isolado vs biofilme LC90</b>	<b>biofilme LC50 vs biofilme LC90</b>
1	<0,0001***	0,2607	0,0008**
2	0,0751	0,0257*	0,8974
3	0,5956	<0,0001***	<0,0001***
4	0,0057*	0,0818	0,5638
5	0,3399	0,0736	0,6960
6	0,4928	0,9847	0,5962

#### 4.4 Co-cultura

Para avaliar a capacidade do LC de interferir no crescimento de EGB, foram feitos ensaios de co-cultura entre esses microrganismos; foram utilizadas concentrações decrescentes de LC para estabelecer se essa interação depende da concentração de lactobacilos. O teste 2-way ANOVA foi utilizado para comparar o resultado do crescimento das cepas na presença LC em relação ao controle. Quando comparado crescimento entre as cepas nas diferentes concentrações de LC, foram encontradas diferenças entre as cepas 1, 2, 3 e 4 (Figura 15, Tabela 12).

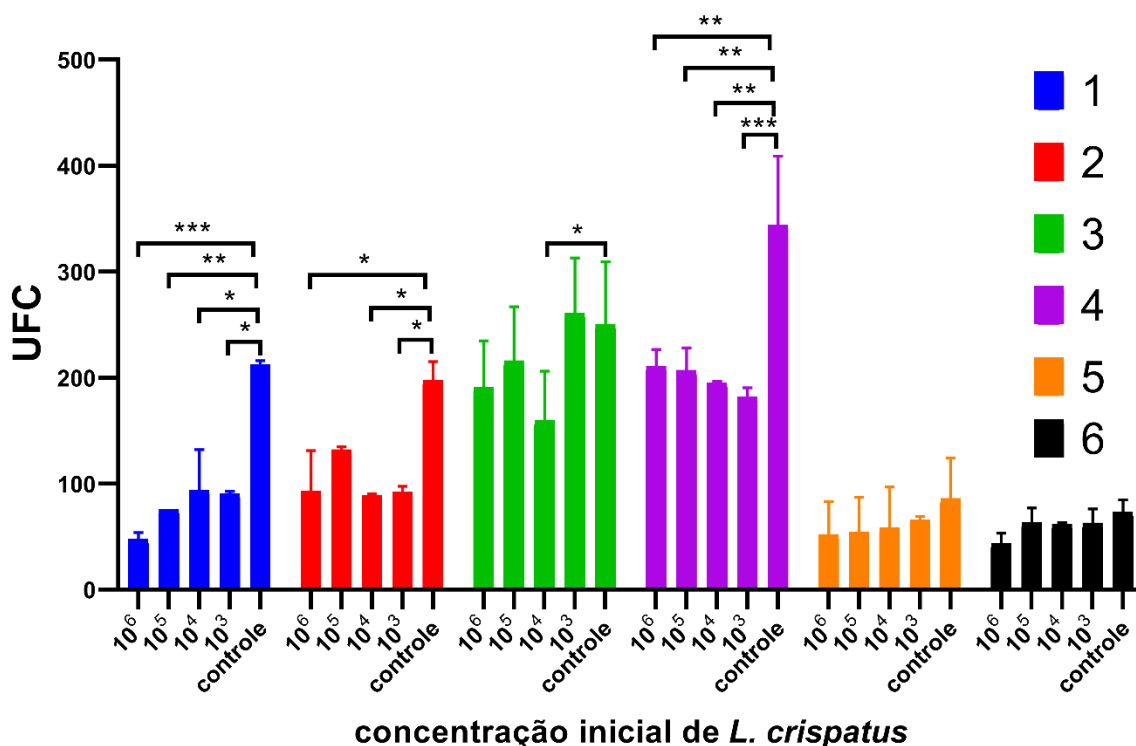


Figura 15: Contagem de colônias viáveis após incubação com concentrações decrescentes de LC (“\*” =  $p < 0,05$ ; “\*\*\*” =  $p < 0,001$ ; “\*\*\*\*” =  $p < 0,0001$ ).

Entre as cepas 1 e 4, houve diferença significativa no crescimento de EGB na ausência de LC (controle) e todas as concentrações de LC testadas, já para a cepa 2 houve diferença para as concentrações  $10^6$ ,  $10^4$  e  $10^3$ . E para a cepa 3, houve diferença somente entre a concentração  $10^4$  e controle.

**Tabela 12: Valores de p comparando crescimento de EGB em diferentes concentrações de LC com crescimento na ausência de LC (“\*” =  $p < 0,05$ ; “\*\*” =  $p < 0,001$ ; “\*\*\*” =  $p < 0,0001$ ):**

cepa	Concentração de LC	p
<b>1</b>	$10^6$	<0,0001***
	$10^5$	0,0006**
	$10^4$	0,0011*
	$10^3$	0,0024*
<b>2</b>	$10^6$	0,0122*
	$10^5$	0,2251
	$10^4$	0,0086*
	$10^3$	0,0117*
<b>3</b>	$10^6$	0,3133
	$10^5$	0,7926
	$10^4$	0,9951
	$10^3$	0,0183*
<b>4</b>	$10^6$	0,0008**
	$10^5$	0,0006**
	$10^4$	0,0002**
	$10^3$	<0,0001***
<b>5</b>	$10^6$	0,6583
	$10^5$	0,7148
	$10^4$	0,8038
	$10^3$	0,9299
<b>6</b>	$10^6$	0,8253
	$10^5$	0,9937
	$10^4$	0,9940
	$10^3$	0,9935

#### 4.5 Ensaio de Competição

Foram comparados o número de EGB aderidos a células HeLa na presença ou ausência de LC (Tabela 13). Entre as comparações individuais, houve significativa diminuição da adesão de EGB às células Hela na presença de LC somente para a cepa 2 ( $p= 0,0205$ ); e houve aumento na adesão de EGB na presença de LC para a cepa 6 ( $p= 0,0366$ ) (Figura 16). A Figura 18 exemplifica um campo visualizado em objetiva de 40x, após coloração de GIEMSA.

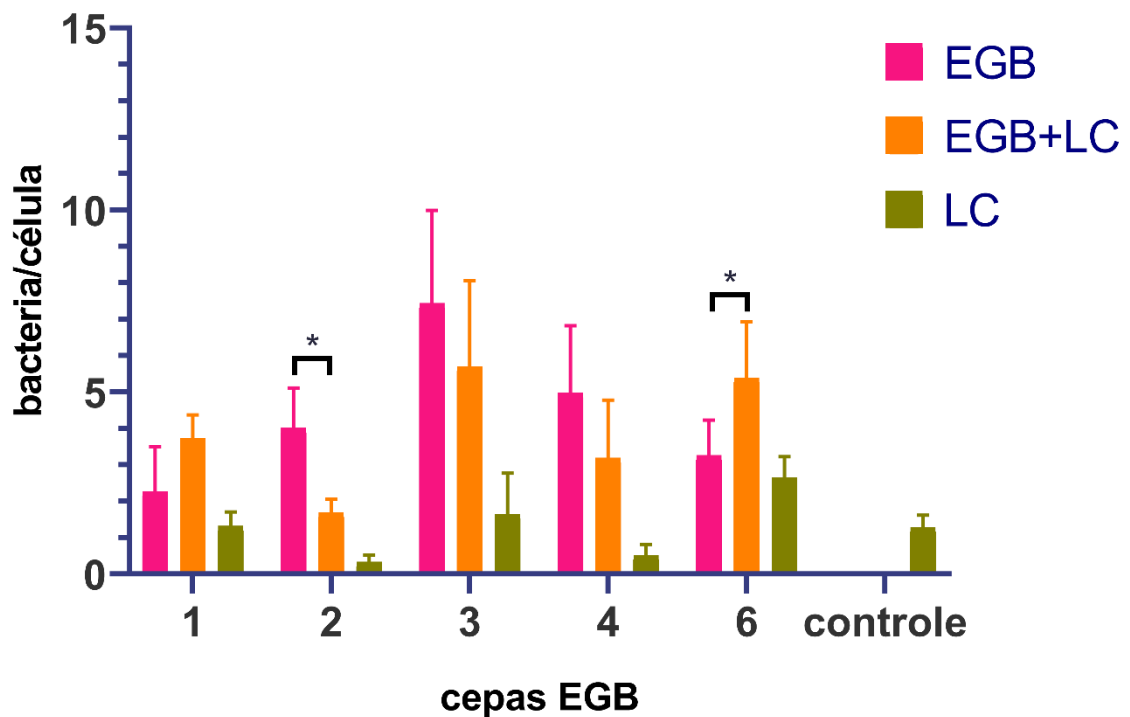


Figura 16: Número de bactérias aderidas a células HeLa em diferentes condições (\*\*\*) =  $p<0,05$ ).

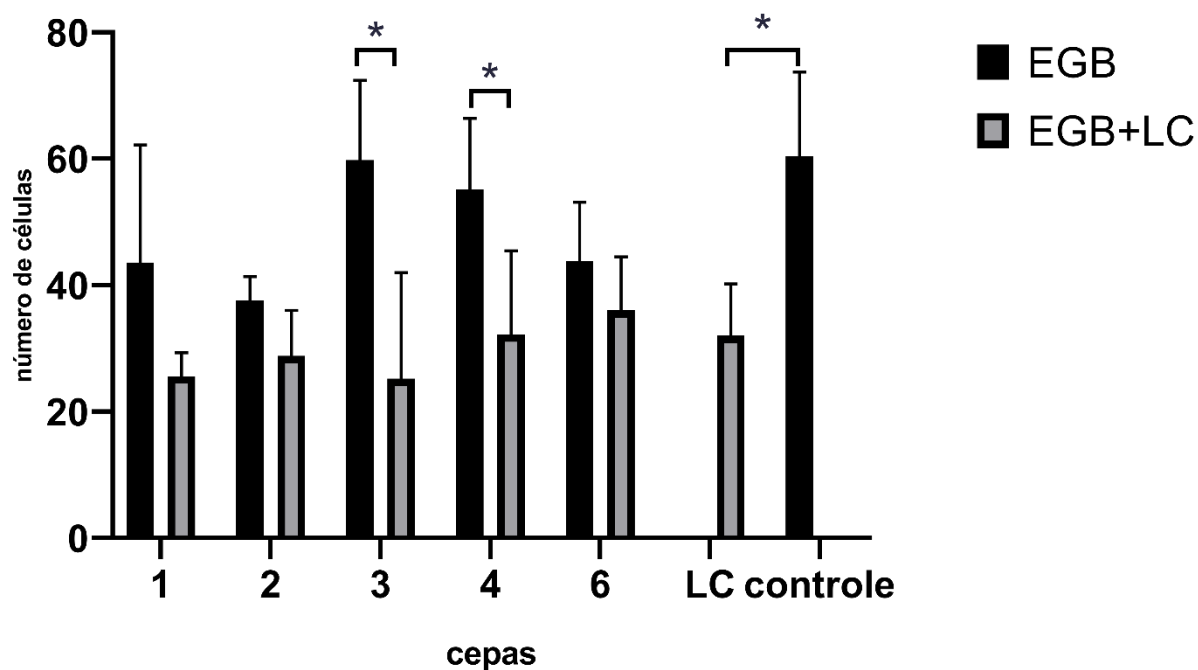
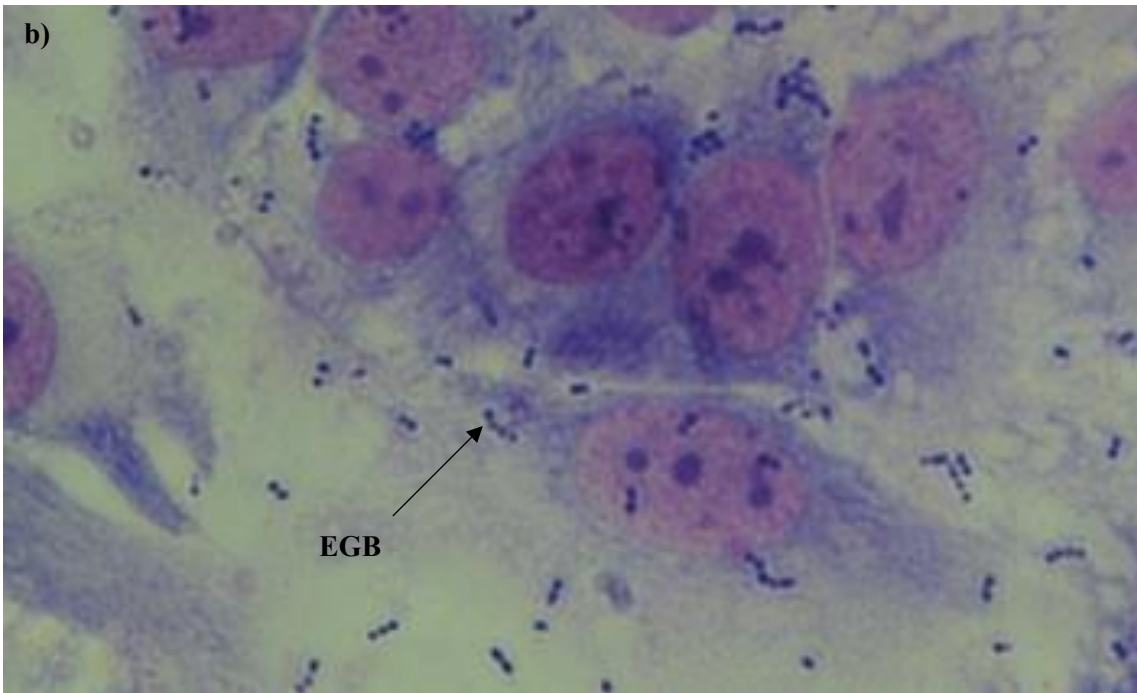
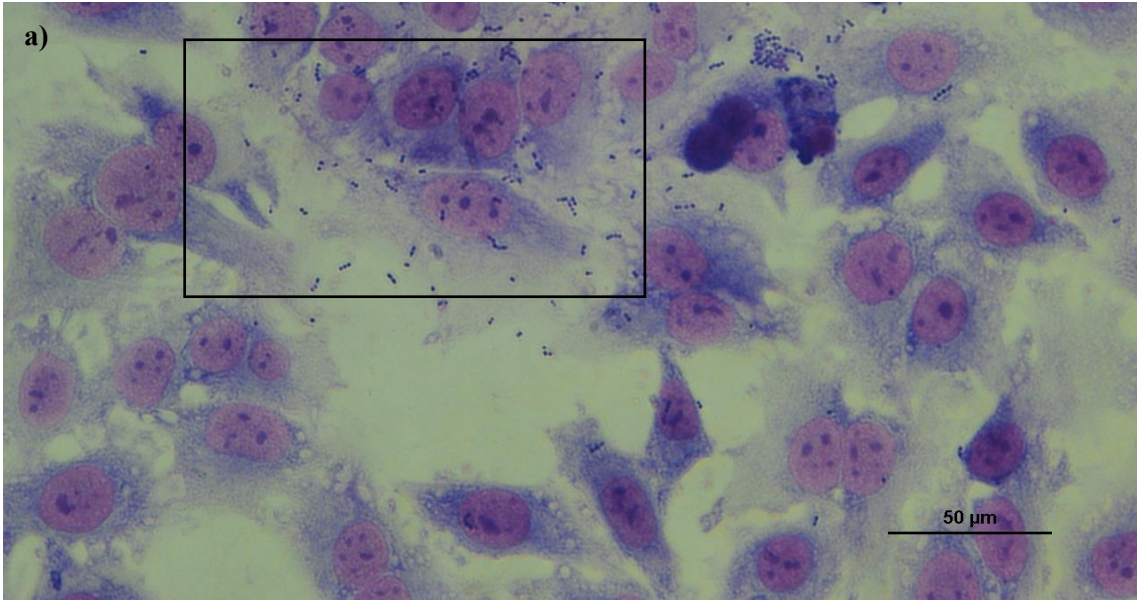


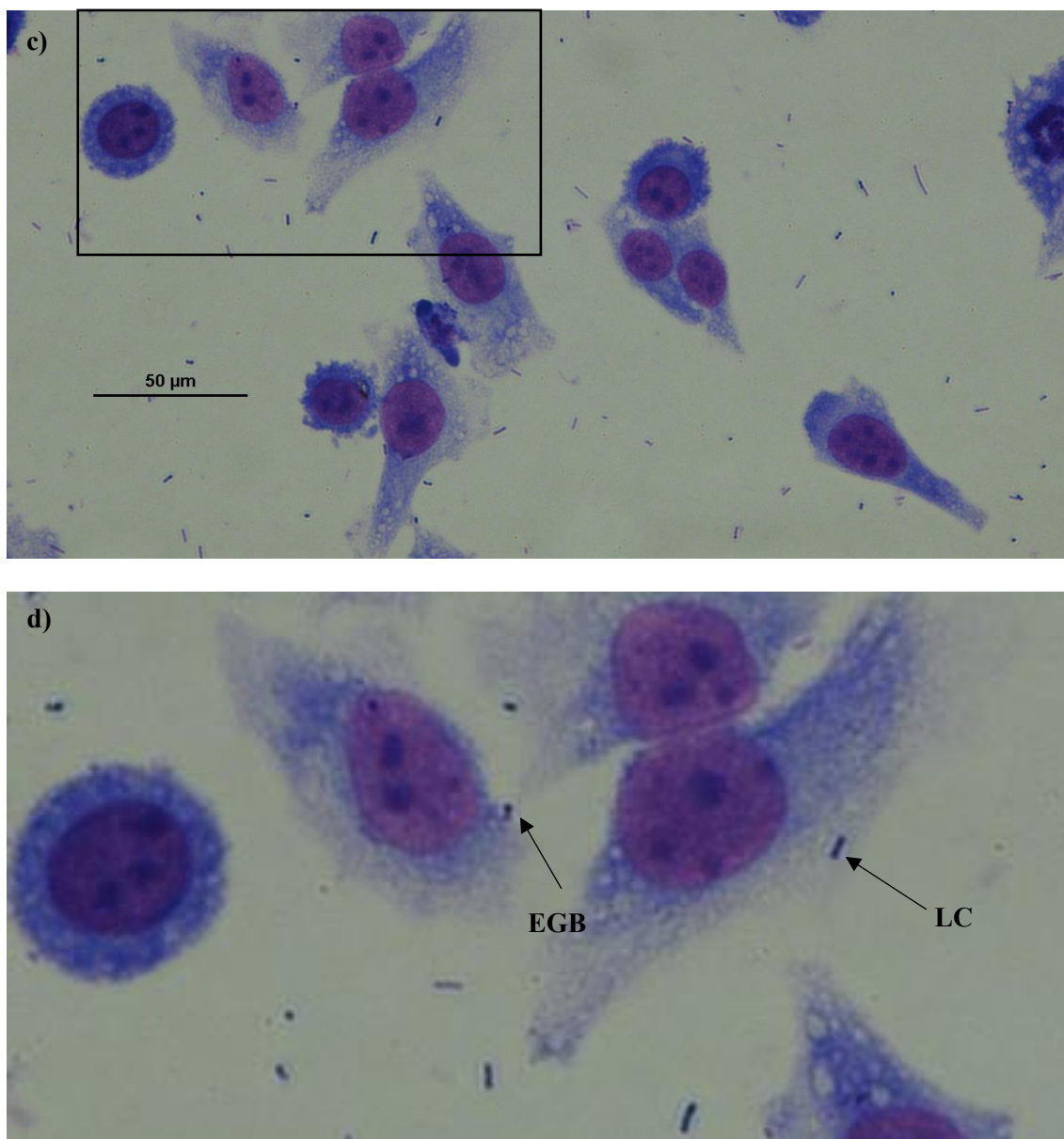
Figura 17: Contagem do número de células HeLa após ensaio de competição em diferentes condições (“\*” =  $p < 0,05$ ).

Tabela 13: Média de microrganismos aderidos a células HeLa em diferentes condições

cepa	EGB	EGB na presença de LC	LC na presença de EGB
1	2,517944782	3,719955965	1,3182438
2	4,588459167	1,680984928	0,3309714
3	7,438327664	5,697129946	1,6450726
4	2,957889324	3,184679273	0,512254
6	3,261929261	5,392530189	2,6518998







**Figura 18: Microscopia ótica microrganismos aderidos a células Hela; lâmina corada utilizando GIEMSA após ensaio de competição. (a) EGB isoladamente, retângulo indica seção representada na figura (b); (c) Cepa de EGB e *L. crispatus*, retângulo indica seção representada na figura (d).**

A fim de melhor compreender a capacidade de adesão de EGB a células Hela, os resultados foram comparados entre diferentes cepas dentro da mesma condição. Foi realizado o teste post-hoc de Tukey. Quando comparada a adesão de EGB isoladamente, houve diferença significativa entre a cepa 3 (sorotipo V) e as cepas 1 (sorotipo Ia;  $p < 0,0001$ ), 4 (sorotipo II;  $p = 0,0369$ ) e 6 (sorotipo V;  $p < 0,0001$ ); e entre a cepa 1 e a cepa 4 ( $p = 0,0168$ ).

Quando comparada a adesão de EGB a células Hela na presença de LC, houve diferença significativa entre a cepa 2 (sorotipo III) e as cepas 3 (sorotipo V;  $p = 0,0001$ ) e 6 (sorotipo V;

$p=0,00040$ ); e entre as cepas 3 e 4 ( $p=0,0320$ ). Para avaliar se há efeito da presença de EGB na adesão de LC às células Hela, o número de LC aderido foi comparado entre as cepas e na ausência de EGB.

Por fim, foram comparados o número total de células Hela encontrados nos campos observados, comparando as condições: cepas de EGB, presença ou ausência de LC e controle negativo (ausência de quaisquer microrganismos). As cepas 3 (sorotipo V) e 4 (sorotipo II) apresentaram contagem de células Hela significativamente diferente quando na presença ou ausência de LC ( $p=0,0001$  e  $p=0,0156$  respectivamente); além disso, houve um número significativamente maior de células Hela na ausência de microrganismos quando comparado à presença de LC ( $p=0,0017$ ) (Figura 17).

#### 4.6 Ensaio de Exclusão

Para o ensaio de exclusão, células foram tratadas previamente com LC, e depois infectadas com EGB, então foram comparados o número de EGB aderidos a células Hela que receberam tratamento ou não (Tabela 14). Foram encontradas diferenças significativas na adesão de EGB pré e pós-tratamento (EGB+LC) entre as cepas 1 ( $p<0,0001$ ), 2 ( $p=0,0065$ ) e 4 ( $p=0,0308$ ), como apresentado na Figura 19.

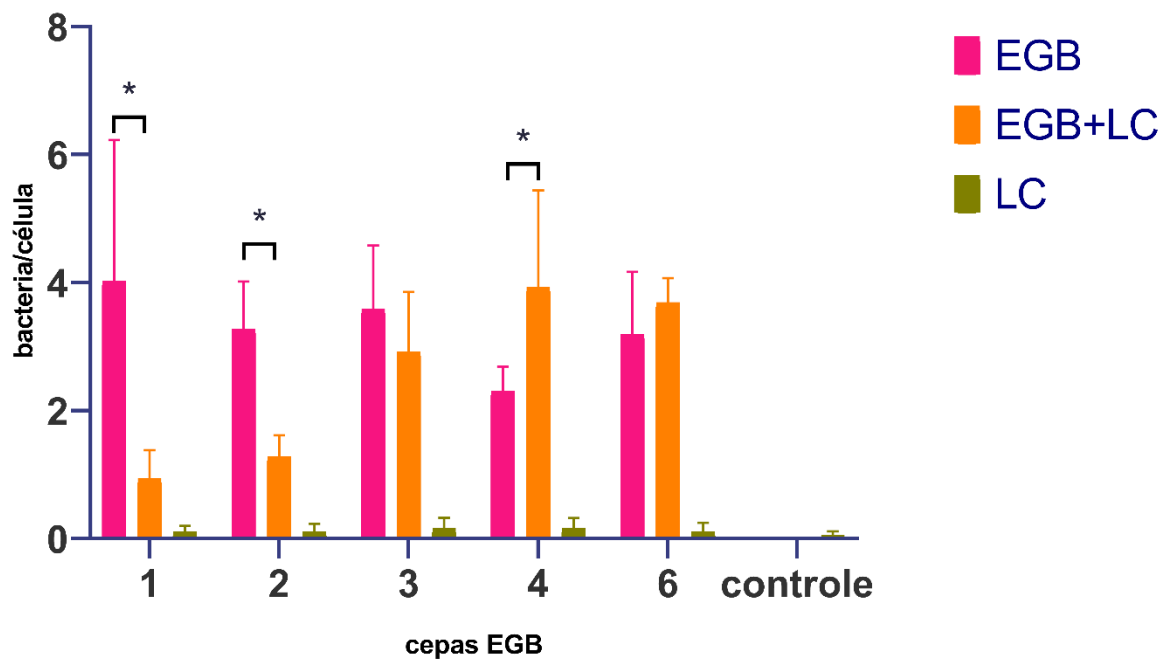
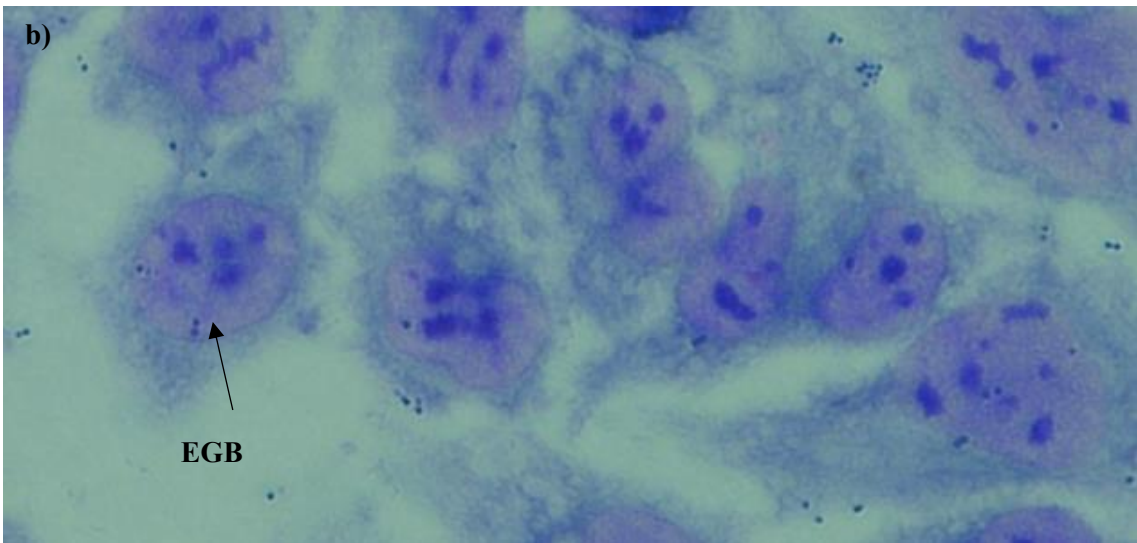
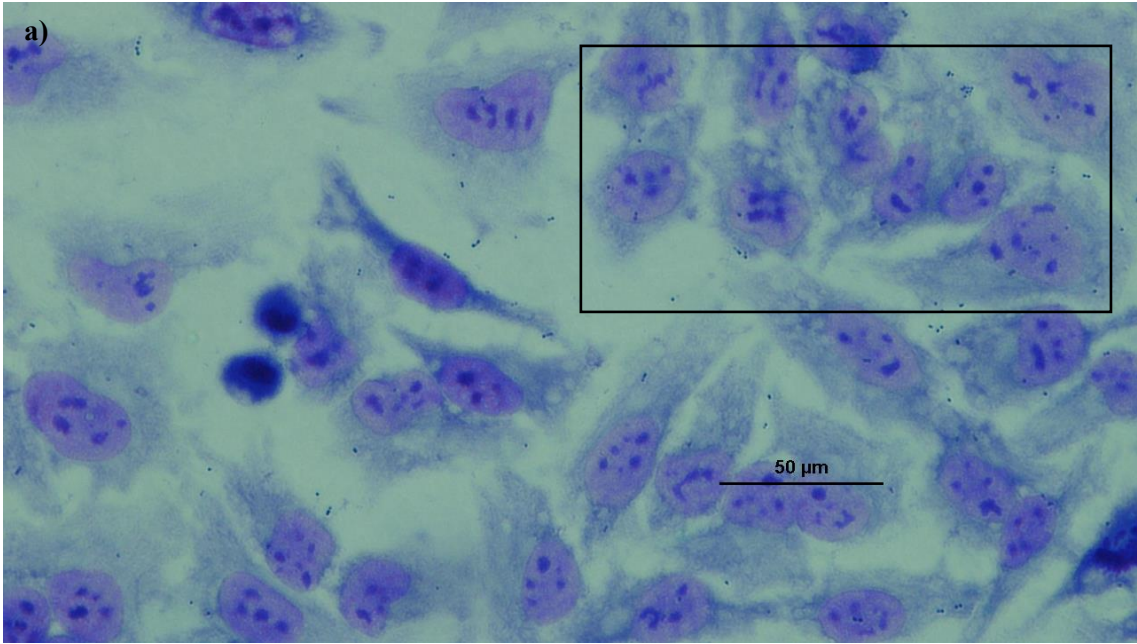
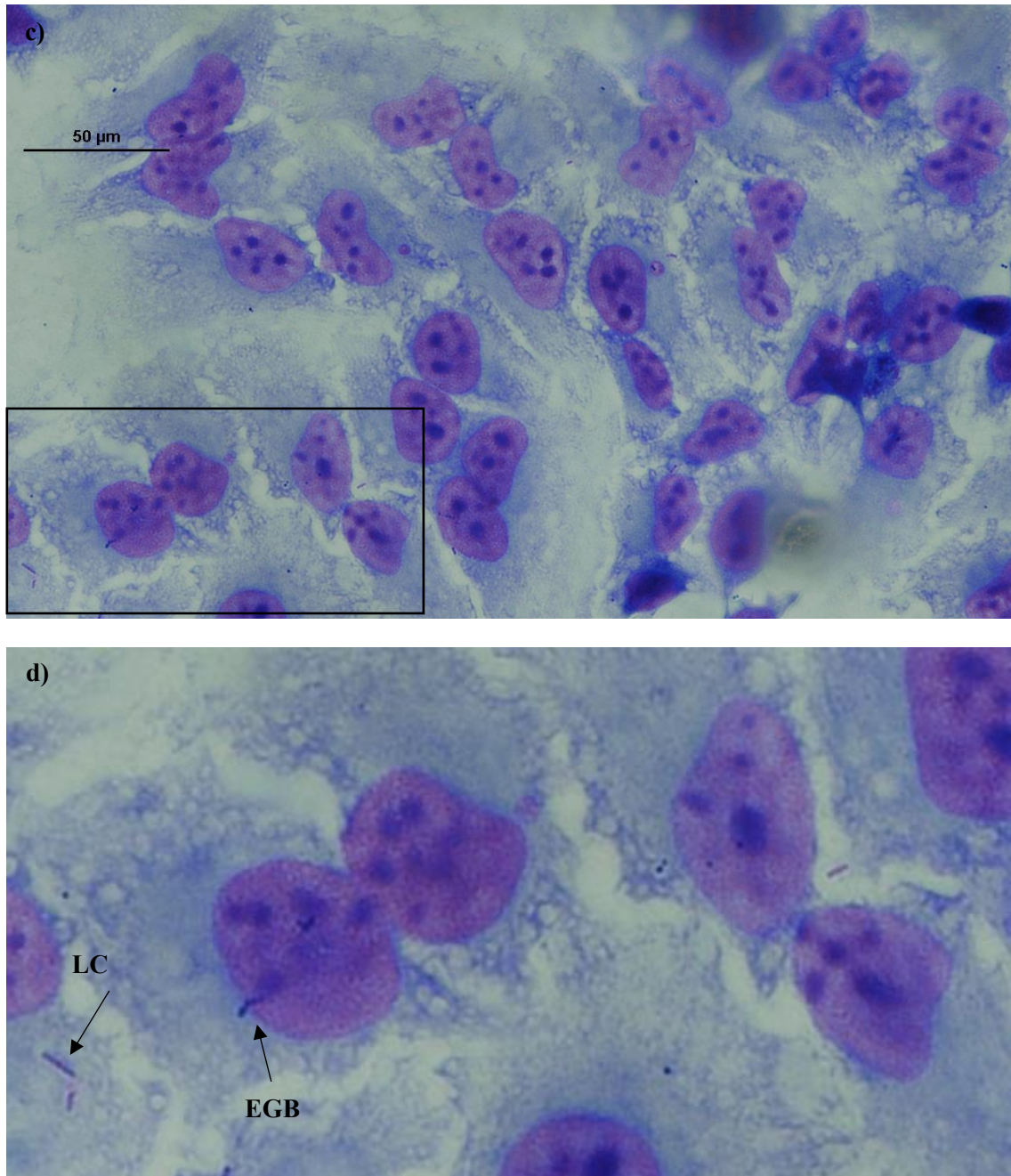


Figura 19: Número de bactérias aderidas a células Hela após ensaio de Exclusão (“\*” =  $p < 0,05$ )





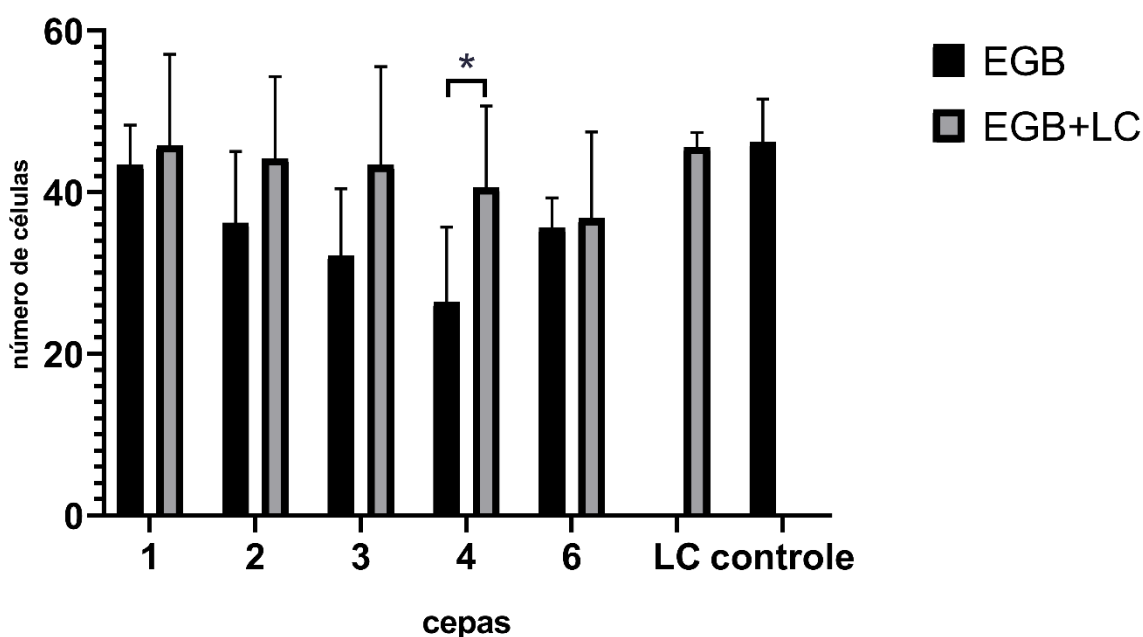
**Figura 20:** Microscopia ótica microrganismos aderidos a células HeLa; lâmina corada utilizando GIEMSA após ensaio de exclusão. (a) EGB isoladamente, retângulo indica seção representada na figura (b); (c) Cepa de EGB e *L. crispatus*, retângulo indica seção representada na figura (d).

**Tabela 14: Média de microrganismos aderidos em diferentes condições:**

cepa	EGB aderido em células Hela	EGB aderido em células Hela tratadas
1	2,907235	1,396515
2	2,967028	1,350456
3	3,782774	2,808736
4	2,504438	3,696193
6	3,339264	3,443937

A recuperação de LC após o ensaio foi baixa, independentemente da presença de EGB ou não. Mesmo assim foram comparados os números de LC aderidos a células Hela em diferentes condições, entre as cepas e controle, contudo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Foi feita a contagem de células Hela encontradas após o ensaio de exclusão entre as cepas de forma individual, comparando a presença e ausência de EGB. Somente a cepa 4 (sorotipo II,  $p=0,0415$ ) mostrou resultado significativamente maior de número de células na presença de LC quando comparado à sua ausência.



**Figura 21: Contagem do número de células Hela após ensaio de exclusão em diferentes condições (“\*” =  $p<0,05$ ).**

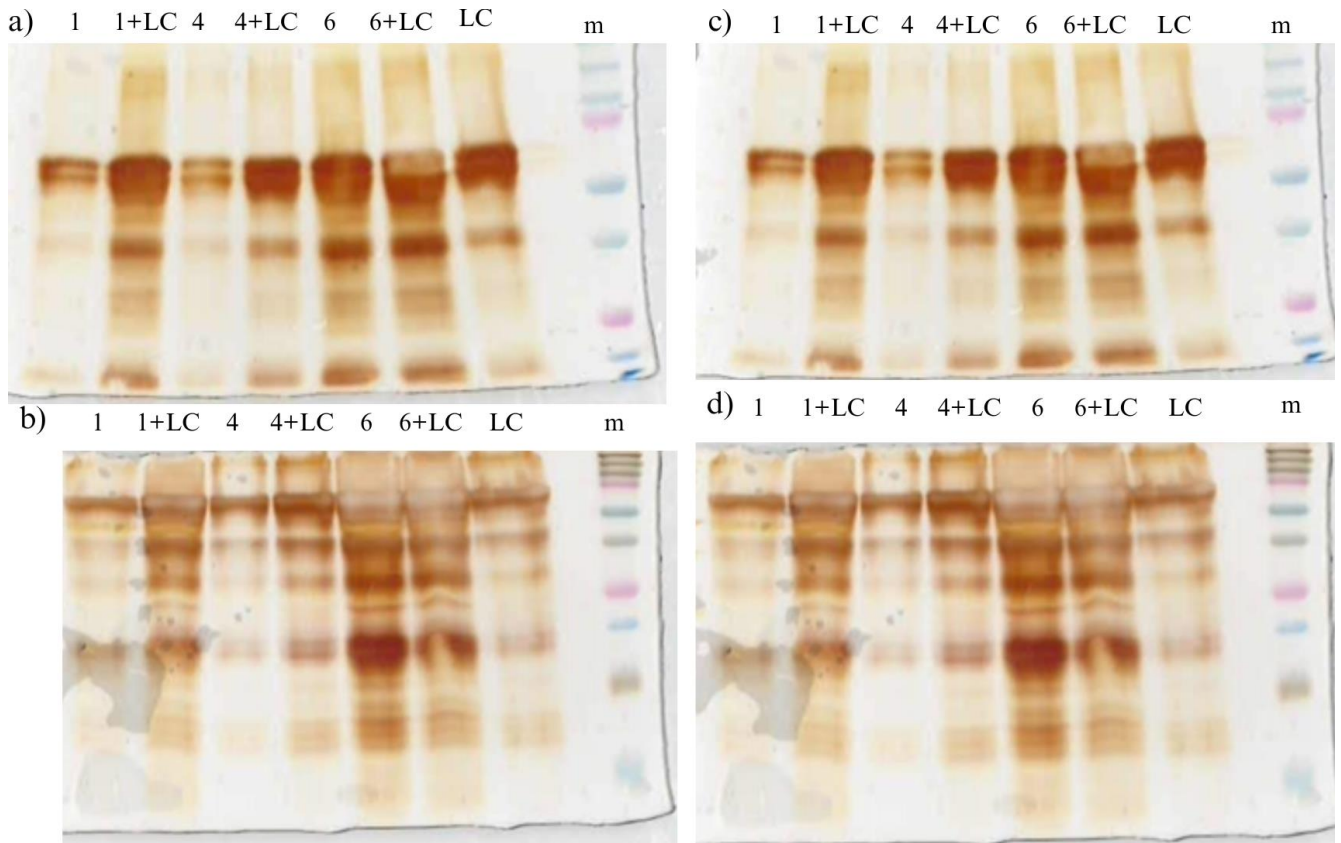
Os resultados de interação demonstraram que a interação entre Estreptococos do Grupo B e *L. crispatus* (LC) varia entre cepas; resultados estão resumidos na Tabela 15.

**Tabela 15: Resumo dos resultados de caracterização de EGB e de ensaios de interação com LC; setas indicam aumento ou diminuição de EGB na presença de LC em diferentes condições:**

cepas	Sorotipo capsular	Sequence Type	Clonal Complex	Biofilme	Co-cultura	Hela-competição	Hela-exclusão
1	Ia	ST23	CC23	↑	↓	-	-
2	III	ST182	CC19	↑	↓	↓	-
3	V	ST1	CC1	↑	↓	-	-
4	II	ST28	CC19	↑	↓	-	↓
5	III	ST23	CC23	-	-	-	-
6	V	ST1	CC1	-	-	↑	-

#### 4.7 Proteínas do sobrenadante

O primeiro ensaio foi realizado com proteínas do sobrenadante de algumas cepas quando em co-cultura com LC, foram preparados dois géis, em concentração 10% e 15% de poliacrilamida, e as proteínas precipitadas foram diluídas nas proporções 1:2 e 1:10 (Figura 22). Não foram observadas diferenças entre os padrões de banda obtidos, independentemente da presença do LC.



**Figura 22: Géis de poliacrilamida de proteínas precipitadas do sobrenadante dos ensaios de co-cultura. (a) gel a 10%, diluição a 1:2; (b) gel a 15%, diluição a 1:2; (c) gel a 10%, diluição a 1:10; (d) gel a 15%, diluição a 1:10. M: marcador de peso molecular (BioRad); bandas rosas de referência representam 25kDa e 75kDa.**

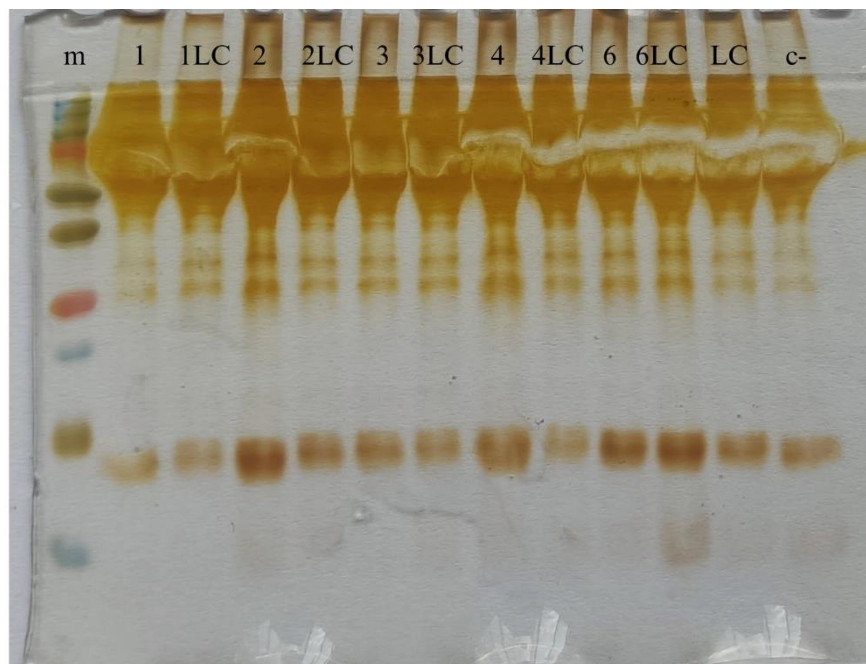
Também foram obtidos os sobrenadantes dos ensaios de competição em células Hela. Foram preparados géis em duas concentrações diferentes, e duas diluições diferentes das proteínas extraídas, assim como anteriormente. Os géis a 10% de poliacrilamida provavelmente foram incubados tempo além do necessário em solução reveladora, o que explica a aparência “estourada” de algumas bandas de maior peso molecular. A diluição mais adequada para observação dos padrões em gel foi a de 1:10, e a melhor concentração de gel utilizada foi a de 15%. Apesar disso, não foi observada a ou ausência de bandas entre as diferentes condições.

A cultura de células é feita com meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino, e os sobrenadantes obtidos dos ensaios de competição também consistiam neste meio de cultura. Por isso, levantou-se a hipótese de que o padrão observado nos géis poderia ser devido à presença do soro fetal bovino, que possui elevada concentração de proteínas. Por esse motivo, todos os ensaios de competição foram repetidos, dessa vez com meio DMEM sem nenhuma suplementação. Como visualizado nos géis anteriores, foram utilizadas as condições



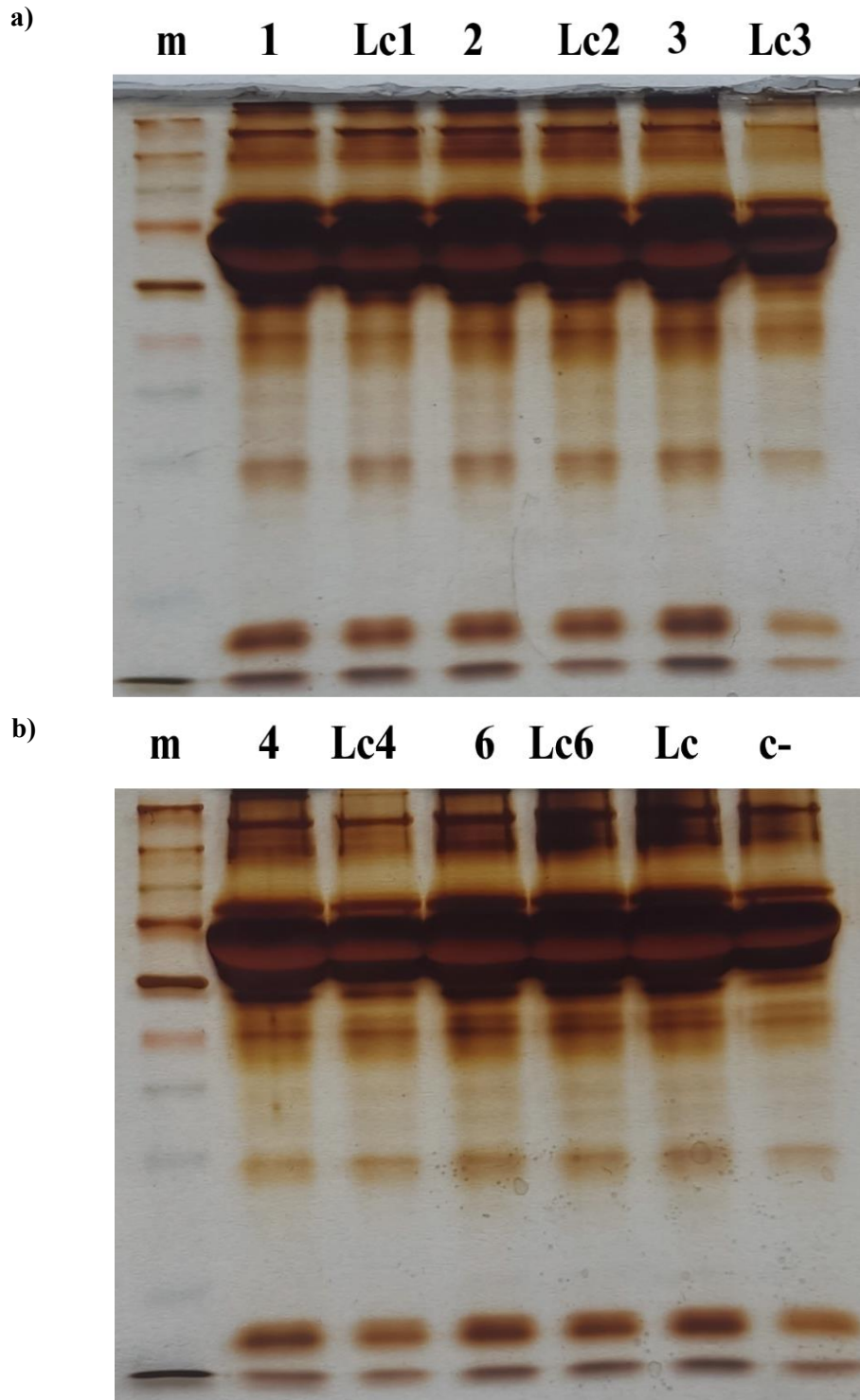
consideradas ideais: gel de poliacrilamida a 15%, concentração de proteínas precipitadas a 1:2. Mesmo assim, não foram observadas diferenças significativas nos padrões de bandas (Figura 23).

Foram observadas algumas diferenças nas intensidades de bandas entre as diferentes condições e cepas, contudo, por não ter sido realizada a padronização da concentração inicial de amostra a ser aplicada em gel, essas diferenças podem ser atribuídas a outros fatores, não correlacionados ao experimento em si.

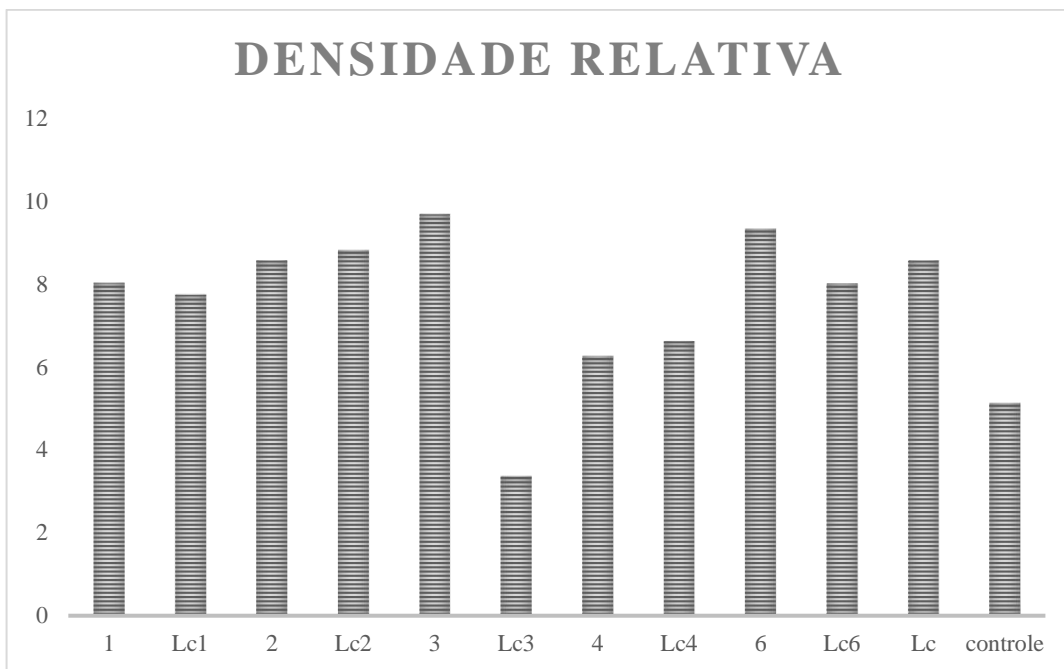


**Figura 23: Gel de poliacrilamida a 15%, proteínas precipitadas diluída a 1:2. M: marcador de peso molecular (BioRad); bandas rosas de referência representam 25kDa e 75kDa.**

O gel realizado após dosagem de proteínas pode ser observado na Figura 24. É possível observar diminuição na intensidade das bandas nas colunas Lc3 e Lc4, quando comparadas às demais. Quando calculada a densidade relativa de uma das bandas, é possível observar que a cepa 3 apresenta densidade relativa menor quando na presença de Lc (Figura 25). Resultados deste gel indicam que há inibição da produção de proteínas dos microrganismos LC e EGB quando cultivados simultaneamente, se comparados às culturas isoladas.



**Figura 24:** Gel de poliacrilamida de proteínas do sobrenadante resultante dos ensaios de competição utilizando células Hela. (a) cepas 1, 2 e 3; (b) cepas 4 e 6 e controles. M: marcador de peso molecular (BioRad); banda superior representa 250kDa e banda inferior representa 10kDa.



**Figura 25:** Valor da densidade relativa de uma das bandas do gel SDS-Page de diferentes amostras

## 5 Discussão

Estudos que avaliam a prevalência de EGB mostram que diferentes sorotipos possuem prevalências variadas, dependendo da localidade), porém, de forma geral, os sorotipos Ia, III e V são os mais prevalentes (ANDRADE *et al.*, 2017; BELARD *et al.*, 2015; BOTELHO *et al.*, 2018; CAMPBELL *et al.*, 2000; DAVIES *et al.*, 2001; GRAY *et al.*, 2011; GRIMWOOD *et al.*, 2002; HÅKANSSON *et al.*, 2008; HICKMAN *et al.*, 2004; IPPOLITO *et al.*, 2010; JONES *et al.*, 2006; KUNZE *et al.*, 2011; LE DOARE *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2010; LIÉBANA-MARTOS *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2014; MADZIVHANDILA *et al.*, 2011; MOYO *et al.*, 2000; NASCIMENTO; TADDEI, 2019; PALMEIRO *et al.*, 2010; ROCCASALVA *et al.*, 2008; SIMOES *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2013; TSOLIA *et al.*, 2003; UH *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2015).

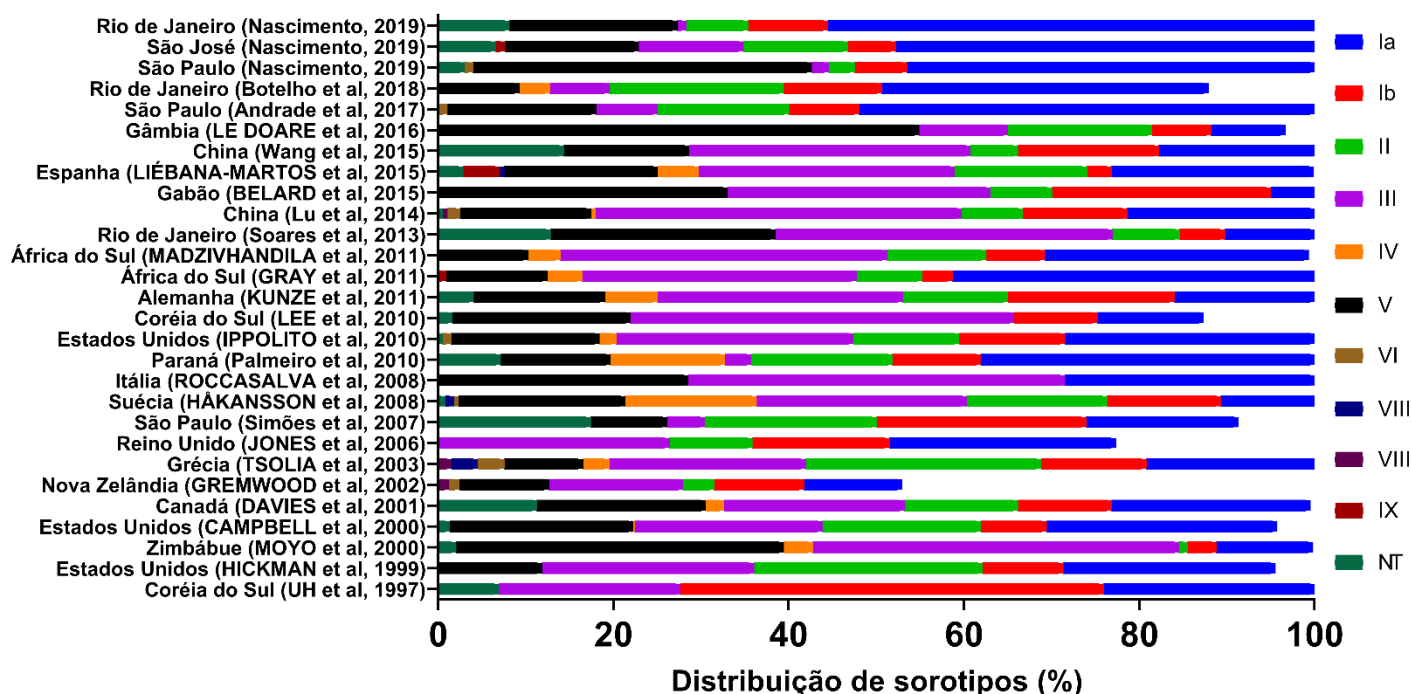


Figura 26: Prevalência de sorotipos capsulares de EGB em diferentes localidades.

As cepas selecionadas no presente estudo pertencem aos sorotipos Ia, II, III e V, sendo assim incluem os sorotipos predominantes. A diferenciação dos sorotipos capsulares de EGB

tem sido uma importante ferramenta epidemiológica, já que diferentes sorotipos estão associados a diferentes patologias (EDMOND *et al.*, 2012; EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011).

O sorotipo III está associado a doenças invasivas, sendo o principal sorotipo isolado em casos de sepse tardia em neonatos (DAMMANN *et al.*, 2022), também é frequentemente associado a casos de meningite (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). Já os sorotipos Ia e V são comumente isolados em casos de doença invasivas em adultos não-gestantes (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). A cápsula é um importante fator de virulência de EGB por mimetizar epítomos do hospedeiro, sendo um significativo recurso na evasão do sistema imunológico, além de interferir com o sistema complemento, afetar a fagocitose de neutrófilos e facilitar a sobrevivência intracelular desses microrganismos (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018).

Neste trabalho, o genótipo dos sorotipos capsulares foi determinado, conforme descrito anteriormente (IMPERI *et al.*, 2010). Além disso, partículas de látex cobertas por anticorpos específicos para cada sorotipo foram aplicadas em teste de aglutinação, garantindo assim que a expressão dos epítomos capsulares corresponde ao encontrado no genoma de cada microrganismo.

Apesar de sua importância, a cápsula não é essencial para que o EGB mantenha seu potencial patogênico, já que este microrganismo possui a capacidade de mudar a conformação de sua cápsula através de um método descrito como *capsular switching* (BELLAIS *et al.*, 2012).

Em artigo publicado por Bellais et al, cepas isoladas de hospitais franceses pertencentes ao *clonal complex* CC17 foram identificadas como sendo cepas dos sorotipos III e IV, contudo, uma intensa caracterização molecular dessas cepas identificou que elas são muito próximas geneticamente, sendo a cápsula o único fator que as diferenciava (BELLAIS *et al.*, 2012). Além disso, a região próxima ao *locus cps* (codificante da cápsula de polissacarídeos), tem muitos pontos de recombinação (BELLAIS *et al.*, 2012). Sendo assim, o sorotipo capsular é insuficiente para presumir o comportamento de um microrganismo, por isso muitos resultados deste trabalho são divergentes entre cepas do mesmo sorotipo, ou semelhantes entre cepas de sorotipos diferentes.

Para este projeto foram construídas curvas de crescimento de 8h (T0 a T8), e as cepas selecionadas mostram que a fase estacionária ocorre após 3h (cepas 1, 3, 5 e 6) e 4h (cepa 2). Com exceção de um estudo publicado em 1987, com cultura de EGB em líquido amniótico e crescimento constante até 24h após incubação (HOSKINS *et al.*, 1987), a curva de crescimento de EGB atinge fase estacionária entre 3h e 6h, como no presente estudo, corroborando dados

previamente publicados (LIN *et al.*, 2017; SULLIVAN; GOH; ULETT, 2021; TORRES *et al.*, 2021). De forma geral, a curva de crescimento foi convergente entre os sorotipos, com exceção da cepa 4, do sorotipo II.

Em uma revisão sistemática, o sorotipo II foi isolado em 19% dos casos de colonização materna por EGB na América do Sul e em 12% dos casos de colonização materna totais, sendo o quarto sorotipo mais prevalente em casos de colonização (BIANCHI-JASSIR *et al.*, 2020); já em casos de doenças maternas invasivas, foi isolado em 13% do total de amostras, em neonatos, foi isolado em 7% dos casos de doença precoce e 1% dos casos de doença tardia (BIANCHI-JASSIR *et al.*, 2020). É um sorotipo que pode estar presente em casos patológicos, mas é mais associado à colonização do que a doenças invasivas. A curva de crescimento construída neste trabalho pode indicar que uma das explicações para sua baixa competitividade em doenças invasivas seja seu lento crescimento. Contudo, apenas uma cepa pertencente ao sorotipo II foi utilizada neste estudo, futuras pesquisas utilizando mais cepas poderão elucidar a curva de crescimento do sorotipo II.

O *Multi-Locus Sequence Typing (MLST)* das cepas de EGB deste estudo as classificou em três *Clonal Complexes (CCs)* e quatro *Sequence Types (STs)*. O MLST avalia sete genes *housekeeping*, sendo que cada gene possui entre quatro e onze alelos, permitindo a classificação de  $4.4 \times 10^5$  genótipos diferentes de EGB (JONES *et al.*, 2003). As cepas deste estudo pertencem ao CC1, CC19 e CC23, o que é esperado pois, de acordo com a literatura, a maioria das cepas de EGB isoladas de amostras humanas pertencem ao CC1, CC10, CC17, CC19, CC23 e CC26 (MOTALLEBIRAD *et al.*, 2021; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). Um dos clones mais associado a doenças invasivas é o CC17 (BELLAIS *et al.*, 2012; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018), que não foi encontrado entre as cepas aqui estudadas.

Assim como a classificação de microrganismos em sorotipos capsulares, a distribuição geográfica de STs e CCs é variada, tal qual sua patogenicidade (BIANCHI-JASSIR *et al.*, 2020; MOTALLEBIRAD *et al.*, 2021; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). A análise de 30 cepas de *Streptococcus* do Grupo B resistentes à eritromicina mostrou que a maior parte desses isolados pertence ao CC19 (MOTALLEBIRAD *et al.*, 2021), neste estudo duas cepas foram atribuídas ao CC19, sendo que uma delas é resistente à eritromicina, a cepa 2, pertencente ao sorotipo III e ao ST182.

Estudos anteriores mostraram que a resistência a eritromicina varia entre 4% a 14% das cepas de EGB isoladas no Brasil (NASCIMENTO *et al.*, 2019). A eritromicina é um antibiótico pertencente à classe dos Macrolídeos, cuja ação envolve interação com a subunidade 50S do

ribossomo bacteriano (HAYES; O'HALLORAN; COTTER, 2020). Alguns dos mecanismos de resistência incluem: modificação do alvo, bomba de efluxo e inativação enzimática (HAYES; O'HALLORAN; COTTER, 2020). A resistência a antimicrobianos sofre constante aumento, por isso é necessário que estudos epidemiológicos de EGB incluam testes de sensibilidade a antimicrobianos. Futuros estudos podem confirmar se cepas pertencentes ao CC19 têm maior tendência à resistência a eritromicina.

A cepa 2 também é resistente à clindamicina, sendo pertencente ao fenótipo iMLS<sub>B</sub>. Significando que a resistência a clindamicina é observada na presença de eritromicina, que liga-se ao alvo no ribossomo, impedindo assim a ação da clindamicina (HAYES; O'HALLORAN; COTTER, 2020). A clindamicina pertence à classe das Lincosamidas, que são estruturalmente distintas dos Macrolídeos, porém têm semelhante mecanismo de ação, interagindo com a subunidade 50S do ribossomo bacteriano (HAYES; O'HALLORAN; COTTER, 2020). Em estudo anterior, tanto a resistência à eritromicina quanto à clindamicina foi encontrada em mais de 20% das cepas avaliadas (NASCIMENTO; TADDEI, 2019). Desta forma deve-se considerar incluir ensaios de resistência a antimicrobianos quando cepas de EGB estão sendo caracterizadas.

Uma revisão sistemática mostrou 17 estudos que realizaram MLST de amostras isoladas de doenças invasivas, e o *clonal complex* mais comum foi o CC1, em 37% das amostras, destas, a maior parte pertence ao sorotipo V (BIANCHI-JASSIR *et al.*, 2020). No atual estudo, foram encontradas duas cepas atribuídas ao CC1, as cepas 3 e 6, ambas pertencentes ao sorotipo V e ST1.

As cepas 1,2 e 3 mostraram aumento da produção de biofilme na presença de LC. Sendo que a cepa 1, pertencente ao sorotipo Ia, apresentou maior produção de biofilme na concentração de LC a 50%, com subsequente diminuição de biofilme quando a concentração de LC foi aumentada para 90%. Já a cepa 2, pertencente ao sorotipo III, apresentou maior formação de biofilme quando na presença de LC a 90%, sendo maior que a produção isoladamente. A cepa 3, pertencente ao sorotipo V, também apresentou a maior formação de biofilme na presença de LC a 90%, sendo significativamente maior do que a produção na presença de LC a 50% e quando considerado isoladamente. Por fim, a única cepa pertencente ao sorotipo II, a cepa 4, apresentou maior formação de biofilme quando na presença de LC a 50%, sendo maior do que a produção de biofilme isoladamente.

Quando foi feita a comparação entre pares de cepas, produção de biofilme da cepa 3 na presença de LC, na concentração 1:1, foi significativamente diferente da maioria das outras, o

que indica que há uma maior influência do *L. crispatus* na produção de biofilme desta cepa específica, o que pode explicar seu perfil encontrado em amostras clínicas. Contudo, essa influência é concentração-dependente, pois o aumento da concentração de LC leva à diminuição da diferença na produção de biofilme entre a cepa 3 e as demais.

A formação de biofilme pelo EGB está associada à cápsula de polissacarídeos e à presença de ilha de pili 2a (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018), e *cylE* (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2023); sendo que todas as cepas investigadas possuem estes genes de virulência, é esperado que sejam eficientes produtoras de biofilme. Nie *et al* demonstrou que a deficiência em CRISPR prejudica a capacidade do EGB de aderir, invadir e produzir biofilme, sendo assim o gene CRISPR está também envolvido na formação de biofilme de EGB (NIE *et al.*, 2022).

No presente trabalho, foi investigada a presença do *locus* CRISPR1, o produto de PCR desse *locus* foi utilizado na reação RFLP entre as cepas. Este fragmento foi amplificado em todas as cepas, e a reação de RFLP indicou maior similaridade entre as cepas 2 (sorotipo III, ST182, CC19) e 5 (sorotipo III, ST23, CC23). Destas, somente a cepa 2 apresentou diferença significativa na formação de biofilme isoladamente ou na presença de LC, contudo essa diferença foi concentração-dependente. Portanto, além da presença do gene CRISPR, este estudo levanta a hipótese que sua sequência também esteja envolvida na formação de biofilme pelas cepas de EGB.

Duas cepas apresentaram maior formação de biofilme na presença de LC a 50% e duas apresentaram maior formação de biofilme na presença de LC a 90%. Sendo que os resultados observados independem do sorotipo capsular, do *sequence type* e do *clonal complex* das cepas estudadas. Estudos futuros deverão determinar quais são os mecanismos pelos quais *L. crispatus* leva ao aumento da produção de biofilme de EGB.

O biofilme é um recurso que facilita o estabelecimento de uma comunidade microbiana um determinado sítio (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). Um estudo com 21 cepas de EGB as classificou entre fracas, moderadas ou fortes formadoras de biofilme, e associou a capacidade de formação de biofilme a determinados genes de virulência, sendo *cfb*, *cylE*, *lmp*, *bca*, *rib* e *bac* (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2023). As cepas investigadas pelo estudo citado possuem ao menos dois dos cinco genes investigados, sendo que a maior parte possui quatro destes (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2023). Para este estudo, apenas o gene *cylE* foi investigado, e estava presente em todas as cepas. Futuros estudos podem investigar a presença de outros fatores de virulência, não somente para compreensão das cepas, mas principalmente



para entender quais fatores no seu genoma a tornam mais ou menos susceptíveis à ação do *L. crispatus*.

Já a cepa 6 apresentou maior adesão a células Hela nos ensaios de competição quando na presença de LC. A adesão a células epiteliais é um fator essencial para o estabelecimento da colonização da microbiota vaginal (JIANG; WESSELS, 2014), o aumento da adesão da cepa 6 a células epiteliais na presença de LC pode implicar em uma resposta desse patógeno à presença de microrganismos comensais. Pesquisas futuras com cepas semelhantes à cepa 6 poderiam confirmar essa hipótese. Além disso, apesar de não ser o mais prevalente em doenças invasivas, o CC1 teve maior associação à morte fetal (LE GALLOU *et al.*, 2023); as cepas desse estudo pertencentes ao CC1 tiveram resposta de formação de biofilme e de adesão a células epiteliais, logo, nossos estudos *in vitro* podem fornecer argumentos válidos para compreensão do perfil clínico desses microrganismos.

Tanto a presença de *L. crispatus* nos ensaios de competição, quanto o pré-tratamento de células Hela com *L. crispatus* nos ensaios de exclusão foram eficientes para diminuir a adesão da cepa 2 às células. A cepa 2 pertence ao sorotipo III e aos ST28 e CC19. Conforme discutido, o sorotipo III está associado a cepas isoladas de doenças invasivas, portanto este trabalho apresenta um importante resultado, propondo a utilização de *L. crispatus* para inibir o estabelecimento da colonização de EGB, pelo que foi observado nos ensaios de exclusão, e para assistir no tratamento de mulheres colonizadas por EGB, de acordo com o que foi observado nos ensaios de competição.

Entre cepas isoladas de colonização materna, os *clonal complexes* mais comuns foram CC19, CC23 e CC1 respectivamente (BIANCHI-JASSIR *et al.*, 2020). No presente estudo, foram encontradas duas cepas pertencentes a cada um dos CCs citados. Apesar de serem cepas associadas à colonização materna, dentre as duas cepas atribuídas ao CC23, uma apresentou aumento na formação de biofilme na presença de LC (cepa 1) e uma apresentou aumento no crescimento quando em co-cultura com LC (cepa 5).

Em um estudo recente realizado na Holanda, o CC23 tem aumentado em casos de infecções em neonatos (JAMROZY *et al.*, 2020). O motivo da recente expansão do CC23 ainda não foi elucidado, o sequenciamento do seu genoma não indica nenhum gene ou variação gênica que explique o cenário clínico (JAMROZY *et al.*, 2020). Por esses motivos são necessários estudos *in vitro* como este, que podem esclarecer o comportamento das cepas, e suas características fenotípicas, indo além do seu genótipo e genoma.

Artigos anteriores demonstraram a alta capacidade de EGB de invadir células Hela, possivelmente provocando sua apoptose (BOONE; BURNHAM; TYRRELL, 2011; BURNHAM; SHOKOPLES; TYRRELL, 2007; DAVIES *et al.*, 2001). Neste trabalho a incubação de EGB com células Hela nos ensaios de competição não resultou em significativa perda de células Hela. Em estudos anteriores (dados não publicados) cepas de EGB foram incubadas com células Hela em período *overnight*, o que resultou na perda quase total dessas células.

Ainda acerca da adesão de EGB a células Hela, Boonsilp et al avaliou cepas pertencentes ao mesmo *sequence type* (ST283) e mesmo sorotipo capsular (III) quanto à sua capacidade de aderir e invadir células epiteliais intestinais (Caco-2) (BOONSILP *et al.*, 2022). Entre as cepas avaliadas, foram encontradas diferentes eficiências de invasão, mesmo sendo cepas tão geneticamente próximas. Os autores concluem que as diferenças fenotípicas observadas podem ser explicados pela expressão gênica, ou por mecanismos ainda não descritos (BOONSILP *et al.*, 2022). O presente estudo observou muitos padrões fenotípicos diferentes entre cepas próximas, por isso são necessários futuros estudos que avaliem a expressão gênica de tais cepas, para acrescentar aos resultados já obtidos de caracterização molecular e fenotípica.

A fim de observar possíveis resultados de diferentes expressões gênica, foram feitos diversos géis de poliacrilamida utilizando proteínas precipitadas do sobrenadante obtido dos ensaios de co-cultura e competição em células. O resultado esperado era de um padrão de bandas diferente entre cepas de EGB isoladamente e na presença de LC, havendo bandas de proteínas presentes ou ausentes em cada condição. Mas os ensaios de *SDS-Page* mostraram que o padrão de expressão de proteínas entre as cepas avaliadas é muito similar, até mesmo quando há envolvimento de células Hela.

Tal resultado pode indicar que a expressão de proteínas no sobrenadante desses organismos é a mesma e futuros estudos poderiam avaliar a diferença na intensidade dessa expressão. Ou também pode indicar que o padrão de bandas é o mesmo, contudo a composição proteica desses sobrenadantes é divergente, já que tal visualização não é possível em gel. Os *Streptococos* do Grupo B têm diversos recursos cuja ativação depende do ambiente em que esse microrganismo se encontra. Como nos exemplos a seguir.

As enzimas superóxido dismutases são um dos maiores mecanismos de defesa de patógenos contra o estresse oxidativo (FLOHÉ; ÖTTING, 1984). Em determinadas condições, como na adição de peróxido de hidrogênio ao meio de cultura, cepas de EGB que possuem essa enzima apresentam maior resiliência; além disso, essas cepas apresentam maior sobrevivência

em infecções de camundongos (POYART *et al.*, 2001). Outro fator, denominado Natural Resistance-Associated Macrophage Protein (NRAMP), que provê resistência a espécies reativas de oxigênio, também foi encontrado em cepas de EGB, e possibilita sua sobrevivência em ambientes de baixo pH (SHABAYEK *et al.*, 2016).

Outro mecanismo importante na resistência ao estresse oxidativo é a enzima NADH peroxidase, cuja expressão aumente significativamente em EGB durante sua internalização em macrófagos, facilitando sua evasão do sistema imunológico (KORIR *et al.*, 2018). A expressão de glutatona, um antioxidante, em modelo animal foi correlacionada positivamente com a sobrevivência de EGB (WALKER *et al.*, 2019). Estes resultados demonstram que o EGB tem a capacidade de alterar a expressão gênica de determinados fatores, a depender das suas condições. Contudo até o presente momento não foram encontrados trabalhos que demonstrem essa capacidade quando em cultivo com cepas de *Lactobacillus*, futuros estudos podem explorar melhor a expressão gênica resultante dessa interação.

Calonghi *et al.* investigou possíveis alterações em células Hela provocadas por determinados microrganismos, entre eles uma cepa de *L. crispatus* (CALONGHI *et al.*, 2017). Nesse estudo a presença de *L. crispatus* tem a capacidade de influenciar a organização, fluidez e permeabilidade da membrana de células Hela, além de ter um efeito na sua produção de espécies reativas de oxigênio. Contudo, essa capacidade é cepa-dependente, uma cepa que provocou aumento na fluidez da membrana, mas não teve influência na expressão de integrinas, outra cepa que aumentou significativamente a expressão de integrinas também alterou a organização da membrana plasmática de células Hela. Apesar dessas diferenças, ambas as cepas mostraram atividade capaz de reduzir a adesão do patógeno *Candida albicans* a células Hela. (CALONGHI *et al.*, 2017). A cepa comercial selecionada para este estudo precisa ser caracterizada em outros aspectos, mas a interação entre *L. crispatus* e células Hela descrita anteriormente poderia explicar os resultados encontrados nos ensaios de competição.

Após o ensaio de exclusão foram observadas diferenças significativas entre o número de células Hela recuperadas da incubação com LC e o controle negativo para a cepa 4, onde houve maior recuperação de células Hela quando pré-tratadas com LC. Levantando a hipótese de que, há interação entre células Hela e *L. crispatus*.

O tratamento prévio das células Hela com LC nos ensaios de exclusão resultou em maior recuperação de células Hela de forma geral, porém esta diferença só foi significativamente diferente para a cepa 4 (sorotipo II, ST28, CC19); no ensaio de competição as cepas 3 e 4 levaram a uma menor recuperação de células Hela, o que não ocorreu no ensaio de exclusão. O

que levanta a hipótese de que EGB, quando entra em contato com células simultaneamente com LC, tem o seu potencial de aderir e invadir células Hela intensificado, porém quando entra em contato com células Hela previamente tratadas com LC esse efeito não é observado. Há proteção de *Lactobacillus* no tecido, como já mostrados em outros ensaios.

Estudos anteriores descrevem a capacidade do *L. crispatus* de aderir a células Hela (ORTIZ *et al.*, 2014; ZÁRATE; NADER-MACIAS, 2006). Houve baixa recuperação de LC após o ensaio de competição, e baixíssima recuperação após o ensaio de exclusão, sendo que em muitos campos a não foram encontrados nenhum LC. O que pode indicar que essa cepa especificamente não tem desempenho de adesão suficiente na incubação prolongada.

Zárate e Nader-Macias foram os primeiros a descrever os ensaios de competição e exclusão utilizados como base para elaboração dos ensaios feitos no presente trabalho (ZÁRATE; NADER-MACIAS, 2006). Os autores utilizaram quatro diferentes espécies de *Lactobacillus* isoladas de swabs vaginais, entre elas uma cepa de *L. crispatus*. Neste estudo de 2006, as cepas de *Lactobacillus* selecionadas demonstraram capacidade de inibir a adesão de EGB em células epiteliais vaginais, sendo que os melhores resultados foram encontrados nos ensaios de competição, contudo os resultados de inibição por *L. crispatus* não foram significativos (ZÁRATE; NADER-MACIAS, 2006).

Outro estudo utilizou ensaios semelhantes, porém não utilizou *L. crispatus*, e sim uma cepa de *L. fermentum* e uma de *L. rhamnosus*, assim como no ensaio descrito anteriormente, foram utilizadas células epiteliais vaginais, obtidas de pacientes (ORTIZ *et al.*, 2014). Os resultados desse estudo foram significativos, sendo que ambas as cepas inibiram a adesão de EGB a células epiteliais vaginais (ORTIZ *et al.*, 2014). Um fator que diferencia os dois estudos descritos previamente e o presente estudo é a utilização de células imortalizadas, o que é uma limitação deste trabalho, futuras pesquisas poderão ser realizadas com outras linhagens celulares ou com células obtidas de voluntárias saudáveis.

## 6 Conclusão

- Os estudos abordados neste trabalho revelam a complexidade da diversidade e do comportamento das cepas de *Streptococcus agalactiae* (EGB) em relação a sorotipos, crescimento, fatores de virulência e interações com outros microrganismos, como o *Lactobacillus crispatus* (LC);
- As cepas de EGB deste estudo foram classificadas em diferentes *clonal complexes* (CCs) e *sequence types* (STs) com base no *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST), e as análises fenotípicas mostraram diferenças entre essas cepas em relação à formação de biofilme, adesão a células epiteliais e interação com LC;
- A interação entre EGB e LC pode ter efeitos variados, como aumento na formação de biofilme, adesão celular e crescimento bacteriano, dependendo das cepas e das concentrações de LC utilizadas;
- A cepa 2, pertencente ao sorotipo III, CC19 e ST182, apresentou a maior vulnerabilidade à ação do *L. crispatus*. Apesar do aumento na formação de biofilme, os ensaios de co-cultura, competição e exclusão mostraram inibição de EGB;
- Apesar de pertencer a diferentes sorotipos capsulares e possuírem diferentes perfis de MLST, as cepas 1 e 3 apresentaram resultados semelhantes de interação com *L. crispatus*. Sendo que houve aumento na formação de biofilme, mas inibição do crescimento em co-cultura e diminuição da adesão em ensaios de exclusão;
- Ao contrário do esperado, a cepa utilizada de LC inibiu o EGB em alguns dos ensaios, porém, também levou ao aumento de sua infecciosidade. Estudos futuros de transcriptoma de EGB poderão elucidar quais respostas estão sendo ativadas na presença de microrganismos comensais, como o *L. crispatus*;
- Este estudo destaca a diversidade e complexidade das cepas de EGB, enfatizando a importância de avaliar não apenas o sorotipo capsular, mas também fatores fenotípicos e genéticos na compreensão da patogenicidade desse microrganismo. Além disso, há a necessidade de investigar mais a fundo as interações entre EGB e LC;
- Os resultados apresentados sugerem que a ação do EGB depende da microbiota vaginal do hospedeiro.

## 7 Referências

- ANDRADE, P. D.; RUSSO, J. de S.; GOUVEIA, J. B.; COSTA, C. R. C.; OLIVEIRA, K. G.; GIANETTI, M.; ANJOS, E. B. V.; PAVAN, T. B. S.; MARTINS, M. F. D. S.; FRANCO, J.; COSTA, M. L.; NOMURA, M. L.; LEVY, C. E.; PASSINI JÚNIOR, R.; COSTA, S. C. B. Molecular Characterization of Group B Streptococcus Serotypes By Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Medical Express**, v. 4, n. 4, p. 6–8, 2017. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/MedicalExpress.2017.04.06>>.
- ARGENTINI, C.; FONTANA, F.; ALESSANDRI, G.; LUGLI, G. A.; MANCABELLI, L.; OSSIPRANDI, M. C.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M.; MILANI, C.; TURRONI, F. Evaluation of Modulatory Activities of Lactobacillus crispatus Strains in the Context of the Vaginal Microbiota. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, 2022.
- ARMISTEAD, B.; OLER, E.; WALDORF, K. A. The Double Life of Group B Streptococcus : Asymptomatic Colonizer and Potent Pathogen. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 16, p. 2914–2931, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.01.035>>.
- BALASUBRAMANIAN, N.; POUNPANDI, P.; VARATHARAJU, G.; SHANMUGAIAH, V.; BALAKRISHNAN, K.; THIRUNARAYAN, M. A. Distribution of virulence genes and biofilm characterization of human isolates of Streptococcus agalactiae: A pilot study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 223, n. September 2022, p. 113151, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113151>>.
- BEAURUELLE, C.; PASTUSZKA, A.; MEREGHETTI, L.; LANOTTE, P. Group b streptococcus vaginal carriage in pregnant women as deciphered by clustered regularly interspaced short palindromic repeat analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 6, 2018.
- BELARD, S.; TOEPFNER, N.; CAPAN-MELSER, M.; MOMBO-NGOMA, G.; ZOLEKOMANEGO, R.; GROGER, M.; MATSIEGUI, P. B.; AGNANDJI, S. T.; ADEGNIKA, A. A.; GONZÁLEZ, R.; KREMSNER, P. G.; MENENDEZ, C.; RAMHARTER, M.; BERNER, R. Streptococcus agalactiae Serotype Distribution and Antimicrobial Susceptibility in Pregnant Women in Gabon, Central Africa. **Scientific Reports**, v. 5, n. November, p. 8–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep17281>>.
- BELLAIS, S.; SIX, A.; FOUET, A.; LONGO, M.; DMYTRUK, N.; GLASER, P.; TRIEU-

CUOT, P.; POYART, C. 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.

BIANCHI-JASSIR, F.; PAUL, P.; TO, K. N.; CARRERAS-ABAD, C.; SEALE, A. C.; JAUNEIKAITE, E.; MADHI, S. A.; RUSSELL, N. J.; HALL, J.; MADRID, L.; BASSAT, Q.; KWATRA, G.; LE DOARE, K.; LAWN, J. E. Systematic review of Group B Streptococcal capsular types, sequence types and surface proteins as potential vaccine candidates. **Vaccine**, v. 38, n. 43, p. 6682–6694, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.08.052>>.

BONIN, M. C. B.; PENTEADO, A. L.; QUEIROZ, S. C. do N. Avaliação da atividade antagonista de bactérias ácido lácticas e seus metabólitos frente a patógenos de origem animal. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 18511–18525, 2019.

BOONE, T. J.; BURNHAM, C. A. D.; TYRRELL, G. J. Binding of group B streptococcal phosphoglycerate kinase to plasminogen and actin. **Microbial Pathogenesis**, v. 51, n. 4, p. 255–261, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2011.06.005>>.

BOONSILP, S.; NEALIGA, M. J.; WANGCHUK, K.; HOMKAEW, A.; WONGSUK, T.; THUNCHAROON, H.; SUKSOMCHIT, P.; WASIPRAPHAI, D.; CHATURONGAKUL, S.; DUBBS, P. Differential Interaction between Invasive Thai Group B Streptococcus Sequence Type 283 and Caco-2 Cells. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, 2022.

BOTELHO, A. C. N.; OLIVEIRA, J. G.; DAMASCO, A. P.; SANTOS, K. T. B.; FERREIRA, A. F. M.; ROCHA, G. T.; MARINHO, P. S.; BORNIA, R. B. G.; PINTO, T. C. A.; AMÉRICO, M. A.; FRACALANZZA, S. E. L.; TEIXEIRA, L. M. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29750801>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5947911>.

BRCAST. **Guia-Leitura-Disco-Difusão-BrCAST-03-2016.pdf**2016.

BURNHAM, C. D.; SHOKOPLES, S. E.; TYRRELL, G. J. Rac1 , RhoA , and Cdc42 participate in HeLa cell invasion by group B streptococcus. v. 272, p. 8–14, 2007.

CAJULAO, J. M.; CHEN, L. Lactobacillus rhamnosus reduces the cytotoxic effects of group

B streptococcus on HeLa cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 161, n. PA, p. 105271, 2021.  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105271>>.

CALONGHI, N.; PAROLIN, C.; SARTOR, G.; VERARDI, L.; GIORDANI, B.; FRISCO, G.; MARANGONI, A.; VITALI, B. Interaction of vaginal Lactobacillus strains with HeLa cells plasma membrane. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 4, p. 625–633, 24 ago. 2017.  
Disponível em: <<https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/BM2016.0212>>.

CAMPBELL, J. R.; HILLIER, S. L.; KROHN, M. A.; FERRIERI, P.; ZALEZNIK, D. F.; BAKER, C. J. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. **Obstetrics and Gynecology**, v. 96, n. 4, p. 498–503, out. 2000.  
Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0029784400009777>>.

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

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

CHEE, W. J. Y.; CHEW, S. Y.; THIAN, L.; THAN, L. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. **Microbial Cell Factories**, p. 1–24, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01464-4>>.

CHEN, X.; XU, J.; SHUAI, J.; CHEN, J.; ZHANG, Z.; FANG, W. The S-layer proteins of Lactobacillus crispatus strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 307–312, 2007.

CHOI, Y.; HAN, H. S.; CHONG, G. O.; LE, T. M.; NGUYEN, H. D. T.; LEE, O. E. M.; LEE, D.; SEONG, W. J.; SEO, I.; CHA, H. H. Updates on Group B Streptococcus Infection in the Field of Obstetrics and Gynecology. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, 2022.

CHOPRA, C.; BHUSHAN, I.; MEHTA, M.; KOUSHAL, T.; GUPTA, A.; SHARMA, S.; KUMAR, M.; KHODOR, S. Al; SHARMA, S. Vaginal microbiome: considerations for reproductive health. **Future microbiology**, v. 17, p. 1501–1513, 2022. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36314380>>.

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.

CRISTINA, D.; SILVA, S.; FLÁVIA, A.; FERREIRA, M.; LEAL, A.; MARIA, L.; OLIVEIRA, A.; MARIA, A.; BOTELHO, N.; BOTELHO, C. N.; MARIE, A.; FIGUEIREDO, S.; LONGO, S. E.; TEIXEIRA, L. M.; CASTRO, T.; PINTO, A.; LEAL, A.; MARIA, L.; OLIVEIRA, A.; MARIA, A.; BOTELHO, N.; NUNES, A. C.; MARIE, A.; FIGUEIREDO, S.; EDUARDO, S.; FRACALANZZA, L.; TEIXEIRA, L. M.; CRISTINA, D.; SILVA, S.; FL, A.; MARIA, L.; OLIVEIRA, A.; MARIA, A.; BOTELHO, N.; CAROLINE, A.; BOTELHO, N.; S, A. M. Biofilm production and distribution of pilus variants among *Streptococcus agalactiae* isolated from human and animal sources *agalactiae* isolated from human and animal sources. **Biofouling**, v. 35, n. 8, p. 938–944, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1678592>>.

DAMMANN, A. N.; CHAMBY, A. B.; GONZALEZ, F. J.; SHARP, M. E.; FLORES, K.; SHAHI, I.; DONGAS, S.; HOOVEN, T. A.; RATNER, A. J. Group B Streptococcus Capsular Serotype Alters Vaginal Colonization Fitness. **Journal of Infectious Diseases**, v. 225, n. 11, p. 1896–1904, 2022.

DAVIES, H. D.; ADAIR, C.; MCGEER, A.; MA, D.; ROBERTSON, S.; MUCENSKI, M.; KOWALSKY, L.; TYRELL, G.; BAKER, C. J. 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.

DIMOV, S.; KIRILOV, N.; PEYKOV, S.; IVANOVA, I. Growth characteristics of twenty lactobacillus delbrueckii strains isolated from bulgarian home made yoghurts. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 21, n. 2, p. 172–176, 2007.

EDMOND, K. M.; KORTSALIOUDAKI, C.; SCOTT, S.; SCHRAG, S. J.; ZAIDI, A. K.; COUSENS, S.; HEATH, P. T. 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. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61651-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61651-6)>.

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.; KLEIN, J. O.; DALY, A. K.; INGAL, D.; FINLAND, M. 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.

FALAGAS, M. E.; BETSI, G. I.; ATHANASIOU, S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 7, p. 657–664, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01688.x>>.

FILKINS, L.; HAUSER, J.; ROBINSON-DUNN, B.; TIBBETTS, R.; BOYANTON, B. Guidelines for the Detection and Identification of Group B Streptococcus. **American Society for Microbiology**, n. Ccm, 2020. Disponível em: <<https://asm.org/ASM/media/Policy-and-Advocacy/images/ASM-GBS-guideline-031020.pdf?ext=.pdf>>.

FLOHÉ, L.; ÖTTING, F. [10] Superoxide dismutase assays. *In: Methods*. [s.l: s.n.]p. 93–104.

FRANCE, M.; ALIZADEH, M.; BROWN, S.; MA, B.; RAVEL, J. Towards a deeper understanding of the vaginal microbiota. **Nature Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 367–378, 2022.

GODHA, K.; TUCKER, K. M.; BIEHL, C.; ARCHER, D. F.; MIRKIN, S. Human vaginal pH and microbiota: an update. **Gynecological Endocrinology**, v. 34, n. 6, p. 451–455, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1407753>>.

GRAY, K. J.; KAFULAFULA, G.; MATEMBA, M.; KAMDOLZI, M.; MEMBE, G.; FRENCH, N. Group B Streptococcus and HIV infection in pregnant women, Malawi, 2008–2010. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1932–5, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3310663&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GRIMWOOD, K.; STONE, P. R.; GOSLING, I. A.; GREEN, R.; DARLOW, B. A.; LENNON, D. R.; MARTIN, D. R. Late antenatal carriage of group B Streptococcus by New Zealand women. p. 182–186, 2002.

HÅKANSSON, S.; AXEMO, P.; BREMME, K.; BRYNGELSSON, A.-L.; CARLSSON WALLIN, M.; EKSTRÖM, C.-M.; GRANLUND, M.; JACOBSSON, B.; KÄLLÉN, K.; SPETZ, E.; TESSIN, I.; SWEDISH WORKING GROUP FOR THE PREVE. Group B streptococcal carriage in Sweden: a national study on risk factors for mother and infant colonisation. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, 2008.

HANSON, L.; VANDEVUSSE, L.; DUSTER, M.; WARRACK, S.; SAFDAR, N. Feasibility of oral prenatal probiotics against maternal group B streptococcus vaginal and rectal

colonization. **JOGNN - Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing**, v. 43, n. 3, p. 294–304, 2014.

HANSON, L.; VANDEVUSSE, L.; FORGIE, M.; MALLOY, E.; SINGH, M.; SCHERER, M. A.; KLEBER, D.; DIXON, J.; HRYCKOWIAN, A. J.; SAFDAR, N. A randomized controlled trial of an oral probiotic to reduce antepartum group B Streptococcus colonization and gastrointestinal symptoms. **American Journal of Obstetrics and Gynecology MF**, v. 5, n. 1, p. 100748, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2022.100748>>.

HAYES, K.; O'HALLORAN, F.; COTTER, L. A review of antibiotic resistance in Group B Streptococcus: the story so far. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 253–269, 3 maio 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1758626>>.

HE, Y.; NIU, X.; WANG, B.; NA, R.; XIAO, B.; YANG, H. Evaluation of the Inhibitory Effects of Lactobacillus gasseri and Lactobacillus crispatus on the Adhesion of Seven Common Lower Genital Tract Infection-Causing Pathogens to Vaginal Epithelial Cells. **Frontiers in Medicine**, v. 7, n. June, p. 1–8, 2020.

HENSLER, M. E.; QUACH, D.; HSIEH, C. J.; DORAN, K. S.; NIZET, V. CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B Streptococcus. **Microbial Pathogenesis**, v. 44, n. 1, p. 84–88, 2008.

HICKMAN, M. E.; RENCH, M. A.; FERRIERI, P.; BAKER, C. J. Changing Epidemiology of Group B Streptococcal Colonization. **Pediatrics**, v. 104, n. 2, p. 203–209, 2004.

HO, M.; CHANG, Y. Y.; CHANG, W. C.; LIN, H. C.; WANG, M. H.; LIN, W. C.; CHIU, T. H. Oral Lactobacillus rhamnosus GR-1 and Lactobacillus reuteri RC-14 to reduce Group B Streptococcus colonization in pregnant women: A randomized controlled trial. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 55, n. 4, p. 515–518, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tjog.2016.06.003>>.

HOSKINS, I. A.; HEMMING, V. G.; JOHNSON, T. R. B.; WINKEL, C. A. Effects of alterations of zinc-to-phosphorus ratios and meconium content on Group B Streptococcus growth in human amniotic fluid in vitro. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 157, n. 3, p. 770–773, 1987. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9378\(87\)80047-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9378(87)80047-9)>.

IMPERI, M.; PATARACCHIA, M.; ALFARONE, G.; BALDASSARRI, L.; OREFICI, G.;

CRETI, R. 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.; JAMES, W. A.; TINNEMORE, D.; HUANG, R. R.; DEHART, M. J.; WILLIAMS, J.; WINGERD, M. A.; DEMONS, S. T. 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.

JAMROZY, D.; BIJLSMA, M. W.; DE GOFFAU, M. C.; VAN DE BEEK, D.; KUIJPERS, T. W.; PARKHILL, J.; VAN DER ENDE, A.; BENTLEY, S. D. Increasing incidence of group B streptococcus neonatal infections in the Netherlands is associated with clonal expansion of CC17 and CC23. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

JIANG, S.; WESSELS, M. R. BsaB, a novel adherence factor of group B *Streptococcus*. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1007–1016, 2014.

JOLLEY, K. A.; BRAY, J. E.; MAIDEN, M. C. J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; referees: 2 approved]. **Wellcome Open Research**, v. 3, n. 0, p. 1–20, 2018.

JONES, N.; BOHNSACK, J. F.; TAKAHASHI, S.; OLIVER, K. A.; CHAN, M.-S.; KUNST, F.; GLASER, P.; RUSNIOK, C.; CROOK, D. W. M.; HARDING, R. M.; BISHARAT, N.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2530–6, jun. 2003. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L36712464%0Ahttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=00951137&id=doi:&atitle=Multilocus+sequence+typing+system+for+group+B+streptococcus&stitle=J.+Clin.+Microbiol.&title=Jour>>.

JONES, N.; OLIVER, K.; JONES, Y.; HAINES, A.; CROOK, D. Carriage of group B streptococcus in pregnant women from. **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, n. 4, p. 363–366, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **HISTOLOGIA BÁSICA**. 10a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2004. 488 p.

JURADO, H.; GÚZMAN, M.; JARRÍN, V. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA,

PRUEBAS DE CRECIMIENTO Y EFECTO DE INHIBICIÓN in vitro DE *Lactobacillus casei* EN *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* Y *Escherichia coli*. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, v. 62, p. 40–56, 2015. Disponible em: <<https://www.redalyc.org/pdf/4076/407642416005.pdf>>.

KALIA, N.; SINGH, J.; KAUR, M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: A critical review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1–19, 2020. Disponible em: <<https://doi.org/10.1186/s12941-020-0347-4>>.

KORIR, M. L.; FLAHERTY, R. A.; ROGERS, L. M.; GADDY, J. A.; ARONOFF, D. M.; MANNING, S. D. Investigation of the role that NADH peroxidase plays in oxidative stress survival in group B *Streptococcus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. NOV, p. 1–10, 2018.

KOTHARY, V.; DOSTE NR, R. S.; ROGERS, L. M.; KIRK, L. A.; BOYD, K. L.; ROMANO-KEELER, J.; HALEY, K. P.; MANNING, S. D.; ARONOFF, D. M.; GADDY, J. A. Group B streptococcus induces neutrophil recruitment to gestational tissues and elaboration of extracellular traps and nutritional immunity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–13, 2017.

KUNZE, M.; ZIEGLER, A.; FLUEGGE, K.; HENTSCHEL, R.; PROEMPELER, H.; BERNER, R. Colonization, serotypes and transmission rates of group B streptococci in pregnant women and their infants born at a single University Center in Germany. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 39, n. 4, p. 417–422, 2011.

LARTIGUE, M. F.; HÉRY-ARNAUD, G.; HAGUENOER, E.; DOMELIER, A. S.; SCHMIT, P. O.; VAN DER MEE-MARQUET, N.; LANOTTE, P.; MEREGHETTI, L.; KOSTRZEWA, M.; QUENTIN, R. Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2284–2287, 2009.

LAY, J. O. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, n. 4, p. 172–194, 2001.

LE DOARE, K.; JARJU, S.; DARBOE, S.; WARBURTON, F.; GORRINGE, A.; HEATH, P. T.; KAMPMANN, B. Risk factors for Group B *Streptococcus* colonisation and disease in Gambian women and their infants. **Journal of Infection**, v. 72, n. 3, p. 283–294, 2016. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.12.014>>.

LE GALLOU, B.; PASTUSZKA, A.; LEMAIRE, C.; MEREGHETTI, L.; LANOTTE, P. Group B Streptococcus CRISPR1 Typing of Maternal, Fetal, and Neonatal Infectious Disease Isolates Highlights the Importance of CC1 in In Utero Fetal Death . **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 4, 2023.

LEE, B. K.; SONG, Y. R.; KIM, M. Y.; YANG, J. H.; SHIN, J. H.; SEO, Y. S.; OH, K. Y.; YOON, H. R.; PAI, S. Y.; FOXMAN, B.; KI, M. Epidemiology of group B streptococcus in Korean pregnant women. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 2, p. 292–298, 28 fev. 2010. Disponível em:

2010. Disponível em:

<[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0950268809990859/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0950268809990859/type/journal_article)>.

LIÉBANA-MARTOS, M. D. C.; CABRERA-ALAVARGONZALEZ, J.; RODRÍGUEZ-GRANGER, J.; MIRANDA-CASAS, C.; SAMPEDRO-MARTÍNEZ, A.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, J.; ROSA-FRAILE, M.; NAVARRO-MARÍ, J. M. Serotypes and antibiotic resistance patterns in beta-hemolytic Streptococcus agalactiae isolates in colonized mothers and newborns with invasive disease. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 2, p. 84–88, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.02.023>>.

LIM, S.; RAJAGOPAL, S.; JEONG, Y. R.; NZEGWU, D.; WRIGHT, M. L. Group B Streptococcus and the vaginal microbiome among pregnant women: A systematic review. **PeerJ**, v. 9, p. 1–16, 2021.

LIN, A. E.; AUTRAN, C. A.; SZYSZKA, A.; ESCAJADILLO, T.; HUANG, M.; GODULA, K.; PRUDDEN, A. R.; BOONS, G. J.; LEWIS, A. L.; DORAN, K. S.; NIZET, V.; BODE, L. Human milk oligosaccharides inhibit growth of group B Streptococcus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 27, p. 11243–11249, 2017.

LU, B.; LI, D.; CUI, Y.; SUI, W.; HUANG, L.; LU, X. Epidemiology of Group B streptococcus isolated from pregnant women in Beijing, China. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 6, p. O370–O373, jun. 2014. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14641665>>.

MADZIVHANDILA, M.; ADRIAN, P. V.; CUTLAND, C. L.; KUWANDA, L.; SCHRAG, S. J.; MADHI, S. A. Serotype distribution and invasive potential of group B streptococcus isolates causing disease in infants and colonizing maternal-newborn dyads. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. 2–7, 2011.

MANJU, O.; SMRITI, P.; VENKATESH S., P.; SUJATA, G.; ANURADHA, C. A cytosol derived factor of Group B streptococcus prevent its invasion into human epithelial cells.

**World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 45, 8 mar. 2018.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11274-018-2428-5>>.

MARCONI, C.; EL-ZEIN, M.; RAVEL, J.; MA, B.; LIMA, M. D.; CARVALHO, N. S.;

ALVES, R. R. F.; PARADA, C. M. G. L.; LEITE, S. H. M.; GIRALDO, P. C.;

GONÇALVES, A. K.; FRANCO, E. L.; SILVA, M. G. Characterization of the vaginal

microbiome in women of reproductive age from 5 Regions in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 47, n. 8, p. 562–569, 2020.

MARTÍN, V.; CÁRDENAS, N.; OCAÑA, S.; MARÍN, M.; ARROYO, R.; BELTRÁN, D.;

BADIOLA, C.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, J. M. Rectal and vaginal eradication of streptococcus agalactiae (Gbs) in pregnant women by using lactobacillus salivarius cect 9145, a target-specific probiotic strain. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 1–22, 2019.

MARZIALI, G.; FOSCHI, C.; PAROLIN, C.; VITALI, B.; MARANGONI, A. In-vitro effect

of vaginal lactobacilli against group B Streptococcus. **Microbial Pathogenesis**, v. 136, n. June, p. 103692, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103692>>.

MENDLING, W. Vaginal Microbiota. *In: Microbiota of the Human Body, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Wuppertal , Germany: Springer International Publishing Switzerland 2016, 2016. p. 83–93.

MIKO, E.; BARAKONYI, A. **The Role of Hydrogen-Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Produced by Vaginal Microbiota in Female Reproductive Health**Antioxidants2023.

MOTALLEBIRAD, T.; FAZELI, H.; GHAHIRI, A.; SHOKRI, D.; JALALIFAR, S.;

MOGHIM, S.; ESFAHANI, B. N. Prevalence, population structure, distribution of serotypes, pilus islands and resistance genes among erythromycin-resistant colonizing and invasive Streptococcus agalactiae isolates recovered from pregnant and non-pregnant women in Isfahan, Iran. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1–11, 2021.

MOYO, S. R.; MUDZORI, J.; TSWANA, S. A.; MAELAND, J. A. Prevalence, capsular type distribution, anthropometric and ostetric factors of group B *Streptococcus (Streptococcus agalactiae)* colonization in pregnancy. **Central African Journal of Medicine**, v. 46, n. 5, 1 maio 2000. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/cajm/article/view/8533>>.

- MU, X.; ZHAO, C.; YANG, J.; WEI, X. Group B Streptococcus colonization induces Prevotella and Megaspheera abundance-featured vaginal microbiome compositional change in non-pregnant women. **PeerJ**, v. 7, n. e7474, p. 1–15, 2019.
- NAN, C.; DANGOR, Z.; CUTLAND, C. L.; EDWARDS, M. S.; MADHI, S. A. Maternal group B Streptococcus -related stillbirth : a systematic review. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 122, n. 11, p. 1437–1445, 2015.
- NARDINI, P.; NÃHUI PALOMINO, R. A.; PAROLIN, C.; LAGHI, L.; FOSCHI, C.; CEVENINI, R.; VITALI, B.; MARANGONI, A. Lactobacillus crispatus inhibits the infectivity of Chlamydia trachomatis elementary bodies, in vitro study. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–11, 2016.
- NASCIMENTO, C. S.; SANTOS, N. F. B.; FERREIRA, R. C. C.; TADDEI, C. R. Streptococcus agalactiae in pregnant women in Brazil : prevalence , serotypes , and antibiotic resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 943–952, 2019.
- NASCIMENTO, C. S.; TADDEI, C. **Streptococcus agalactiae - Distribuição sorotípica e relação com fatores de virulência e resistência antimicrobiana Cilícia**. 2019. Universidade de São Paulo (USP), 2019.
- NIE, M.; DONG, Y.; CAO, Q.; ZHAO, D.; JI, S.; HUANG, H.; JIANG, M.; LIU, G.; LIU, Y. CRISPR Contributes to Adhesion , Invasion , and Bio fi lm Formation in Streptococcus agalactiae by Repressing. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2022.
- OLSEN, P.; WILLIAMSON, M.; TRAYNOR, V.; GEORGIU, C. The impact of oral probiotics on vaginal Group B Streptococcal colonisation rates in pregnant women: A pilot randomised control study. **Women and Birth**, v. 31, n. 1, p. 31–37, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wombi.2017.06.012>>.
- ORTIZ, L.; RUIZ, F.; PASCUAL, L.; BARBERIS, L. Effect of two probiotic strains of Lactobacillus on in vitro adherence of listeria monocytogenes, Streptococcus agalactiae, and Staphylococcus aureus to vaginal epithelial cells. **Current Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 679–684, 2014.
- OTAGUIRI, E. S.; MORGUETTE, A. E. B.; TAVARES, E. R.; DOS SANTOS, P. M. C.; MOREY, A. T.; CARDOSO, J. D.; PERUGINI, M. R. E.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. 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.

PALMEIRO, J. K.; DALLA-COSTA, L. M.; FRACALANZZA, S. E. L.; BOTELHO, A. C. N.; DA SILVA NOGUEIRA, K.; SCHEFFER, M. C.; DE ALMEIDA TORRES, R. S. L.; DE CARVALHO, N. S.; COGO, L. L.; MADEIRA, H. M. F. Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in Southern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4397–4403, 2010.

PAOLETTI, L. C.; ROSS, R. A.; JOHNSON, K. D. Cell growth rate regulates expression of group B Streptococcus type III capsular polysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 4, p. 1220–1226, 1996.

PATRAS, K. A.; NIZET, V. Group B Streptococcal Maternal Colonization and Neonatal Disease: Molecular Mechanisms and Preventative Approaches. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, n. February, p. 1–17, 2018. Disponível em:  
<<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fped.2018.00027/full>>.

POYART, C.; PELLEGRINI, E.; GAILLOT, O.; BOUMAILA, C.; BAPTISTA, M.; TRIEU-CUOT, P. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of Streptococcus agalactiae. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 5098–5106, 2001.

RAABE, V. N.; SHANE, A. L. Group b streptococcus (streptococcus agalactiae). **Gram-Positive Pathogens**, n. 11, p. 228–238, 2019.

RAVEL, J.; GAJER, P.; ABDO, Z.; SCHNEIDER, G. M.; KOENIG, S. S. K.; MCCULLE, S. L.; KARLEBACH, S.; GORLE, R.; RUSSELL, J.; TACKET, C. O.; BROTMAN, R. M.; DAVIS, C. C.; AULT, K.; PERALTA, L.; FORNEY, L. J. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. SUPPL. 1, p. 4680–4687, 2011.

RAZZAK, M. S. A.; AL-CHARRAKH, A. H.; AL-GREITTY, B. H. Relationship between lactobacilli and opportunistic bacterial pathogens associated with vaginitis. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 185–192, 2011.

ROCCASALVA, L. S.; GIUMMARRA, V.; VALENTI, O.; SCUDERI, M. C.; FURNERI, P. M. Isolamento e caratterizzazione di Streptococcus agalactiae in donne gravide. **Giornale italiano di ostetricia e ginecologia**, v. 30, n. 10, p. 301–306, 2008. Disponível em:

<<http://www.giog.it/common/php/portiere.php?ID=d764eeb2fe2b993c7107ff6cc65514ea>>.

ROESCH, L. F. W.; SILVEIRA, R. C.; CORSO, A. L.; DOBBLER, P. T.; MAI, V.; ROJAS, B. S.; LAUREANO, Á. M.; PROCIANOY, R. S. Diversity and composition of vaginal microbiota of pregnant women at risk for transmitting Group B Streptococcus treated with intrapartum penicillin. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–13, 2017.

ROSEN, G. H.; RANDIS, T. M.; DESAI, P. V.; SAPRA, K. J.; MA, B.; GAJER, P.; HUMPHRYS, M. S.; RAVEL, J.; GELBER, S. E.; RATNER, A. J. Group B Streptococcus and the Vaginal Microbiota. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 6, p. 744–751, 2017.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory Manual**. [s.l.: s.n.]v. 3999 p.

SARAF, V. S.; SHEIKH, S. A.; AHMAD, A.; GILLEVET, P. M.; BOKHARI, H.; JAVED, S. Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 7, p. 3793–3802, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02414-3>>.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SEALE, A. C.; BLENCOWE, H.; BIANCHI-JASSIR, F.; EMBLETON, N.; BASSAT, Q.; ORDI, J.; MENCROSSED, C.; CUTLAND, C.; BRINER, C.; BERKLEY, J. A.; LAWN, J. E.; BAKER, C. J.; BARTLETT, L.; GRAVETT, M. G.; HEATH, P. T.; IP, M.; LE DOARE, K.; RUBENS, C. E.; SAHA, S. K.; SCHRAG, S.; MEULEN, A. S. Ter; VEKEMANS, J.; MADHI, S. A. Stillbirth with Group B Streptococcus Disease Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. Suppl 2, p. S125–S132, 2017.

SHABAYEK, S.; BAUER, R.; MAUERER, S.; MIZAIKOFF, B.; SPELLERBERG, B. A streptococcal NRAMP homologue is crucial for the survival of Streptococcus agalactiae under low pH conditions. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 4, p. 589–606, 2016.

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. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00437/full>>.

SHARPE, M.; SHAH, V.; FREIRE-LIZAMA, T.; CATES, E. C.; MCGRATH, K.; DAVID, I.; COWAN, S.; LETKEMAN, J.; STEWART-WILSON, E. Effectiveness of oral intake of Lactobacillus rhamnosus GR-1 and Lactobacillus reuteri RC-14 on Group B Streptococcus

colonization during pregnancy: a midwifery-led double-blind randomized controlled pilot trial. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 7058, 2019.

SHIRODA, M.; ARONOFF, D. M.; GADDY, J. A.; MANNING, S. D. The impact of Lactobacillus on group B streptococcal interactions with cells of the extraplacental membranes. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, n. August, p. 104463, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104463>>.

SIMOES, J. A.; ALVES, V. M. N.; FRACALANZZA, S. E. L.; DE CAMARGO, R. P. S.; MATHIAS, L.; MILANEZ, H. M. B. P.; BROLAZO, E. M. 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.

SLEYTR, U. B.; MESSNER, P.; PUM, D.; SÁRA, M. Crystalline bacterial cell surface layers. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 911–916, 1993.

SOARES, G. C. T.; ALVIANO, D. S.; DA SILVA SANTOS, G.; ALVIANO, C. S.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; NAGAO, P. E. Prevalence of Group B Streptococcus serotypes III and V in pregnant women of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 44, n. 3, p. 869–72, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3910203&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SPARVOLI, L. G.; CORTEZ, R. V.; DAHER, S.; PADILHA, M.; SUN, S. Y.; NAKAMURA, M. U.; TADDEI, C. R. Women's multisite microbial modulation during pregnancy. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, n. February, p. 104230, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104230>>.

STARC, M.; LUCOVNIK, M.; VRLIC, P. E.; JEVERICA, S. Protective Effect of Lactobacillus crispatus against Vaginal Colonization with Group B Streptococci in the Third Trimester of Pregnancy. **Pathogens**, v. 11, n. 980, p. 1–9, 2022.

STEPHENS, K.; CHARNOCK-JONES, D. S.; SMITH, G. C. S. Group B Streptococcus and the risk of perinatal morbidity and mortality following term labor. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 228, n. 5, p. S1305–S1312, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2022.07.051>>.

SULLIVAN, M. J.; GOH, K. G. K.; ULETT, G. C. Cellular Management of Zinc in Group B Streptococcus Supports Bacterial Resistance against Metal Intoxication and Promotes Disseminated Infection. **mSphere**, v. 6, n. 3, 2021.

THE NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY. The role of local vaginal estrogen for treatment of vaginal atrophy in postmenopausal women: 2007 position statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, v. 14, n. 3, p. 357–369, maio 2007. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00042192-200714030-00008>>.

TIWARI, S. K. Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. v. 12, n. May, p. 1–11, 2022.

TO, K.-N.; CORNWELL, E.; DANIEL, R.; GOONESEKERA, S.; JAUNEIKAITE, E.; CHALKER, V.; LE DOARE, K. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the Identification of Group B Streptococcus. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 10–15, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13104-019-4119-1>>.

TORRES, K. A. de M.; LIMA, S. M. R. R.; TORRES, L. M. B.; GAMBERINI, M. T.; SILVA JUNIOR, P. I. da. Garlic: An Alternative Treatment for Group B Streptococcus. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, 2021.

TSOLIA, M.; PSOMA, M.; GAVRILI, S.; PETROCHILOU, V.; MICHALAS, S.; LEGAKIS, N.; KARPATIOS, T. Group B streptococcus colonization of Greek pregnant women and neonates : prevalence , risk factors and serotypes. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 8, 2003.

UH, Y.; JANG, I. H.; YOON, K. J.; LEE, C. H.; KWON, J. Y.; KIM, M. C. Colonization rates and serotypes of group B streptococci isolated from pregnant women in a Korean tertiary hospital. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, n. 10, p. 753–756, 1997.

VITALI, B.; ABRUZZO, A.; MASTROMARINO, P. **Management of Disease and Disorders by Prebiotics and Probiotic Therapy: Probiotics in Bacterial Vaginosis**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. 399–407 p.

VRBANAC, A.; Riestra, A. M.; COADY, A.; KNIGHT, R.; NIZET, V.; PATRAS, K. A. The murine vaginal microbiota and its perturbation by the human pathogen group B

Streptococcus. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

WALKER, E. A.; PORT, G. C.; CAPARON, M. G.; JANOWIAK, B. E. Glutathione synthesis contributes to virulence of streptococcus agalactiae in a murine model of sepsis.

**Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 20, 2019.

WANG, P.; TONG, J. J.; MA, X. H.; SONG, F. L.; FAN, L.; GUO, C. M.; SHI, W.; YU, S. J.; YAO, K. H.; YANG, Y. H. 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.

YA, W.; REIFER, C.; MILLER, L. E. Efficacy of vaginal probiotic capsules for recurrent bacterial vaginosis: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 203, n. 2, p. 120.e1-120.e6, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2010.05.023>>.

ZALAMBANI, C.; RIZZARDI, N.; MARZIALI, G.; FOSCHI, C.; MORSELLI, S.; DJUSSE, M. E.; NALDI, M.; FATO, R.; CALONGHI, N.; MARANGONI, A. Role of D ( - ) -Lactic Acid in Prevention of Chlamydia trachomatis Infection in an In Vitro Model of HeLa Cells. 2023.

ZÁRATE, G.; NADER-MACIAS, M. E. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 174–180, 2006.