



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

MARIANA NUNES MARINHO RITTER FERREIRA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE
***Streptococcus agalactiae* ISOLADAS DE DIFERENTES ESPÉCIMES**
CLÍNICOS

NITERÓI
2021

MARIANA NUNES MARINHO RITTER FERREIRA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE
Streptococcus agalactiae ISOLADAS DE DIFERENTES ESPÉCIMES
CLÍNICOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Área de Concentração: Bacteriologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Rocha Barros

NITERÓI
2021

F383a Ferreira, Mariana Nunes Marinho Ritter
Avaliação da capacidade de virulência de amostras de
Streptococcus agalactiae isoladas de diferentes espécimes
clínicos / Mariana Nunes Marinho Ritter Ferreira ; Rosana
Rocha Barros, orientadora. Niterói, 2021.
69 f.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Niterói, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPGMPA.2021.m.16677902773>

1. Streptococcus agalactiae. 2. Virulência. 3. Diversidade
genética. 4. Biofilme. 5. Produção intelectual. I. Barros,
Rosana Rocha, orientadora. II. Universidade Federal
Fluminense. Instituto Biomédico. III. Título.

CDD -

MARIANA NUNES MARINHO RITTER FERREIRA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE
Streptococcus agalactiae ISOLADAS DE DIFERENTES ESPÉCIMES
CLÍNICOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação *Stricto-Sensu* em Microbiologia e
Parasitologia Aplicadas da Universidade
Federal Fluminense, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Microbiologia.

Área de Concentração: Bacteriologia

Aprovada em: 31 de maio de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Fernandes Rabello (UFF)

Profa. Dra. Cláudia Rezende Vieira de Mendonça Souza (UFF)

Profa. Dra. Tatiana de Castro Abreu Pinto (UFRJ)

NITERÓI
2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me incentivarem e me apoiarem em cada passo da minha trajetória, sem eles nada disso seria possível.

À minha orientadora, Rosana, por ter me guiado nesse projeto, por ter me ensinado tantas coisas, no âmbito da pesquisa e da docência. Agradeço pela paciência e carinho, e admiro muito a profissional incrível com a qual eu tive a sorte de trabalhar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da UFF, por todos os professores que fizeram parte do meu crescimento como profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro para realização desse projeto.

Aos professores responsáveis pelos Laboratórios de Pesquisa em Virologia, Pesquisa em Parasitologia e do Centro de Investigação em Microbiologia, do Instituto Biomédico, e pelo Laboratório de Controle Microbiológico, da Faculdade de Farmácia, por nos terem viabilizado o uso de equipamentos, essenciais para a realização deste estudo.

À professora Júlia Peixoto, pela revisão dessa dissertação.

Às minhas amigas de mestrado, por todos os momentos compartilhados, dentro e fora de sala de aula.

À minha família, amigos e namorado, pelo apoio e torcida nessa etapa da minha formação.

À Deus, pela bênção da vida, pela oportunidade de eu estar aqui e ter feito o melhor possível durante uma pandemia.

RESUMO

Streptococcus agalactiae ou estreptococo do grupo B (EGB) é agente etiológico de diversas infecções humanas, acometendo principalmente recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos. EGB expressa diversos fatores que contribuem para a adesão, invasão e agressão celular, além da evasão do sistema imune do hospedeiro. A capacidade de produzir biofilme contribui para a persistência, e consequentemente, para a virulência da espécie. Apesar dos aspectos relacionados à patogenicidade já investigados, são poucos os estudos que avaliam, em conjunto, a diversidade genética e o repertório de fatores de virulência de amostras isoladas de diferentes espécimes. Este estudo investigou alguns destes fatores associando-os a marcadores epidemiológicos. A capacidade de uma mesma cepa em colonizar e causar infecção em diferentes indivíduos também foi investigada. Foram selecionadas 32 amostras de EGB, isoladas de sítios de colonização e de infecção, e que expressavam os tipos capsulares mais relevantes. A avaliação da diversidade genética foi realizada pela análise de perfis de fragmentação do DNA, através de PFGE. Os determinantes genéticos que codificam os dois componentes da proteína C, alfa (gene *bca*) e o antígeno beta (*bac*) foram investigados. A expressão fenotípica de β -hemolisina/citolisina (β -H/C), a capacidade de produção de biofilme e a cinética de crescimento bacteriano também foram avaliadas. Foram observados perfis de PFGE idênticos ou muito relacionados entre amostras dos tipos capsulares Ia, Ib, IV ou V, isoladas de diferentes espécimes, evidenciando que uma mesma cepa pode colonizar e causar infecção. Duas amostras do tipo III, isoladas de sangue de recém-natos em 2005 e 2019, apresentaram perfil idêntico, evidenciando a circulação de clones específicos por longos períodos. O gene *bac* foi detectado em 18,8% das amostras e o gene *bca* em 25%, este último associado a amostras oriundas de sítios de colonização. O tipo capsular Ib foi significativamente associado aos genes *bac* e *bca*. A maioria das amostras oriundas de sítios de infecção apresentou moderada expressão de β -H/C, enquanto que a forte expressão ocorreu principalmente entre amostras de colonização. Amostras isoladas de urina foram fortes produtoras de biofilme, independentemente do tipo capsular. O tipo capsular também não influenciou a cinética de crescimento; por outro lado, amostras oriundas de colonização cresceram significativamente mais rápido, nas primeiras horas do ensaio. A adição de glicose favoreceu o crescimento contínuo até o fim do ensaio (24h), enquanto que amostras cultivadas sem glicose chegaram à estabilidade populacional em 5-6h de incubação. O tempo de geração médio foi 92 minutos, sem diferenças significativas em relação à origem ou ao tipo capsular das amostras. Algumas amostras se destacaram por apresentarem a maioria dos fatores avaliados, o que ilustra o potencial patogênico desta espécie.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*, virulência, diversidade genética, biofilme.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae or group B *Streptococcus* (GBS) is an etiological agent of several human infections, affecting mainly newborns and immunocompromised individuals. GBS expresses several factors that contribute to cell adhesion, invasion and aggression, in addition to the evasion of the host's immune system. The ability to form biofilm collaborates to the persistence, and consequently, to the virulence of the species. Despite the aspects related to pathogenicity already investigated, there are few studies that evaluate, together, the genetic diversity and the repertoire of virulence factors of samples recovered from different specimens. This study investigated some of these factors, associating them with epidemiological markers. The ability of the same strain to colonize and cause infection in different individuals was also evaluated. Thirty-two samples of GBS, recovered from colonization and infection sites, with the most frequent capsular types, were selected. Evaluation of genetic diversity was performed by analyzing DNA fragmentation profiles, using PFGE. The genetic determinants alpha (*bca* gene) and beta antigen (*bac*), that encode the two components of the C protein, were investigated. Phenotypic expression of β -hemolysin/cytolysin (β -H/C), the ability to produce biofilm and bacterial growth kinetics were also evaluated. Identical or closely related PFGE profiles were observed between isolates of serotypes Ia, Ib, IV or V, recovered from different specimens, showing that the same strain can colonize and cause infection. Two type III isolates, recovered from blood of newborns in 2005 and 2019, presented an identical profile, revealing the circulation of specific clones for long periods. The *bac* gene was detected in 18.8% and *bca* gene in 25%, the latter associated with isolates recovered from colonization sites. Capsular type Ib was significantly associated with both *bac* and *bca* genes. Most of the isolates recovered from infection sites presented moderate expression of β -H/C, while the stronger expression occurred mainly among colonization isolates. Isolates recovered from urine were strong biofilm producers, regardless of the capsular type. Capsular type did not influence the growth rates, on the other hand, samples from colonization grew significantly faster, in the first hours of the experiment. The addition of glucose favored continuous growth until the end of the experiment (24h), while isolates grown without glucose reached population stability in 5-6 hours of incubation. The average doubling time was 92 minutes, with no significant differences regarding isolates origin or capsular type. Some samples have stood out for presenting most of the factors evaluated, which illustrates the pathogenic potential of this species.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, virulence, genetic diversity, biofilm.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACOG: “American College of Obstetricians and Gynecologists”
ACP: Proteína C alfa
Alps: Proteínas “alpha-like”
AS: Ágar sangue
BHE: Barreira hematoencefálica
BHI: “Brain Heart Infusion”
 β -H/C: Beta-hemolisina/citolisina
CAMP: Christie, Atkins e Munch-Petersen
CC: Complexo clonal
CLSI: “Clinical and Laboratory Standards and Prevention”
CO₂: Dióxido de carbono
CPS: Cápsula polissacarídica
DIP: Doença de início precoce
DIT: Doença de início tardio
DNA: Ácido desoxirribonucleico
dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO: Densidade óptica
EGB: Estreptococo do grupo B de Lancefield
FbsA: Proteína de ligação ao fibrinogênio A
FbsB: Proteína de ligação ao fibrinogênio B
HIV: Vírus da imunodeficiência humana
IgA: Imunoglobulina A
ITU: Infecção do trato urinário
Lmb: Proteína de ligação a laminina
MHA-S: Ágar Mueller-Hinton sangue
min: Minuto
mL: Mililitro
M: Fenótipo de resistência a macrolídeos
MLSBc: Fenótipo de resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B constitutivo
MLSBi: Fenótipo de resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B indutivo
MLST: “Multilocus Sequence Typing”
PCR: “Polymerase Chain Reaction”
PFGE: “Pulsed-field Gel Eletrophoresis”
ScpB: C5a peptidase estreptocócica
ST: Tipo de sequência
TC: Taxa de crescimento
TG: Tempo de geração
THB: Caldo Todd-Hewitt
THB-G: Caldo Todd-Hewitt acrescido de 1% de glicose
TSA: Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alguns fatores de virulência de <i>Streptococcus agalactiae</i> e seus principais papéis na possível instalação de um processo infeccioso	17
Tabela 2: Informações sobre as amostras selecionadas para o estudo	27
Tabela 3: Distribuição das amostras em função dos espécimes clínicos e tipo capsular	28
Tabela 4: Sequência dos iniciadores e tamanho esperado dos produtos de amplificação na determinação dos tipos capsulares de <i>Streptococcus agalactiae</i> ...	31
Tabela 5: Reagentes utilizados na tipificação capsular de <i>Streptococcus agalactiae</i>	31
Tabela 6: Sequência dos iniciadores e tamanho esperado dos produtos de amplificação na determinação dos genes de virulência	33
Tabela 7: Reagentes utilizados na investigação de determinantes genéticos de virulência <i>bac</i> e <i>bca</i> , e 16S rRNA.....	34
Tabela 8: Classificação da produção de biofilme, conforme os valores da DO das amostras.....	35
Tabela 9: Grupos clonais, perfis de PFGE, tipos capsulares e espécimes clínicos das 31 amostras de <i>Streptococcus agalactiae</i>	38
Tabela 10: Amostras em que os genes <i>bac</i> e/ou <i>bca</i> foram detectados	42
Tabela 11: Expressão de β -hemolisina/citolisina e produção de biofilme das amostras	45
Tabela 12: Valores de tempo de geração e taxa de crescimento das amostras, espécime clínico e tipo capsular.....	47
Tabela 13: Amostras que reúnem a maioria dos fatores associados à virulência e à adaptação ambiental avaliados	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dendrograma das amostras do tipo capsular Ia e seus perfis de PFGE ...	39
Figura 2: Dendrograma das amostras do tipo capsular Ib e seus perfis de PFGE ...	39
Figura 3: Dendrograma das amostras do tipo capsular II e seus perfis de PFGE	40
Figura 4: Dendrograma das amostras do tipo capsular III e seus perfis de PFGE ...	40
Figura 5: Dendrograma das amostras dos tipos capsulares IV e V e seus perfis de PFGE	41
Figura 6: Avaliação da expressão fenotípica de β -H/C por análise visual da hemólise em meio AS.....	43
Figura 7: Cinética de crescimento de amostras provenientes de diferentes espécimes clínicos	46
Figura 8: Cinética de crescimento das amostras oriundas de diferentes espécimes clínicos, incubadas em THB e em THB-G.....	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Gênero <i>Streptococcus</i>	12
1.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	13
1.2.1. Importância clínica	14
1.2.2. Fatores de virulência	16
1.2.3. Capacidade de produção de biofilme	20
1.2.4. Capacidade de adaptação (“fitness”)	21
1.2.5. Caracterização epidemiológica	22
1.2.6. Desenvolvimento de vacinas	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVO GERAL	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. AMOSTRAS BACTERIANAS	26
3.2. CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR	28
3.2.1. Confirmação da espécie	29
3.2.2. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA)	29
3.3. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA	30
3.3.1. Determinação do tipo capsular	30
3.3.2. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	32
3.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA	33
3.4.1. Investigação dos genes <i>bac</i> e <i>bca</i>	33
3.4.2. Investigação da expressão fenotípica da toxina beta-hemolisina/citolisina (β -H/C)	34
3.4.3. Avaliação da capacidade de produção de biofilme	34
3.5. AVALIAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DE TEMPO DE GERAÇÃO/TAXA DE CRESCIMENTO	35
3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS	59
8. ANEXO	68

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Streptococcus*

O gênero *Streptococcus* é composto por cocos Gram-positivos, catalase negativos, agrupados aos pares ou em cadeias devido à sua divisão celular em um único plano. As espécies desse gênero são anaeróbias facultativas, podendo crescer na presença de oxigênio ou em anaerobiose. Além disso, algumas espécies são capnofílicas, ou seja, crescem em atmosfera enriquecida com dióxido de carbono (CO₂). A partir do metabolismo fermentativo de açúcares, há geração de ácido láctico como produto principal. Os estreptococos possuem exigências nutricionais complexas, o que faz com que necessitem do uso de meios enriquecidos, com sangue ou glicose, para seu crescimento. O meio mais utilizado para isolamento desses microrganismos é o ágar sangue (AS), que contém 5% de sangue de carneiro desfibrinado (MURRAY *et al.*, 2009; TORTORA *et al.*, 2012).

Existem diferentes abordagens de classificação dos estreptococos, as mais utilizadas são aquelas que classificam as espécies de acordo com padrões hemolíticos em meio AS, propriedades antigênicas e propriedades fisiológicas (MURRAY *et al.*, 2009). A classificação de acordo com o padrão hemolítico decorre da produção ou não de algum tipo de hemolisina, enzima capaz de lisar hemácias. Para isso, observa-se no meio AS o aspecto ao redor da colônia do microrganismo, categorizando-os em: beta-hemolíticos, quando formam um halo transparente de hemólise ao redor da colônia (lise total das hemácias); alfa-hemolíticos, quando formam um halo de coloração esverdeada (lise parcial das hemácias) e não hemolíticos, quando não há formação de halo de hemólise (TORTORA *et al.*, 2012; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

A abordagem de classificação de acordo com propriedades antigênicas foi desenvolvida por Rebecca Lancefield, em 1933. Lancefield classificou os estreptococos em grupos sorológicos de acordo com as características de certos antígenos (carboidrato C ou ácido teicóico) de composição variável, componentes da parede celular. Esse antígeno grupo-específico pode ser detectado por meio de ensaios imunológicos, atualmente com o teste de aglutinação em látex. Dada a diversidade antigênica conferida pela composição polissacarídica, dividiu-se as espécies de estreptococos em 20 grupos sorológicos (Grupos de Lancefield),

nomeados de A-H e de K-V. Essa classificação sorológica é especialmente utilizada para a identificação das espécies de estreptococos beta-hemolíticos de importância médica, como *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae*. Além dos testes sorológicos, espécies de estreptococos, independente do padrão hemolítico, são também identificadas por testes fisiológicos (MURRAY *et al.*, 2009; TORTORA *et al.*, 2012; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

1.2. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae corresponde à espécie de estreptococo beta-hemolítico que apresenta o antígeno do grupo B do sistema de classificação de Lancefield, composto por ramnose, N-acetilglicosamina e galactose, denominando-os de estreptococos do grupo B (EGB). Além deste sistema de classificação, a espécie apresenta cápsula de natureza polissacarídica, imunogênica, cujo principal componente é o ácido siálico. Dada a sua composição variável, a cápsula apresenta diversidade antigênica e esta constitui um importante sistema de tipificação de amostras (MURRAY *et al.*, 2009; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). *S. agalactiae* possui características morfológicas, nutricionais e fisiológicas comuns às outras espécies do gênero *Streptococcus*, além de peculiaridades, como a capacidade de hidrolisar o hipurato de sódio e a produção do fator CAMP, que inclusive servem como testes de identificação da espécie (MURRAY *et al.*, 2009; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Historicamente, *S. agalactiae* foi primeiramente identificado como o agente etiológico de mastite bovina por Nocard e Mollereau, em 1887. A espécie foi isolada de secreção vaginal e considerada um importante agente infeccioso em gestantes a partir de 1935. A partir do estudo de Hood *et al.*, em 1961, a espécie foi reconhecida como a principal causa de sepse neonatal precoce, tornando-se, na década de 1970, a principal causa de morte e morbidade neonatal nos Estados Unidos e, a partir da década de 1980, a causa mais comum de sepse e meningite neonatal em países desenvolvidos (apud LE DOARE; KAMPMANN, 2014).

1.2.1. Importância clínica

Streptococcus agalactiae é um microrganismo presente na microbiota dos tratos gastrointestinal e genital de 15 a 30% de adultos saudáveis (RINAUDO *et al.*, 2010; PARKER *et al.*, 2016). A orofaringe também se apresenta como um reservatório de EGB, com taxas de colonização variando de 4 a 12% na população adulta jovem (BRITTAN; NOBBS, 2015). A colonização por EGB na maioria das vezes não leva ao desenvolvimento de quadros de infecção, principalmente em indivíduos imunocompetentes. No entanto, a colonização do trato genital de gestantes é o principal fator de risco para a ocorrência da infecção em recém-nascidos (DARABI *et al.*, 2017; FURFARO *et al.*, 2018).

A colonização por EGB em gestantes está associada, a infecções invasivas em neonatos, ao nascimento de bebês prematuros e natimortos (MURRAY *et al.* 2009). A doença por EGB em recém-nascidos pode ser classificada com base no início dos sintomas. A doença de início precoce (DIP) ocorre na primeira semana de vida, enquanto a doença de início tardio (DIT) ocorre a partir do sétimo dia até os três meses de vida. A transmissão da DIP neonatal pode ocorrer intraútero através da contaminação do líquido amniótico, quando a infecção ascende da vagina para as membranas placentárias, ou no momento do parto, mediante a aspiração de fluidos amnióticos ou vaginais contaminados. A DIP se manifesta frequentemente com quadros de pneumonia e insuficiência respiratória, que podem progredir rapidamente para sepse, ou ainda, casos de meningite. Diferente da transmissão vertical da DIP, a DIT neonatal é transmitida horizontalmente, adquirida por fonte exógena através do contato com a mãe ou com o ambiente contaminado (FURFARO *et al.* 2018; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018; DO NASCIMENTO *et al.*, 2019; RAABE; SHANE, 2019). Nesse caso, a meningite costuma ser o quadro mais comum, mas também ocorrem infecção de corrente sanguínea, pneumonia, infecção do trato urinário (ITU), infecções de tecidos moles e/ou ósseos (RAABE; SHANE, 2019). A meningite na DIT pode gerar sequelas neurológicas crônicas no recém-nascido, como convulsões, deficiência cognitiva, perda auditiva e cegueira (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018).

Além de recém-natos, outras populações acometidas são gestantes, idosos e indivíduos com comorbidades (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018; ARMISTEAD *et*

al., 2019). Os principais quadros clínicos relacionados a gestantes e puérperas incluem infecção do trato urinário, bacteremia, endocardite, amnionite, osteomielite, endometrite e infecções de tecidos moles e de feridas. Em indivíduos não-grávidos as infecções mais frequentes são artrite, infecções de tecidos moles, pele e ossos, bacteremia, infecção do trato urinário, pneumonia e endocardite. Nesse grupo, o desenvolvimento da doença por EGB é mais comum em idosos e indivíduos com alguma comorbidade, como diabetes melittus, doença crônica renal ou hepática, câncer e HIV (DARABI *et al.*, 2017; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018; RAABE; SHANE, 2019). Além disso, *S. agalactiae* é um dos principais microrganismos causadores de infecções do aparelho reprodutor masculino, que têm sido relacionadas à infertilidade masculina. A diminuição da motilidade dos espermatozoides e do aumento de leucócitos no esperma são indicativos desse quadro. As alterações nos parâmetros espermáticos por EGB estão relacionados à expressão de uma série de fatores de virulência, detalhados adiante (PARIDA; SAMANTA, 2017; ZEYAD *et al.*, 2018; PARIDA, 2019).

Por mais que as infecções causadas por EGB não ocorram somente em recém-nascidos, são reconhecidamente de maior impacto nessa população, em termos de gravidade e incidência (LE DOARE; HEATH, 2013). Segundo as diretrizes do Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (“American College of Obstetricians and Gynecologists” – ACOG), publicadas em 2020, as principais recomendações para prevenção da doença neonatal por EGB são: a pesquisa (triagem) de EGB em mulheres entre o início da 36^a e o fim da 37^a semana de gestação e, se positiva, a implementação da profilaxia antibiótica intraparto. A profilaxia antibiótica intraparto está intimamente relacionada com a diminuição da prevalência da doença de início precoce, na qual a transmissão do EGB ocorre de maneira vertical (RAABE; SHANE, 2019). De acordo com as recomendações do ACOG, a profilaxia consiste na administração intravenosa de antibiótico em gestantes colonizadas por EGB a cada quatro horas até o fim do trabalho de parto. A droga de primeira escolha é a penicilina benzatina. Em pacientes com alergia a penicilina, sem risco de anafilaxia, pode ser utilizada cefazolina, enquanto que em pacientes com alto risco de alergia a penicilina é recomendado o uso de clindamicina, ou vancomicina em caso de resistência à clindamicina. Esse procedimento é principalmente recomendado para gestantes com alguns fatores de risco, como idade gestacional abaixo de 37 semanas, ruptura da membrana com duração de 18h ou mais, temperatura intraparto acima de 38°C e parto

prévio de um bebê apresentando infecção por EGB. Vale ressaltar que mesmo que a triagem e profilaxia sejam recomendadas pela Sociedade Brasileira de Pediatria (COSTA, 2011) não foi estabelecida nenhuma recomendação do Ministério da Saúde Brasileiro na assistência pré-natal à gestante de baixo risco (BRASIL, 2012).

A partir da avaliação do comportamento das amostras de EGB frente aos antimicrobianos recomendados para a profilaxia e o tratamento de infecções, têm sido detectadas amostras resistentes a estes. A resistência tem sido observada não somente entre amostras isoladas de gestantes e recém-nascidos, como também entre aquelas associadas a infecções diversas em indivíduos não-grávidos. Foi relatada susceptibilidade reduzida à penicilina (KIMURA *et al.*, 2008), embora ainda seja pouco frequente, enquanto que a resistência à clindamicina e eritromicina, ocorre em todas as regiões geográficas, inclusive em nosso meio, em taxas variáveis (BOTELHO *et al.*, 2018; DO NASCIMENTO *et al.*, 2019; RAABE; SHANE, 2019). A resistência a vancomicina, um raro evento, foi relacionada à presença do gene *vanG* (SRINIVASAN *et al.*, 2014). Durante a década de 1970, a tetraciclina foi bastante utilizada por conta de suas vantagens farmacológicas, como espectro de ação amplo, baixa toxicidade e baixo preço, o que elevou os índices de resistência a tal grau que inviabilizou o uso deste antimicrobiano (MELO *et al.*, 2016).

1.2.2. Fatores de virulência

S. agalactiae possui diversos fatores de virulência que contribuem para a adesão à superfície celular, para a invasão de células específicas, para a indução da resposta inflamatória e para a evasão do sistema imune do hospedeiro. Um único fator de virulência não é suficiente para provocar uma infecção estreptocócica, que é promovida pela atividade coordenada de vários destes, envolvidos em diferentes mecanismos de patogenicidade (PIETROCOLA *et al.*, 2018). Tomando como exemplo a infecção neonatal, a mesma ocorre a partir da colonização bem-sucedida do epitélio vaginal, penetração nas barreiras placentárias ou epiteliais e modulação do sistema imune, possibilitando à bactéria o acesso ao tecido pulmonar, a sobrevivência na corrente sanguínea e, nos casos de meningite, a translocação para a barreira hematoencefálica (BHE) (MAISEY *et al.*, 2008; ARMISTEAD *et al.*, 2019; DO NASCIMENTO *et al.*, 2019).

A expressão dos fatores de virulência é variável entre as amostras de *S. agalactiae* e depende do estágio da interação com o hospedeiro, colonizando ou causando infecção. A ausência da expressão de um fator de virulência pode ocorrer por diversas razões. Um exemplo é a regulação negativa da expressão de proteínas, particularmente por sistemas de dois componentes, que propiciam a adaptação das bactérias às mudanças nas condições ambientais. De outra maneira, mutações na estrutura do gene, como as deleções, inserções e duplicações, podem resultar em alterações na sequência, conformação e atividade funcional do fator de virulência (SAGAR *et al.*, 2013; VASILYEVA *et al.*, 2015). Alguns dos fatores de virulência associados ao EGB e seus determinados mecanismos que podem contribuir para instalação do processo infeccioso estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Alguns fatores de virulência de *Streptococcus agalactiae* e seus principais papéis na possível instalação de um processo infeccioso (Adaptado de LANDWEHR-KENZEL & HENNEKE, 2014)

Fator de virulência	Mecanismo		
	Adesão	Invasão	Evasão do sistema imune
Cápsula polissacarídica (CPS)			+
C5a peptidase estreptocócica (ScpB)			+
Proteína C alfa (ACP)	+	+	+
Antígeno beta			+
Proteína de ligação ao fibrinogênio A (FbsA)	+		
Proteína de ligação ao fibrinogênio B (FbsB)		+	
Proteína de ligação à laminina (Lmb)		+	
Beta-hemolisina/citolisina (β -H/C)	+	+	+

Dentro do vasto repertório de fatores, podemos citar a beta-hemolisina/citolisina (β -H/C). A β -H/C, é um ornitina-ramnopolieno pigmentado, uma citotoxina que causa dano celular e é capaz de lisar uma variedade de células humanas e contribuir para persistência do EGB no hospedeiro (WHIDBEY *et al.*, 2013; HOOVEN *et al.*, 2017), desempenhando um papel importante na transição de colonização para infecções invasivas. *S. agalactiae* codifica diversos sistemas de dois componentes e proteínas reguladoras para controlar a expressão gênica. A modulação de genes envolvidos nessa transição e de genes relacionados à virulência é controlada principalmente pelo sistema regulador de dois componentes chamado CovR/S (VASILYEVA *et al.*, 2015; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018, ARMISTEAD *et al.*, 2019). Na colonização vaginal, por conta do pH ácido, o sistema CovR/S pode inibir a expressão de β -H/C, resultando em diminuição da inflamação e contribuindo para colonização persistente de EGB. Em contraste, em ambientes neutros, como a membrana corioamniótica, β -H/C pode ser expressa, intensificando a invasão por cepas de EGB fortes produtoras de hemólise. A colonização vaginal por EGB é uma preocupação particular durante a gestação, por conta da sua capacidade de invadir os tecidos gestacionais e atingir o feto (BURCHAM *et al.*, 2019). Sendo assim, β -H/C é considerada um dos fatores mais relacionados às infecções invasivas, pois contribui para a internalização em células epiteliais e endoteliais, incluindo invasão da barreira hematoencefálica. Além de sua atividade hemolítica, há indícios de que essa citotoxina induz a apoptose de fagócitos, recrutamento de neutrófilos, estimula liberação de citocinas e quadros de sepse (MAISEY *et al.*, 2008; SAGAR *et al.*, 2013; LANDWEHR-KENZEL; HENNEKE, 2014; RANDIS *et al.*, 2014; HOOVEN *et al.*, 2017; PIETROCOLA *et al.*, 2018).

Outros fatores importantes são as proteínas de superfície, que mediam a interação do EGB com as células hospedeiras. Entre as quais estão incluídas as proteínas de ligação ao fibrinogênio do plasma ou da matriz extracelular (ex: FbsA e FbsB), a proteína de ligação à laminina (Lmb), a C5a peptidase estreptocócica do EGB (ScpB) e a proteína C. Essas proteínas facilitam a interação entre a célula bacteriana e o hospedeiro. A FbsA é uma proteína de superfície que se liga ao fibrinogênio e promove, principalmente, adesão e formação de coágulos, enquanto a FbsB é uma proteína secretada que interage com o fibrinogênio, necessária para invadir células humanas. A ligação do EGB à laminina presente na matriz extracelular, por meio da Lmb, parece contribuir para a translocação dessa bactéria através do epitélio intestinal e da barreira hematoencefálica. A ScpB é uma serina-protease associada à superfície

celular com capacidade de se ligar e clivar/inativar o peptídeo quimiotático C5a, derivado do complemento, que atrai neutrófilos para o local da infecção (MAISEY *et al.*, 2008; LANDWEHR-KENZEL; HENNEKE, 2014; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018; PIETROCOLA *et al.*, 2018).

Uma das proteínas de superfície mais importantes é a proteína C. Sua estrutura consiste em antígenos alfa e beta, expressos de forma independente, assim como os determinantes genéticos são carregados independentemente. A fração beta da proteína C (antígeno beta), codificado pelo gene *bac*, se liga à porção Fc da imunoglobulina A (IgA) impedindo que essa imunoglobulina realize suas funções efetoras, resultando na inibição da fagocitose. Além disso, se liga ao Fator H, inibindo a ativação do complemento pela via alternativa, através da inativação do componente C3b. Sendo assim, sua ação contribui para a evasão dos mecanismos de defesa imunológica (KONG *et al.*, 2006; PIETROCOLA *et al.*, 2018). A proteína C alfa (ACP) é o protótipo de uma classe de proteínas de superfície chamadas proteínas alfa-*like* (Alps). Os membros dessa classe são altamente homólogos e parecem compartilhar funções semelhantes. A ACP, codificada pelo gene *bca*, contribui para a internalização do EGB no epitélio cervical humano, sugerindo que seja o principal determinante da invasão celular. Essa proteína pode interagir com glicosaminoglicanos da superfície epitelial ou com receptor eucariótico semelhante a heparina, permitindo a internalização da bactéria. Outro mecanismo possível é através da ligação com as integrinas $\alpha 1\beta 1$, resultando na invasão de células não-fagocíticas (BARON *et al.*, 2004; MAISEY *et al.*, 2008; PIETROCOLA *et al.*, 2018).

A cápsula polissacarídica tem sido considerada, até o momento, o principal fator de virulência de EGB, dentre as moléculas ou estruturas bacterianas que contribuem para a patogênese. A cápsula possui em sua composição o ácido siálico, presente também em células eucarióticas, contribuindo para o mimetismo molecular. Seu papel de impedir o depósito de moléculas C3b na superfície bacteriana, contribui para a resistência à fagocitose, ou seja, evasão do sistema imune. A cápsula possui ampla diversidade em suas propriedades antigênicas, sendo, até o momento, identificados 10 tipos diferentes (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX). A imensa maioria das amostras isoladas em infecções é causada por cepas encapsuladas. É importante conhecer a distribuição dos tipos capsulares mais prevalentes em âmbito regional e nacional e relacionados com quadros de infecção invasiva, como base para estudos

epidemiológicos e de vacinas (MAISEY *et al.*, 2008; FIOLO *et al.*, 2012; LE DOARE & HEATH, 2013; MADHI & DANGOR, 2017; PIETROCOLA *et al.*, 2018).

1.2.3. Capacidade de produção de biofilme

Os processos de colonização e infecção por EGB dependem da capacidade bacteriana de adesão às superfícies epiteliais da mucosa e persistência no local. Nesse cenário, a formação de biofilmes contribui para os mecanismos de patogenicidade, favorecendo a sobrevivência e proliferação do microrganismo, sendo considerada um importante fator de virulência (ROSINI; MARGARIT, 2015; PARKER *et al.*, 2016; ALVIM *et al.*, 2019). O biofilme é definido como uma comunidade de células bacterianas sésseis agregadas, rodeadas por uma matriz extracelular autoproduzida composta de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (RINAUDO *et al.*, 2010; PARKER *et al.*, 2016). Essas estruturas, que podem estar aderidas a superfícies abióticas ou bióticas, oferecem à sua comunidade proteção frente aos antimicrobianos e efetores do sistema imune, frente às variações ambientais, como a de pH, além de contribuírem para a colonização assintomática persistente e/ou desenvolvimento de infecções (RINAUDO *et al.*, 2010; D'URZO *et al.*, 2014; PARKER *et al.*, 2016).

A formação do biofilme é um processo multifatorial e complexo que ocorre em etapas e necessita de condições ambientais e fatores genéticos para ocorrer. Para que as células em seu estado planctônico (flutuação livre) passem para o estado sésseis, é necessário uma série de eventos regulados geneticamente, que ocorre principalmente pelo sistema de regulação “quorum sensing” (HALL; MAH, 2017). A primeira etapa do processo de formação do biofilme conta com uma associação fraca ou transitória das células planctônicas com uma superfície e posterior ocorrência de adesão intensa. As etapas subsequentes incluem a agregação das células em microcolônias, seguida da multiplicação celular e maturação do biofilme. A última etapa é caracterizada pela dispersão das células do biofilme, retornando à motilidade transitória, no estado planctônico (RINAUDO *et al.*, 2010).

Algumas espécies do gênero *Streptococcus* são sabidamente capazes de formar biofilmes, principalmente da mucosa oral, como *Streptococcus mutans*. No entanto, um limitado número de estudos demonstrou a formação de biofilme por EGB

(D'URZO *et al.*, 2014; PARKER *et al.*, 2016; ALVIM *et al.*, 2019). O primeiro estudo relatando o envolvimento de *S. agalactiae* na formação de biofilme foi de Donlan e Costerton (2002), no qual a espécie foi isolada de dispositivos intrauterinos, associada com outras espécies formadoras de biofilme já conhecidas, como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

As condições ambientais específicas para formação do biofilme exercem uma pressão seletiva que pode aumentar a patogenicidade e gerar cepas mais propensas à sobrevivência no meio (PARKER *et al.*, 2016). Dessa forma, quando *in vitro*, a composição do meio de crescimento regula a capacidade de formar biofilme, através da disponibilidade de nutrientes específicos, como a glicose, ou condições de pH (KAUR *et al.*, 2009; D'URZO *et al.*, 2014; ROSINI; MARGARIT, 2015). Além disso, estudos indicam que proteínas de superfície, como Lmb, FbsA, FbsB, e estruturas como os pili, são importantes no processo de adesão da bactéria às superfícies e de estabilidade estrutural do biofilme (KAUR *et al.*, 2009; D'URZO *et al.*, 2014; PARKER *et al.*, 2016; ALVIM *et al.*, 2019).

1.2.4. Capacidade de adaptação (“fitness”)

A adaptação, ou “fitness” bacteriano, é a capacidade do microrganismo de sobreviver, se replicar e se adaptar às condições ambientais. Dessa forma, algumas amostras são mais propensas à sobrevivência quando ocorrem alterações no ambiente, como escassez de nutrientes, mudança de temperatura ou pH, presença de antimicrobianos e estresse induzido pelo ambiente competitivo. Essa capacidade de adaptação é promovida geralmente por determinantes genéticos de virulência ou de resistência aos antimicrobianos, assegurando recursos metabólicos e aumentando suas chances de sobrevivência e, conseqüentemente, de persistir e/ou de gerar quadros de infecção (BHATTER *et al.*, 2012; GÓMEZ-MEJIA *et al.*, 2018).

Para avaliar o “fitness” *in vitro* de diferentes amostras, pode ser realizado um ensaio de curva de crescimento com a determinação do tempo de geração. O crescimento bacteriano é o somatório de processos metabólicos, com subsequente síntese de componentes estruturais e genéticos, resultando na divisão celular e, com isso, aumento do número de células de uma população. A curva de crescimento retrata um ciclo de crescimento bacteriano completo, contendo as fases lag,

exponencial (logarítmica), estacionária e de declínio (BHATTER *et al.*, 2012; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; MADIGAN *et al.*, 2016). Sendo assim, ao analisar a curva de crescimento bacteriano associada ao tempo de geração de diferentes amostras em variadas condições *in vitro* (como concentração de glicose e pH do meio) pesquisadores podem aferir quais fatores inferem no “fitness” bacteriano (BHATTER *et al.*, 2012; D’URZO *et al.*, 2014).

1.2.5. Caracterização epidemiológica

A análise da diversidade e caracterização epidemiológica das amostras de EGB podem ser realizadas por meio de tipificação sorológica e de métodos genotípicos. Diversas metodologias de tipificação são utilizadas em estudos epidemiológicos e podem auxiliar na implementação de estratégias mais efetivas de prevenção e de tratamento das infecções (CORRÊA *et al.*, 2011; SCHUAB *et al.*, 2015, FURFARO *et al.*, 2018).

A cápsula é o mais importante marcador epidemiológico. Os diferentes tipos capsulares podem ser identificados por métodos sorológicos ou genotípicos, como a reação em cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction” - PCR). A distribuição dos tipos capsulares pode variar de acordo com a região geográfica, a origem da amostra e o perfil da população em estudo (DUTRA *et al.*, 2014). Os tipos capsulares mais frequentes, mundialmente, são o Ia, Ib, II, III e V (DUTRA *et al.*, 2014; FABBRINI *et al.*, 2016; FURFARO *et al.*, 2018). Diversos estudos encontraram relação entre o sorotipo III e infecções neonatais graves, e entre o sorotipo V e as doenças invasivas em adultos (XIA *et al.*, 2015; KOBAYASHI *et al.*, 2016; RAABE; SHANE, 2019; VEKEMANS *et al.*, 2019).

A diversidade de amostras pode ser avaliada por técnicas que analisam o DNA genômico, como a técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (“Pulsed-field gel electrophoresis” - PFGE). Este é um método que diferencia as amostras de EGB com maior discriminação do que a tipificação capsular, permitindo avaliar a diversidade genética até mesmo entre indivíduos do mesmo tipo capsular (MAGALHÃES *et al.*, 2005; CORRÊA *et al.*, 2011; ALP *et al.*, 2016; FURFARO *et al.*, 2018). Utilizando a técnica de PFGE é possível separar grandes fragmentos de DNA, oriundos da clivagem que ocorre quando o DNA genômico é submetido ao tratamento com uma

enzima de restrição que reconhece poucos sítios (para *S. agalactiae*, frequentemente a *Sma*I) e à reorientação do DNA no gel pela ação de campos elétricos alternados. Por fim, os perfis de fragmentação das amostras são então comparados e agrupados de acordo com a similaridade entre eles (MAGALHÃES *et al.*, 2005; FURFARO *et al.*, 2018). Dessa maneira, é possível avaliar a diversidade genética entre as amostras de EGB relacionadas a diferentes contextos, encontradas em diferentes espécimes oriundos de seres humanos ou de animais.

Outra ferramenta epidemiológica importante, que foi introduzida para a caracterização de EGB no início dos anos 2000, é a tipificação pelo sequenciamento de múltiplos loci – “Multilocus Sequence Typing” (MLST). O princípio da técnica é identificar sequências nucleotídicas internas de aproximadamente 400 a 500 pares de bases em 7 genes de manutenção celular (sujeitos a pouca variação). São atribuídas a sequências únicas (alelos) um número aleatório e então, uma combinação única de alelos, um “perfil alélico”, especifica o tipo de sequência (“sequence type” - ST) (LARSEN *et al.*, 2012). Foi demonstrado que cada tipo capsular de EGB não está restrito a um único e/ou exclusivo tipo de sequência de MLST, visto que amostras com o mesmo ST podem expressar diferentes tipos capsulares (JONES *et al.*, 2003). Ao compartilhar seis ou sete alelos correspondentes, os STs são agrupados em complexos clonais (CC). A maioria das cepas de EGB isoladas de humanos pode ser agrupada em seis CCs que são CC1, CC10, CC17, CC19, CC23 e CC26. Alguns complexos clonais possuem cepas com um maior potencial para causar doenças invasivas, enquanto outros reúnem amostras associadas à colonização (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). Alguns tipos capsulares estão associados a clones mais virulentos e, dessa forma, uma tendência maior à doença invasiva por EGB. Isso se aplica particularmente ao tipo III, que está frequentemente associado ao complexo clonal hipervirulento 17 (CC17) e, principalmente, à doença neonatal de início tardio, em particular, quadros de meningite (RUSSEL *et al.*, 2017).

1.2.6. Desenvolvimento de vacinas

A maioria das estratégias de desenvolvimento de vacina contra o EGB se concentra na estrutura da cápsula polissacarídica como alvo. A vacina deve desencadear no hospedeiro a produção de anticorpos anti-cápsula específicos para o

tipo incluído em sua composição. Dados de prevalência de tipos capsulares são importantes para o desenvolvimento de vacinas, uma vez que os mais prevalentes têm sido utilizados na formulação vacinal. Vacinas conjugadas de cápsula e proteínas carreadoras estão sendo avaliadas em estudos pré-clínicos e clínicos (KOBAYASHI *et al.*, 2016; MADHI *et al.*, 2016; VEKEMANS *et al.*, 2019). A vacina de EGB pode minimizar o uso de antibióticos na profilaxia intraparto, evitando o potencial surgimento de cepas resistentes e auxiliando na prevenção tanto da doença de início precoce quanto da doença de início tardio, que não é afetada pela profilaxia com antibióticos (CORRÊA *et al.*, 2011).

Outras estruturas de EGB tidas como potenciais componentes vacinais são as proteínas de superfície, em destaque a proteína C; tanto a proteína C alfa quanto o antígeno beta. O antígeno beta é considerado um promissor carreador para vacina de cápsula, como observado no estudo de Yang *et al.* (2007), no qual foi desenvolvido um antígeno beta recombinante que não possuía o sítio de ligação de IgA humana. Assim, foi mantido seu papel de proteína transportadora eficaz, o que o tornou um carreador adequado para a vacina do tipo capsular III. Além disso, investigações adicionais têm sido feitas, utilizando a proteína C alfa. Foi observada imunogenicidade em uma vacina composta por duas proteínas alfa-like, a proteína C alfa e a proteína Rib (LARSSON *et al.*, 2006). No entanto, a presença variável das proteínas de superfície nas amostras circulantes limita o uso de apenas estes componentes em uma vacina com potencial global. Por isso, a importância de elaborar uma vacina conjugada composta de elementos imunogênicos mais comuns à população de EGB, principalmente às amostras relacionadas com quadros invasivos (MAISEY *et al.*, 2008; MADHI; DANGOR, 2017; PIETROCOLA *et al.*, 2018; PAOLETTI; KASPER, 2019). No momento, existem vacinas em desenvolvimento envolvendo os tipos capsulares mais associados à doença invasiva neonatal e a proteína diftérica CRM197 como carreadora. A empresa farmacêutica Pfizer está desenvolvendo uma formulação hexavalente, com os tipos capsulares Ia, Ib, II, III, IV e V. Já concluíram as fases 1 e 2 de um estudo clínico testando a segurança e eficácia da vacina em adultos saudáveis nos Estados Unidos e iniciaram um teste clínico em mulheres grávidas na África do Sul (VEKEMANS *et al.*, 2019).

A complexidade da relação parasito-hospedeiro envolvendo *S. agalactiae* aumenta o desafio para prevenção das doenças causadas por esse patógeno. A investigação dos determinantes de virulência e a caracterização das cepas circulantes em diferentes áreas geográficas e anatômicas, podem auxiliar na implementação de estratégias de prevenção e tratamento mais precisas, de forma a evitar quadros infecciosos, principalmente os mais graves, e as fatalidades associadas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Considerando o repertório de fatores de virulência de *Streptococcus agalactiae* que atuam em diferentes estágios do processo infeccioso, este estudo tem como objetivo geral avaliar o potencial de virulência de amostras, isoladas de sítios de colonização e de infecção. Para tal, foi analisado pelo menos um fator de virulência associado à cada mecanismo de patogenicidade, relacionando tais fatores a marcadores epidemiológicos. Assim, os seguintes objetivos específicos são propostos:

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliação da diversidade genética das amostras, por técnicas que avaliam o polimorfismo do DNA, para assim determinar se uma mesma cepa é capaz de colonizar e causar infecção em diferentes indivíduos.
2. Investigação de determinantes genéticos de virulência (genes *bca* e *bac*), que codificam a proteína C alfa e o antígeno beta, respectivamente.
3. Investigação da capacidade de expressão fenotípica da toxina beta-hemolisina/citolisina (β -H/C).
4. Avaliação da capacidade de produção de biofilme em superfície de poliestireno.
5. Avaliação da capacidade de adaptação ambiental, a partir da avaliação da cinética de crescimento e determinação do tempo de geração e taxa de crescimento *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS BACTERIANAS

Para este estudo foram selecionadas 32 amostras de *Streptococcus agalactiae* isoladas no período de 2002 a 2019, pertencentes à coleção de amostras bacterianas do Laboratório de Estreptococos Beta-Hemolíticos, MIP, CMB, UFF. As amostras bacterianas foram selecionadas em função de sua origem de isolamento, de sítios de infecção (n=17) ou de colonização (n=15). Os espécimes associados à infecção foram esperma (3), sangue (6) e urina (8) e os associados à colonização foram secreções uretral (2), vaginal (9) e de orofaringe (4). Outro critério usado na seleção foi o tipo capsular que as amostras expressam, de modo que os tipos mais relevantes fossem contemplados (Ia, Ib, II, III, IV e V). As amostras foram isoladas de recém-natos, gestantes e adultos não-grávidos e, em sua maioria, fizeram parte de estudos que investigaram outros aspectos do microrganismo (em especial, a resistência a antimicrobianos). Amostras (seis) que não tinham resultado do tipo capsular ou do antibiograma (duas) foram submetidas a estas análises no início do processo de seleção. A tabela 2 traz informações sobre as amostras selecionadas.

Tabela 2: Informações sobre as amostras selecionadas para o estudo

Amostra	Paciente	Ano de isolamento	Espécime	Cps	Clin	Eri	Tet
03	RN	2002	Sangue	Ib	S	S	R
27	RN	2005	Sangue	III	S	S	R
39	RN	2005	Sangue	Ia	S	S	R
40	RN	2006	Sangue	V	S	S	R
47	RN	2006	Sangue	Ia	S	S	S
1021	RN	2019	Sangue	III	S	S	R
368	G/36 anos	2008	Urina	IV	S	S	R
708	F/49 anos	2011	Urina	III	R	R	I
755	F/31 anos	2011	Urina	V	R	R	R
850	G/24 anos	2012	Urina	II	S	S	I
869	G/30 anos	2013	Urina	Ia	S	S	R
962	G/23 anos	2016	Urina	II	S	S	R
996	G/41 anos	2017	Urina	Ib	S	S	R
1000	G/41 anos	2017	Urina	Ia	S	S	R
234	M/61 anos	2008	Esperma	V	S	S	R
265	M	2008	Esperma	III	S	S	S
277	M/44 anos	2008	Esperma	V	S	I	R
946	F/20 anos	2015	Sec. Orof.	III	S	S	S
963	F/25 anos	2016	Sec. Orof.	Ia	S	S	S
965	F/22 anos	2016	Sec. Orof.	Ia	S	S	S
976	M/20 anos	2016	Sec. Orof.	Ib	S	S	R
242	M/24 anos	2008	Sec. Uret.	II	R	R	R
400	F/23 anos	2009	Sec. Uret.	II	S	S	R
253	G/27 anos	2008	Sec. Vaginal	IV	S	S	R
882	G/32 anos	2014	Sec. Vaginal	III	S	S	R
925	G/33 anos	2015	Sec. Vaginal	Ia	S	S	R
935	G/27 anos	2015	Sec. Vaginal	Ib	S	S	R
958	G/29 anos	2016	Sec. Vaginal	V	S	S	S
997	G/20 anos	2017	Sec. Vaginal	II	S	S	I
1001	G/28 anos	2017	Sec. Vaginal	Ia	S	S	R
1005	G/27 anos	2018	Sec. Vaginal	V	S	S	S
1006	G/22 anos	2018	Sec. Vaginal	II	S	S	R

RN: Recém Nascido; G: Gestante; F: Sexo feminino; M: sexo masculino // Sec. Orof.: Secreção de orofaringe; Sec. Uret.: Secreção uretral; Sec. Vaginal.: Secreção vaginal. // Cps: tipo capsular. // S: Sensível; R: Resistente; I: Resistência intermediária; Clin: Clindamicina; Eri: Eritromicina; Tet: tetraciclina.

A tabela 3 traz informações que facilitam a visualização da distribuição das amostras, em relação ao espécime onde foram isoladas e os tipos capsulares.

Tabela 3: Distribuição das amostras em função dos espécimes clínicos e tipo capsular

Origem Cps	Sangue	Urina	Esperma	Sec. Vaginal	Sec. Orof.	Sec. Uretral	Total
Ia	2	2	-	2	2	-	8
Ib	1	1	-	1	1	-	4
II	-	2	-	2	-	2	6
III	2	1	1	1	1	-	6
IV	-	1	-	1	-	-	2
V	1	1	2	2	-	-	6
Total	6	8	3	9	4	2	32

Cps: tipo capsular; Sec. Vaginal: Secreção vaginal; Sec. Orof.: Secreção de orofaringe; Sec. Uretral: Secreção uretral.

As amostras bacterianas, estocadas a -20 °C em solução de leite desnatado a 10% (Nestlé, Araçatuba, SP, Brasil) e glicerol a 10% (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), foram reativadas por semeadura em meio Ágar Sangue (AS), preparado com Base Agar Sangue (BBL-BD, Sparks, MD, EUA) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro, e posteriormente incubadas por 20 h a 35 °C.

3.2. CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR

Ainda que a maioria das amostras já houvesse sido previamente identificada com a utilização dos testes fenotípicos convencionais (observação das características coloniais, teste de CAMP) as mesmas, após a reativação, foram submetidas à confirmação da espécie, usando-se os testes.

3.2.1. Confirmação da espécie

Para confirmação da espécie, foi feita a prova da hidrólise do hipurato de sódio. A partir do crescimento no AS, as colônias suspeitas das amostras foram inoculadas em caldo BHI (“Brain Heart Infusion”, Merck, Darmstadt, Alemanha) contendo 1% de hipurato de sódio (Inlab, São Paulo, SP) e incubadas a 35 °C por 24 h. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 2000 rotações por minuto (RPM) durante 10 minutos (min). Um total de 0,8 mL do sobrenadante foi transferido para outro tubo e neste novo tubo foi adicionado 0,2 mL de cloreto férrico a 10% (Vetec, Duque de Caxias, RJ). Após homogeneização dos tubos, a ocorrência de precipitado, resultante da hidrólise do hipurato pela atividade da enzima hipuricase, indicou o resultado positivo (FACKLAM; WILKINSON, 1981). As amostras utilizadas como controles da reação foram *S. agalactiae* ATCC 13813 como controle positivo e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 como controle negativo.

3.2.2. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA)

Duas amostras que não dispunham de resultados prévios foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA), pelo método de disco-difusão em Agar Mueller-Hinton (Difco-BD, Sparks, MD, EUA) suplementado com 5% de sangue de carneiro (MHA-S). Foram testados os antimicrobianos: eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg) e tetraciclina (30 µg) (Cecon, São Paulo, SP, Brasil). A realização do TSA, bem como sua interpretação, se deram conforme as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2018). De acordo com estas recomendações e com o intuito de visualizar os fenótipos de resistência aos macrolídeos (M, MLS_{Bi} e MLS_{Bc}), os discos de eritromicina e clindamicina foram dispostos a uma distância de 12 mm. Os insumos (meio de cultura e discos), foram previamente submetidos ao controle de qualidade segundo as recomendações do CLSI 2018.

3.3. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

3.3.1. Determinação do tipo capsular

Seis amostras que ainda não haviam sido previamente caracterizadas quanto ao tipo capsular foram submetidas à determinação dos tipos capsulares, pela PCR, seguindo recomendações previamente descritas (POYART *et al.*, 2007; MURAYAMA *et al.* 2009). O DNA molde foi obtido conforme recomendações prévias (BEALL *et al.*, 1996), com modificações. A partir do crescimento em AS, foi preparada uma suspensão equivalente à escala 3 de McFarland, em 300 µL de solução fisiológica estéril. As suspensões foram centrifugadas a 5000 RPM por 5 min e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o sedimento foi ressuspensão em 200 µL de tampão TE acrescentado de 2,5 µL de solução de mutanolisina (2000 U/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). As amostras foram incubadas a 35 °C por 30 min e posteriormente a 100 °C por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 3000 RPM por 30 segundos, e imediatamente congeladas ou utilizadas no mix da reação. Nas tabelas 4 e 5 estão descritas as sequências dos iniciadores e a concentração dos reagentes (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) utilizados na reação. Como controle positivo interno foi incluído o gene *dltS*, presente em todas as amostras de *S. agalactiae*. Amostras de referência de cada tipo capsular foram acrescentadas nas reações (RS Ia, RS Ib, RS II, RS III, RS IV, RS V). A reação de amplificação foi feita no termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e consistiu em 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 min), anelamento dos iniciadores (52 °C por 2 min) e extensão (72 °C por 2 min). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 0,5x (TBE 10x: Tris 1 M, Ácido bórico 1 M e EDTA 0,01 M) e os fragmentos correspondentes a estes produtos, visualizados após coloração com solução de brometo de etídio em luz ultravioleta (UV).

Tabela 4: Sequência dos iniciadores e tamanho esperado dos produtos de amplificação na determinação dos tipos capsulares de *Streptococcus agalactiae*

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento (pb)
Ia (F)	GGTCAGACTGGATTAATGGTATGC	521 e 1826
Ia (R)	GTAGAAATAGCCTATATACGTTGAATGC	
Ib (F)	TAAACGAGAATGGAATATCACAAACC	770
Ib (R)	GAATTAACCTCAATCCCTAAACAATATCG	
II (F)	GCTTCAGTAAGTATTGTAAGACGATAG	397
II (R)	GCTTCAGTAAGTATTGTAAGACGATAG	
III (F)	TCCGTACTIONACAACAGACTCATCC	1826
III (R)	AGTAACCGTCCATACATTCTATAAGC	
IV (F)	GGTGGTAATCCTAAGAGTGAAGTGT	578
IV (R)	CCTCCCCAATTTTCGTCCATAATGGT	
V (F)	GAGGCCAATCAGTTGCACGTAA	701
V (R)	AACCTTCTCCTTCACACTAATCCT	
<i>dltS</i> (F)	CTGTAAGTCTTTATCTTTCTCG	199
<i>dltS</i> (R)	TCCATTGCTTAGTCTCC	

(F): "forward", (R): "reverse"; pb: pares de base

Tabela 5: Reagentes utilizados na tipificação capsular de *Streptococcus agalactiae*

Reagente	Concentração na Reação
MgCl ₂	2,5 mM
Tampão	1 x
dNTP	0,2 mM
Iniciadores	0,8 µM
<i>Taq</i> DNA polimerase	0,625 U
H ₂ O	-
DNA	3 µL

3.3.2. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Todas as amostras foram submetidas à análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, que foi realizada a partir da digestão do DNA, segundo o protocolo previamente descrito (SOUZA *et al.*, 2013), com algumas modificações. As amostras foram semeadas em meio AS para obtenção do crescimento em cultura recente. Então, foram realizadas suspensões bacterianas com turvação equivalente à escala 3 de McFarland, em 500 µL de solução PIV (NaCl 1M, Tris-HCl 10 mM). A estas suspensões foi adicionado o mesmo volume de agarose “low melting point” (Promega, Madison, WI, EUA) para o preparo dos blocos de DNA. Após solidificação, os blocos foram transferidos para 2 mL de solução de lise (Tris-HCl 6 mM, NaCl 1M, desoxicolato de sódio 0,2%, lauril sarcosinato 0,5%, EDTA 100 mM, Brij 58 0,5%) com 5 mg/mL de lisozima (Amresco, Solon, OH, EUA) e incubados a 37 °C por 24 h. Posteriormente, a solução de lise foi removida e aos blocos foi adicionado 2 mL de solução ESP [EDTA 0,5M, lauril sarcosinato de sódio 1% e 10 µL de proteinase K 20 mg/mL (USB, Cleveland, OH, EUA)], seguida de incubação a 50 °C por 24 h. Esta etapa foi realizada novamente no dia seguinte e posteriormente foram realizadas lavagens consecutivas com o tampão TE (TRIS 10mM e EDTA 0,1mM) e incubação a 37 °C por 24 h. Um bloco de cada amostra foi submetido ao tratamento com a enzima de restrição *Sma*I (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% com o tampão TBE 0,5x, no equipamento CHEF DR III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Foram estabelecidos os seguintes parâmetros para a corrida: tempo de pulso crescente de 2 segundos a 30 segundos, com o tempo de corrida total de 24h, temperatura de 11 °C e voltagem de 6 V/cm. O gel foi corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz UV. As imagens foram foto-documentadas, os perfis de PFGE de acordo com os tipos capsulares foram analisados por inspeção visual e a diversidade genética entre as amostras foi avaliada através do programa Gel-J (HERAS *et al.*, 2015), gerando dendrogramas para comparação dos perfis. A análise dos dendrogramas foi utilizada para categorizar as amostras em grupos clonais, designado como um grupo de amostras que compartilharam pelo menos 80% de similaridade entre si, e perfis únicos de fragmentação.

3.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA

3.4.1. Investigação dos genes *bac* e *bca*

Todas as amostras foram submetidas à investigação dos genes *bac* e *bca*, que codificam, respectivamente, o antígeno beta e a proteína C. A obtenção do DNA bacteriano seguiu as recomendações descritas previamente (BEALL *et al.*, 1996), conforme descrito no item 3.3.1. As sequências dos iniciadores (DMITRIEV *et al.*, 2002) e a concentração dos reagentes (Thermo Scientific) são descritas nas tabelas 6 e 7. A amplificação da reação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 s), anelamento dos iniciadores (50 °C por 1 min) e extensão (72 °C por 1 min). Como controle positivo interno foi incluído o gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico, como forma de certificação da presença de DNA bacteriano. A amostra 03, que faz parte deste estudo, já havia sido previamente caracterizada por albergar os genes *bac* e *bca* e foi utilizada como controle positivo na investigação destes genes nas demais amostras. A reação de amplificação do DNA se deu no mesmo equipamento descrito no item 3.3.1. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5x e os fragmentos correspondentes a estes produtos, visualizados sob luz UV após coloração com solução de brometo de etídio.

Tabela 6: Sequência dos iniciadores e tamanho esperado dos produtos de amplificação na determinação dos genes de virulência

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>bac</i> (F)	TGTAAAGGACGATAGTGTGAAGAC	530
<i>bac</i> (R)	CATTTGTGATTCCCTTTTGC	
<i>bca</i> (F)	CAGAGTACAGGAAGGGCTAGTC	183
<i>bca</i> (R)	TTCTTCCGTCCACTTAGGATC	
16S (F)	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	715
16S (R)	CACGACACGAGCTGACGACA	

(F): "forward", (R): "reverse"; pb: pares de base

Tabela 7: Reagentes utilizados na investigação de determinantes genéticos de virulência *bac* e *bca*, e 16S rRNA

Reagente	Concentração na Reação
MgCL ₂	2 mM
Tampão	1x
dNTP	0,2 mM
Iniciadores	0,5 µM
<i>Taq</i> DNA Polimerase	1U
H ₂ O	-
DNA	5 µL

3.4.2. Investigação da expressão fenotípica da toxina beta-hemolisina/citolisina (β-H/C)

A expressão de β-H/C foi avaliada baseada nas recomendações de Nizet *et al.* (1996) e Burcham *et al.* (2019). As amostras foram cultivadas em caldo Todd-Hewitt (“Todd Hewitt Broth” – THB, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), até atingirem densidade óptica (DO) em 600 nm variando de 0,2 a 0,3. Inoculou-se 10 µL das suspensões bacterianas na superfície do meio Columbia acrescido de 5% de sangue de carneiro (Newprov, Pinhais, PR, Brasil) e incubou-se em atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C por 20h. Foi feita a análise visual comparativa das amostras, em dois experimentos independentes e por duas pessoas, a fim de classificá-las como produtoras fraca, moderada ou forte.

3.4.3. Avaliação da capacidade de produção de biofilme

A produção de biofilme em poliestireno foi avaliada utilizando-se microplacas de 96 poços, de acordo com recomendações de Alvim *et al.* (2019), com modificações. A padronização do inóculo bacteriano foi feita, a partir de cultura recente, em caldo THB acrescido de 1% de glicose (THB-G), até alcançar a turbidez da escala 2 de McFarland. Os inóculos foram diluídos em 1:40 em THB-G e 200 µL da suspensão diluída de cada amostra foram inoculados em triplicata em microplacas Falcon (Corning Inc., Corning, NY, EUA), seguido por incubação a 35 °C por 20 h. O meio de cultura puro foi o controle negativo. Após o período de incubação, o sobrenadante foi

aspirado e os poços foram lavados duas vezes com solução salina fisiológica estéril. A microplaca foi submetida ao aquecimento a 70 °C por 1 h para a completa secagem de todos os poços. A seguir, adicionou-se 200 µL de solução de cristal violeta 0,1% e incubou-se por 10 min à temperatura ambiente. O corante foi drenado e a placa lavada duas vezes com 200 µL de água destilada. Depois de secar a 70 °C, foi adicionado a cada poço 200 µL de etanol 95%. A leitura se deu em comprimento de onda de 550 nm no leitor de microplacas (Thermoplate - Model TP-Reader NM SN 14113). Os valores médios da DO obtida em triplicata para cada amostra, em dois experimentos independentes, foram utilizados para a análise da produção de biofilme.

A classificação das amostras quanto à capacidade de produzir biofilme se deu de acordo com os critérios de Stepanovic *et al.* (2000). Primeiramente, foi estabelecido o valor de “cut-off” da densidade óptica (DOc), representada pela média DO_{550nm} dos poços do controle negativo mais três vezes o desvio padrão do controle negativo. Em seguida, a média dos valores de DO de cada amostra foi comparada ao valor de DOc, de acordo com a tabela 8.

Tabela 8: Classificação da produção de biofilme, conforme os valores da DO das amostras

Classificação	Relação DO amostra x Doc
Não-produtoras	$DO \leq DOc$
Produtoras fracas	$DOc < DO \leq 2 \times DOc$
Produtoras moderadas	$2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$
Produtoras fortes	$4 \times DOc < DO$

DO: densidade óptica

3.5. AVALIAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DE TEMPO DE GERAÇÃO/TAXA DE CRESCIMENTO

Foi realizada a curva de crescimento de cada amostra, baseada nas recomendações de Nie *et al.* (2018), com modificações. A partir de cultura recente em AS, foi feita a padronização de suspensões nos meios THB e THB-G, equivalente a escala 0,5 de McFarland. As suspensões foram diluídas 1:10 em 3 mL dos meios THB e THB-G e imediatamente submetidas à leitura da DO em comprimento de onda 600

nm, em espectrofotômetro (Spec 20MV, Coml. Indl. Dourado Ltda), assim denominado tempo (T) 0h. As suspensões foram incubadas em condições estáticas a 37°C e foi feita a leitura da DO_{600nm} nos intervalos de tempo subsequentes (T1h, T2h, T3h, T4h, T5h, T6h e T24h). Após o término das leituras, os valores obtidos foram inseridos em planilhas do software Excel, para o cálculo da média e do desvio padrão e para a construção de gráficos que permitissem a visualização da fase log. Os valores de DO nos intervalos da fase log foram utilizados para calcular o tempo de geração e a taxa de crescimento, usando o programa on-line Doubling Time (<https://doubling-time.com/compute.php>), ferramenta Cell Calculator ++.

3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se diferentes metodologias, disponíveis em programas on-line.

- Teste exato de Fisher (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>): utilizado para analisar a associação entre a expressão moderada ou forte de β -H/C e amostras oriundas de infecção e de colonização, respectivamente; analisar a detecção de *bac* e *bca* em função da origem das amostras e de cada tipo capsular, individualmente; analisar o padrão de biofilme em função da origem das amostras.
- Teste t de Student (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/>): utilizado para avaliar a cinética de crescimento das amostras em função de sua origem e do meio de cultura; avaliar o tempo de geração das amostras em função da origem.
- Teste do qui-quadrado (http://www.physics.csbsju.edu/stats/contingency_NROW_NCOLUMN_form.html): utilizado para analisar a distribuição dos padrões de β -H/C de acordo com o espécime clínico em que as amostras foram isoladas e o tipo capsular; analisar o padrão de biofilme em função do tipo capsular; analisar a detecção de *bac* e *bca* em função dos espécimes.
- Análise de variância (ANOVA) (<https://goodcalculators.com/one-way-anova-calculator/>): utilizado para avaliar a cinética de crescimento e o tempo de geração das amostras em função do tipo capsular.

4. RESULTADOS

As amostras foram submetidas à análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico, pela técnica de PFGE. Os perfis de fragmentação do DNA apresentaram de cinco a treze bandas. Estes foram avaliados visualmente sob iluminação UV e submetidos à análise computadorizada, através do programa Gel-J. Grupo clonal foi designado como um grupo de amostras que compartilharam pelo menos 80% de similaridade entre si e é representado por algarismos, enquanto que o perfil único é representado por letras maiúsculas.

Sete das oito amostras pertencentes ao tipo capsular Ia foram distribuídas em dois grupos clonais (1 e 2), sendo observados quatro perfis de PFGE, representados na figura 1. Dentre as amostras desse tipo capsular, foram detectadas amostras idênticas, isoladas de diferentes espécimes clínicos, associados à infecção e à colonização. Uma amostra, entre as oito, não gerou perfil de fragmentação de DNA quando tratada com *Sma*I.

As quatro amostras pertencentes ao tipo capsular Ib geraram perfis relacionados e, portanto, foram reunidas no mesmo grupo clonal (3), distribuídas em dois perfis de PFGE, representados na figura 2. Três amostras foram ordenadas em um mesmo perfil, oriundas de diferentes espécimes, associados a quadros de colonização e de infecção.

As seis amostras do tipo capsular II apresentaram perfis distintos e foram distribuídas em quatro grupos clonais (4 - 7), representados na figura 3. Duas amostras (850 e 962) oriundas de quadros de infecção reuniram-se no mesmo grupo clonal.

Com relação ao tipo capsular III, as seis amostras foram distribuídas em cinco grupos clonais (8 - 12), representados na figura 4. Duas amostras isoladas de sangue de recém-natos, em 2005 (27) e em 2019 (1021), apresentaram o mesmo perfil de restrição do DNA (12A).

As duas amostras pertencentes ao tipo capsular IV foram reunidas em um único grupo clonal (13), oriundas de diferentes espécimes, associados à colonização e infecção. Por fim, as seis amostras pertencentes ao tipo capsular V geraram seis perfis de PFGE, distribuídos em quatro grupos clonais (14 - 17). Um grupo reuniu duas amostras oriundas de quadros de infecção, enquanto que o outro reuniu uma amostra

oriunda de colonização e uma de infecção. O dendrograma das amostras dos tipos capsulares IV (indicadas por asterisco) e V está representado na figura 5.

Informações sobre a distribuição dos pulsotipos estão listadas na tabela 9. Entre as amostras selecionadas para o estudo, quatro (12,5%) eram resistentes ou intermediárias a pelo menos dois dos três antimicrobianos. Essas amostras estão representadas na tabela 9 com asterisco. Três das quatro amostras foram originadas de sítio de infecção (urina e esperma).

Tabela 9: Grupos clonais, perfis de PFGE, tipos capsulares e espécimes clínicos das 31 amostras de *Streptococcus agalactiae*

Grupo clonal	Perfil PFGE	Tipo capsular	Amostra	Espécime clínico
1	1 A	Ia	965	Sec. Orof.
	1 B	Ia	869, 1001	Urina, Sec. Vag.
	1 C	Ia	47, 925, 1000	Sangue, Sec. Vag., Urina
2	2 A	Ia	39	Sangue
3	3 A	Ib	935, 976, 996	Sec. Vag., Sec. Orof., Urina
	3 B	Ib	03	Sangue
4	4 A	II	400	Sec. Uretral
5	5 A	II	242*	Sec. Uretral
6	6 A	II	1006	Sec. Vaginal
7	7 A	II	997	Sec. Vaginal
	7 B	II	850	Urina
	7 C	II	962	Urina
8	8 A	III	946	Sec. Orof.
9	9 A	III	708*	Urina
10	10 A	III	882	Sec. Vaginal
11	11 A	III	265	Esperma
12	12 A	III	27, 1021	Sangue
13	13 A	IV	368	Urina
	13 B	IV	253	Sec. Vaginal
14	14 A	V	1005	Sec. Vaginal
15	15 A	V	755*	Urina
	15 B	V	277*	Esperma
16	16 A	V	234	Esperma
17	17 A	V	958	Sec. Vaginal
	17 B	V	40	Sangue

Infecção: Sangue, Esperma, Urina. Colonização: Sec. vaginal: secreção vaginal; Sec. uretral: secreção uretral; Sec. orof: secreção orofaríngea; *: amostras resistentes aos antimicrobianos

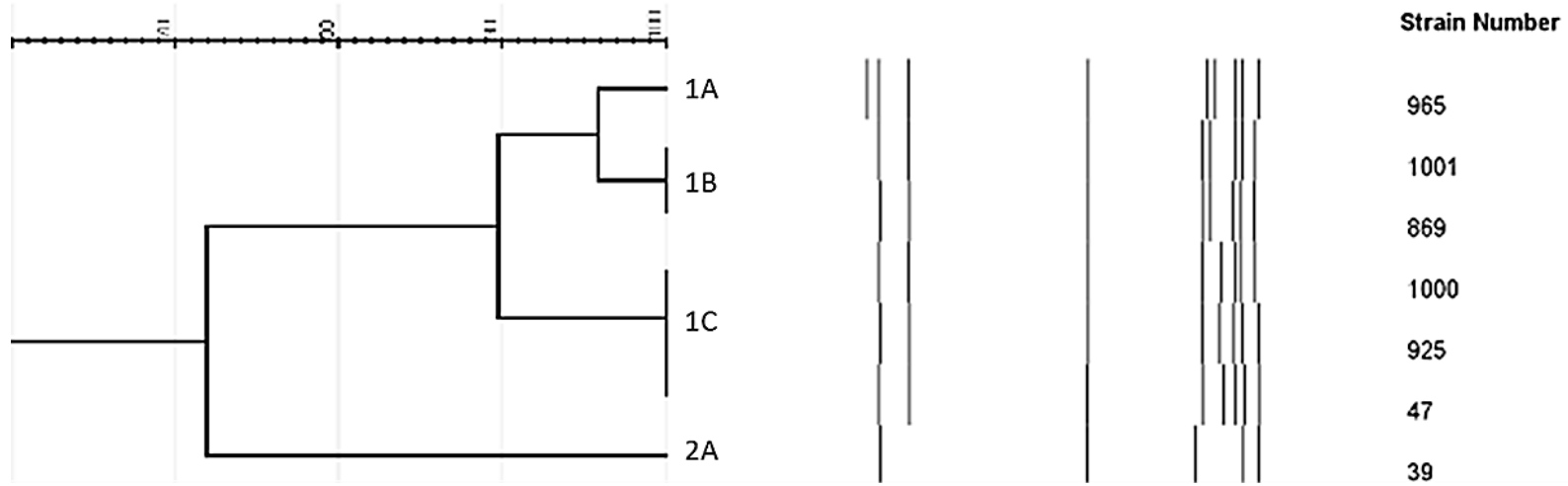


Figura 1: Dendrograma das amostras do tipo capsular 1a e seus perfis de PFGE

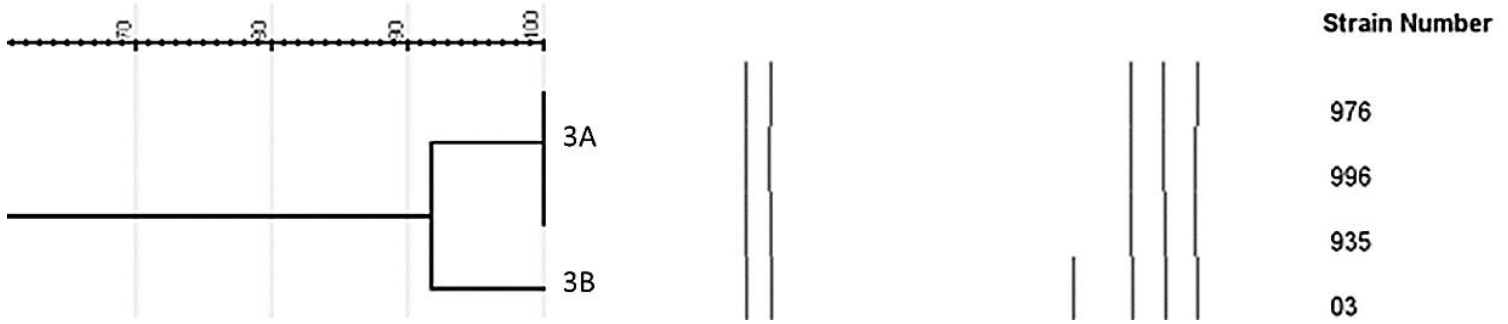


Figura 2: Dendrograma das amostras do tipo capsular 1b e seus perfis de PFGE

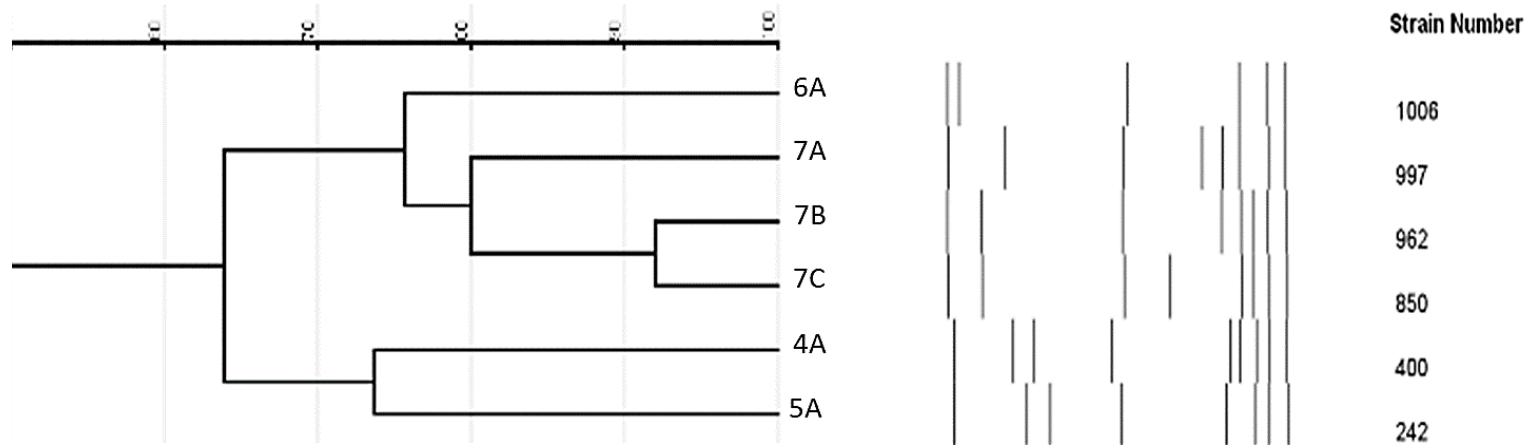


Figura 3: Dendrograma das amostras do tipo capsular II e seus perfis de PFGE



Figura 4: Dendrograma das amostras do tipo capsular III e seus perfis de PFGE

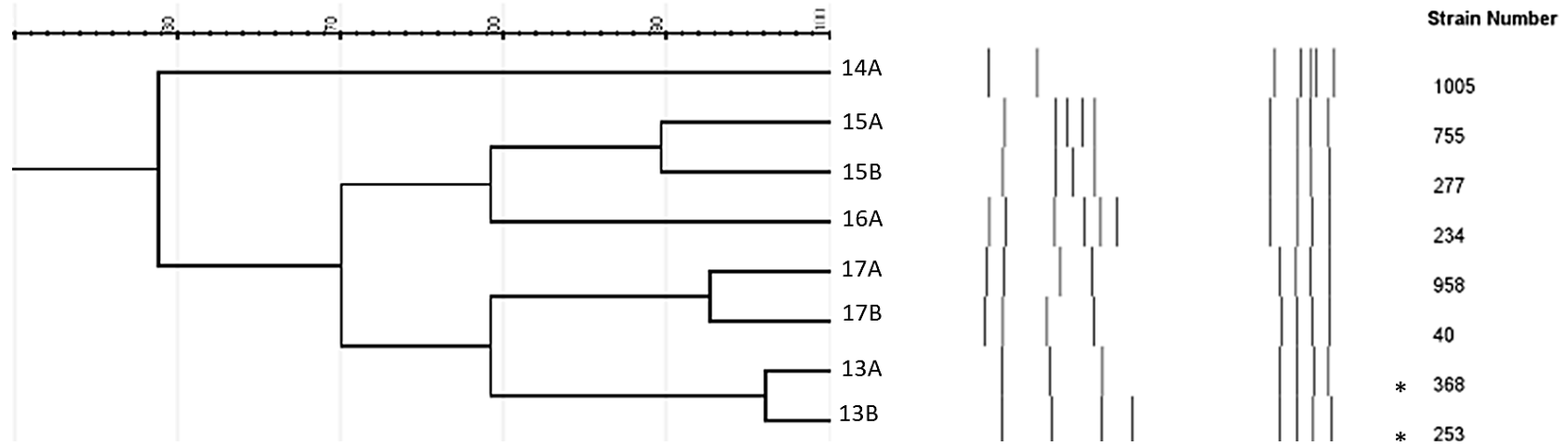


Figura 5: Dendrograma das amostras dos tipos capsulares IV e V e seus perfis de PFGE

Dentre as 32 amostras analisadas, apenas nove (28,1%) foram positivas para os genes *bac* e/ou *bca*. O gene *bac*, que codifica o antígeno beta, foi encontrado em seis amostras (18,8%), três oriundas de sítio de colonização e três de sítio de infecção, enquanto o gene *bca*, que codifica a proteína C alfa, foi detectado em oito amostras (25%), seis de sítio de colonização e duas de infecção. Cinco amostras albergaram ambos os genes, três amostras originadas de quadro de colonização e duas de infecção. As amostras em que foram detectados os genes *bac* e/ou *bca* estão listadas na tabela 10.

Tabela 10: Amostras em que os genes *bac* e/ou *bca* foram detectados

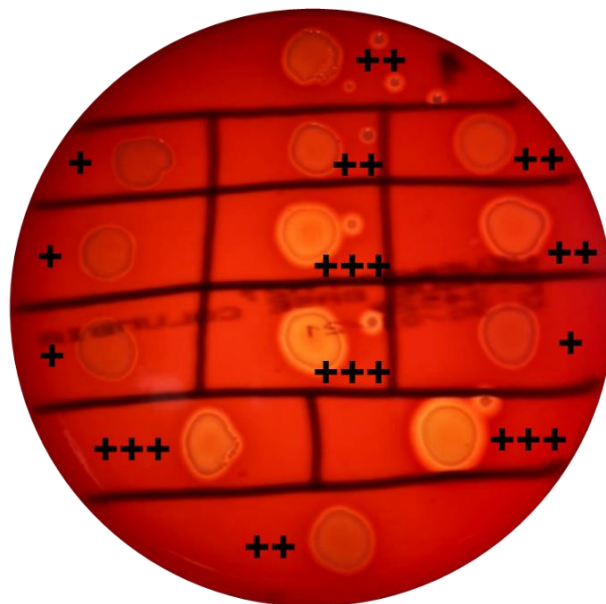
Amostras	Origem da amostra	Tipo capsular	<i>bac</i>	<i>bca</i>
03	Sangue	Ib	+	+
935	Secreção Vaginal	Ib	+	+
976	Secreção Orofaringea	Ib	+	+
996	Urina	Ib	+	+
1006	Secreção Vaginal	II	+	+
368	Urina	IV	+	-
400	Secreção Uretral	II	-	+
1005	Secreção Vaginal	V	-	+
963	Secreção Orofaringea	Ia	-	+

O tipo Ib apresentou associação significativa com *bac* ($p=0,0004$) e *bca* ($p=0,0019$), uma vez que ambos os genes foram encontrados em 100% das amostras desse tipo capsular. Não foi observada associação significativa entre *bac* e *bca* e outros tipos capsulares. Entretanto, foi observado que amostras isoladas de colonização albergaram o gene *bca* em uma frequência maior que amostras de infecção (40% das amostras de colonização e 11,8% das amostras de infecção), porém tal tendência não foi significativa ($p=0,1058$).

Considerando que a falta de significância estatística da associação *bca* x colonização poderia estar relacionada à pequena amostragem, os dados foram analisados em conjunto com um grupo externo de 30 amostras, isoladas de quadros de infecção (21) e de colonização (9), que fizeram parte de um estudo anterior e tinham resultados de tipificação capsular e investigação de *bca* (SOUZA *et al.* 2013).

No total de 62 amostras, 10 (16,1%) albergaram o gene *bca* e, dentre estas, oito foram provenientes de sítios de colonização. Assim, foi possível observar que o gene *bca* foi significativamente associado a amostras de colonização ($p=0,0097$).

A análise da expressão fenotípica de β -H/C mostrou seis amostras fortes produtoras, 21 produtoras moderadas e cinco produtoras fracas. A figura 6 traz os diferentes padrões de hemólise observados. De forma geral, não foi observada associação significativa entre o padrão de expressão de β -H/C e a origem das amostras ($p=0,078$). Entretanto, ainda que não sejam significativas, algumas tendências podem ser observadas. Das seis amostras que apresentaram forte atividade hemolítica, cinco (83,3%) foram provenientes de sítios de colonização ($p=0,0755$). Entre amostras de colonização não se observa um padrão predominante (forte 33,3%; moderado 46,7%; fraco 20%), já entre amostras de infecção, a maioria (82,4%) expressou o padrão moderado de β -H/C ($p=0,0617$). Não foi observada significância estatística ($p=0,267$) na expressão de β -H/C entre os tipos capsulares.



+: atividade hemolítica fraca; ++: atividade hemolítica moderada; +++: atividade hemolítica forte.

Figura 6: Avaliação da expressão fenotípica de β -H/C por análise visual da hemólise em meio AS

A avaliação da capacidade de produção de biofilme foi realizada interpretando-se os valores de densidade óptica obtidos. Das 32 amostras, 21 foram fortes produtoras de biofilme (65,6%) e 11 (34,4%) foram produtoras moderadas. Dentre as 17 amostras provenientes de sítios de infecção, 13 (76,5%) foram fortes produtoras de biofilme e quatro (23,5%) foram moderadas, enquanto entre as 15 amostras de sítios de colonização, oito (53,3%) foram fortes e sete (46,7%) foram produtoras moderadas. De forma geral, não foi observada associação significativa entre a produção de biofilme e a origem (colonização x infecção) das amostras ($p=0,2662$). Entretanto, analisando individualmente os espécimes clínicos, foi possível observar que todas as amostras isoladas de urina foram fortes produtoras de biofilme ($p=0,0292$). Não foi observada associação significativa entre a produção de biofilme e os tipos capsulares ($p=0,615$); porém, foi observado que amostras pertencentes aos tipos capsulares II (83,3%) e IV (100%) apresentaram-se forte produtoras de biofilme. Os dados de expressão de β -H/C e de produção de biofilme são apresentados na tabela 11.

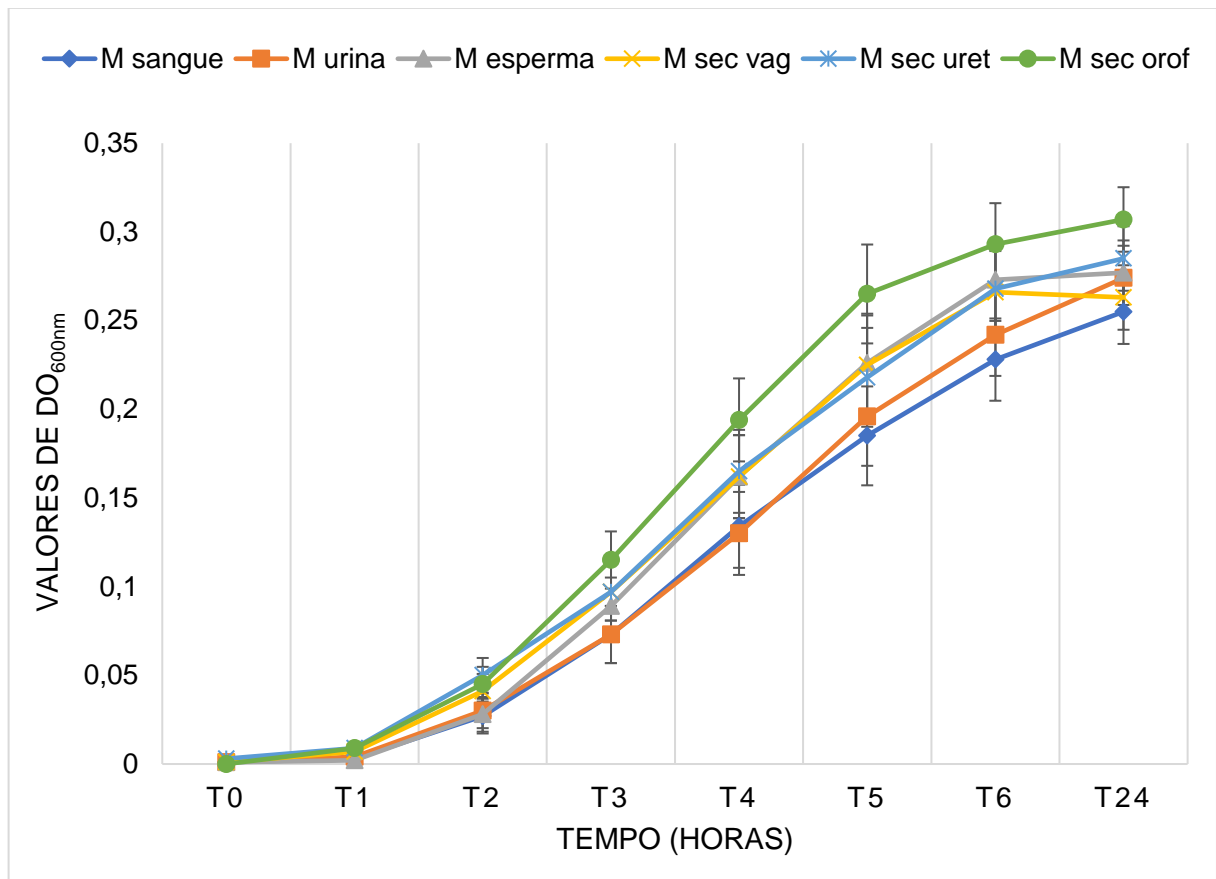
Tabela 11: Expressão de β -hemolisina/citolisina e produção de biofilme das amostras

Amostra	Origem da amostra	Tipo capsular	Expressão de β-H/C	Produção de biofilme
253	Sec. Vaginal	IV	Forte	Forte
946	Sec. Orof.	III	Forte	Forte
963	Sec. Orof.	Ia	Forte	Forte
996	Urina	Ib	Forte	Forte
1001	Sec. Vaginal	Ia	Forte	Moderada
1005	Sec. Vaginal	V	Forte	Moderada
03	Sangue	Ib	Moderada	Forte
265	Esperma	III	Moderada	Forte
368	Urina	IV	Moderada	Forte
708	Urina	III	Moderada	Forte
755	Urina	V	Moderada	Forte
850	Urina	II	Moderada	Forte
869	Urina	Ia	Moderada	Forte
925	Sec. Vaginal	Ia	Moderada	Forte
935	Sec. Vaginal	Ib	Moderada	Forte
962	Urina	II	Moderada	Forte
1000	Urina	Ia	Moderada	Forte
1006	Sec. Vaginal	II	Moderada	Forte
1021	Sangue	III	Moderada	Forte
27	Sangue	III	Moderada	Moderada
39	Sangue	Ia	Moderada	Moderada
47	Sangue	Ia	Moderada	Moderada
234	Esperma	V	Moderada	Moderada
882	Sec. Vaginal	III	Moderada	Moderada
958	Sec. Vaginal	V	Moderada	Moderada
965	Sec. Orof.	Ia	Moderada	Moderada
976	Sec. Orof.	Ib	Moderada	Moderada
40	Sangue	V	Fraca	Forte
242	Sec. Uretral	II	Fraca	Forte
277	Esperma	V	Fraca	Forte
400	Sec. Uretral	II	Fraca	Forte
997	Sec. Vaginal	II	Fraca	Moderada

β -H/C: β -hemolisina/citolisina; Sec.: secreção; Orof.: orofaríngea.

O crescimento bacteriano em meio de cultura com e sem glicose foi monitorado durante 24 h, nos intervalos de tempo de 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h e 24 h, a fim de se analisar o comportamento individual de cada amostra. Amostras oriundas de sítios de colonização começaram a crescer (até 3 h) significativamente ($p < 0,05$) mais rápido do que as amostras de infecção. Considerando que EGB presente em esperma está associado a infecções crônicas, ao retirar os dados relativos a este espécime, foi possível observar diferenças significativas de densidade bacteriana entre amostras de

colonização e infecção aguda (sangue e urina) durante praticamente todo o intervalo inicial (seis primeiras horas) avaliado. Todas as amostras, com exceção de duas de sangue e uma de urina, não concluíram a fase log em 6h de incubação, o que aumentou a média do tempo de geração das amostras de infecção. A figura 7 ilustra a cinética de crescimento bacteriano, obtida a partir da média da densidade óptica das amostras provenientes de diferentes espécimes clínicos.



M: média; sec vag: secreção vaginal; sec uret: secreção uretral; sec orof: secreção orofaríngea. As linhas verticais correspondem ao desvio padrão.

Figura 7: Cinética de crescimento de amostras provenientes de diferentes espécimes clínicos

Com a construção dos gráficos de cinética de crescimento, foi possível visualizar a fase log, na qual ocorre a divisão celular e geração de novas células com o máximo de eficiência, e calcular o tempo de geração (TG) e a taxa de crescimento (TC) de cada amostra. Os dados estão dispostos na tabela 12, em ordem crescente.

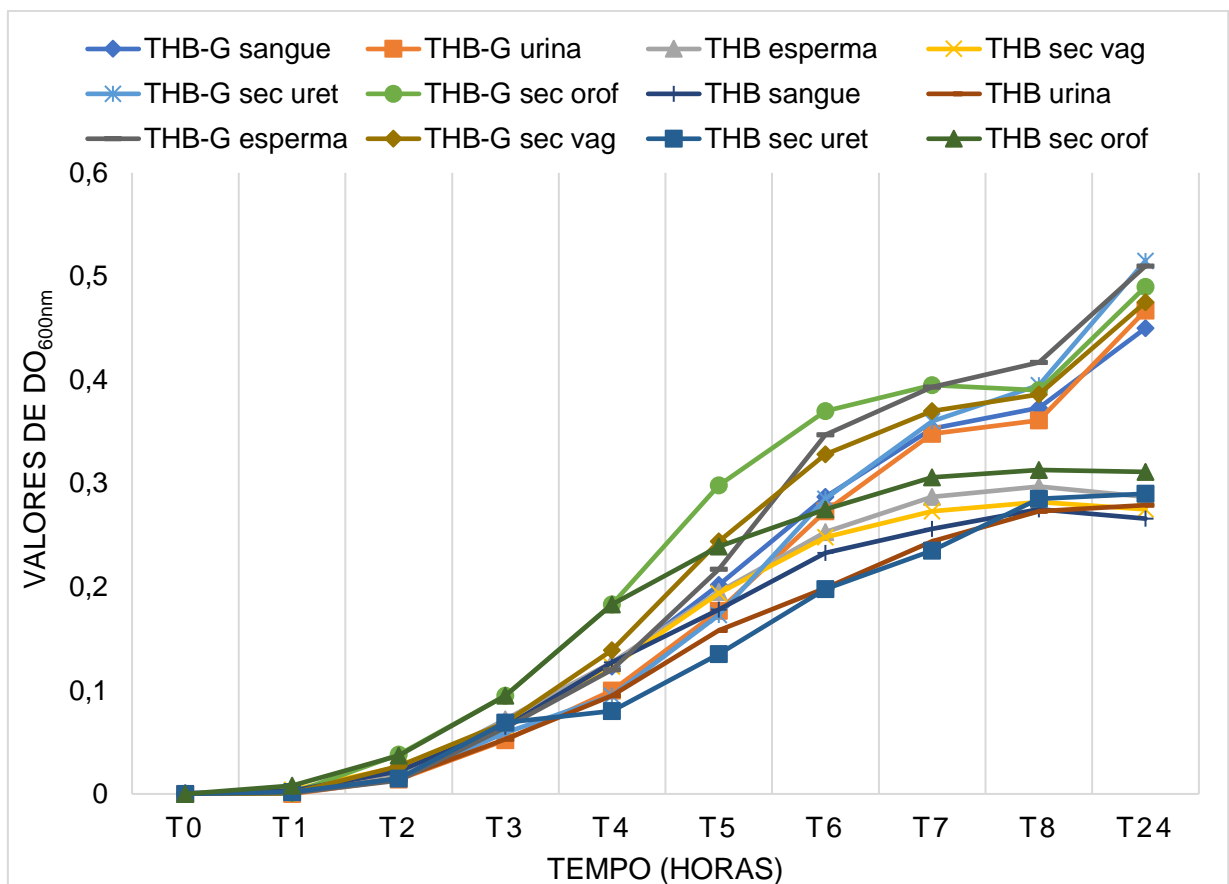
Tabela 12: Valores de tempo de geração e taxa de crescimento das amostras, espécime clínico e tipo capsular

Amostra	Origem da amostra	Tipo capsular	Tempo de geração (min)	Taxa de crescimento
03	Sangue	Ib	67,8	0,615
976	Sec. Orof.	Ib	67,8	0,611
708	Urina	III	67,8	0,614
368	Urina	IV	71,4	0,584
963	Sec. Orof.	Ia	73,8	0,564
27	Sangue	III	78,6	0,53
996	Urina	Ib	78,6	0,528
265	Esperma	III	79,2	0,524
1001	Sec. Vaginal	Ia	81	0,513
965	Sec. Orof.	Ia	82,2	0,51
882	Sec. Vaginal	III	84	0,494
1000	Urina	Ia	84	0,494
1006	Sec. Vaginal	II	85,8	0,485
277	Esperma	V	88,2	0,471
869	Urina	Ia	88,8	0,469
253	Sec. Vaginal	IV	89,4	0,465
234	Esperma	V	93	0,447
47	Sangue	Ia	93,6	0,444
755	Urina	V	94,2	0,442
1021	Sangue	III	94,2	0,442
242	Sec. Uretral	II	94,8	0,439
850	Urina	II	97,2	0,427
925	Sec. Vaginal	Ia	98,4	0,422
935	Sec. Vaginal	Ib	99	0,42
40	Sangue	V	101,4	0,41
946	Sec. Orof.	III	103,2	0,402
1005	Sec. Vaginal	V	103,2	0,402
958	Sec. Vaginal	V	103,8	0,4
997	Sec. Vaginal	II	106,8	0,39
400	Sec. Uretral	II	108,6	0,383
962	Urina	II	112,2	0,37
39	Sangue	Ia	176,4	0,236

A média do TG das amostras foi de 92,14 min. Ainda que não tenha sido possível observar associação significativa ($p=0,9963$) entre espécime no qual a amostra foi isolada e o seu TG, observa-se que amostras isoladas de secreção orofaríngea tiveram menor TG (81,6 min), seguido de esperma e urina (86,8 min), secreção vaginal (94,8 min) e por fim, sangue e secreção uretral (102 min). Com relação à produção de biofilme, entre as 20 amostras fortes produtoras, 11 (55%) apresentaram o tempo de geração menor do que o valor médio (92,14 min), enquanto das 11 amostras produtoras moderadas, sete (63,6%) apresentaram valores menores

que a média ($p=0,217$). Avaliando o tempo de geração das amostras em função de seus tipos capsulares, não foi possível observar associações significativas ($p=0,35$). No entanto, foi visto que amostras dos tipos Ib, IV e III, apresentaram as menores médias de TG.

O efeito da glicose na cinética de crescimento das amostras foi avaliado em concomitância com o monitoramento do crescimento em THB. A figura 8 mostra o crescimento comparativo das amostras em THB e THB-G. Observa-se que a partir de 5 h de incubação, a densidade bacteriana das amostras cultivadas em meio THB-G foi tornando-se visualmente maior do que das amostras cultivadas em THB, e a partir de 6h, esta diferença tornou-se significativa ($p<0,05$). Além disso, observa-se crescimento contínuo das amostras em THB-G até o fim do experimento (24 h), enquanto que as amostras cultivadas em THB atingem estabilidade em torno das 5-6h de incubação, o que indica que a presença de glicose oferece mais nutrientes ao meio, permitindo a geração de novas células durante mais tempo.



THB: caldo Todd-Hewitt; THB-G: caldo Todd-Hewitt acrescido 1% de glicose; sec vag: secreção vaginal; sec uret: secreção uretral; sec orof: secreção orofaríngea

Figura 8: Cinética de crescimento das amostras oriundas de diferentes espécimes clínicos, incubadas em THB e em THB-G

Oito das 32 (25%) amostras analisadas se destacaram por apresentarem a maioria dos fatores associados à virulência abordados nesse estudo (genes *bac* e/ou *bca*, forte expressão de β -H/C e de produção de biofilme), assim como maior capacidade de adaptação ambiental (TG abaixo da média de 92,1 min). Estas amostras são listadas na tabela 13. Todas as amostras pertencentes ao tipo capsular Ib e ao grupo clonal 3 foram reunidas entre as amostras com maior potencial de virulência.

Tabela 13: Amostras que reúnem a maioria dos fatores associados à virulência e à adaptação ambiental avaliados

Amostra	Origem	CPS	<i>bac</i>	<i>bca</i>	β -H/C	Biofilme	TG (min)	PFGE
996	Urina	Ib	+	+	Forte	Forte	78,6	3
03	Sangue	Ib	+	+	Mod	Forte	67,8	3
1006	Sec Vag	II	+	+	Mod	Forte	85,8	6
963	Sec Orof	Ia	-	+	Forte	Forte	73,8	-
935	Sec Vag	Ib	+	+	Mod	Forte	99	3
976	Sec Orof	Ib	+	+	Mod	Mod	67,8	3
368	Urina	IV	+	-	Mod	Forte	71,4	13
253	Sec Vag	IV	-	-	Forte	Forte	89,4	13

CPS: tipo capsular; β -H/C: expressão de beta-hemolisina/citolisina; TG: tempo de geração (em minutos); PFGE: grupo clonal de PFGE; sec vag: secreção vaginal; sec orof: secreção orofaríngea; Mod: moderada.

5. DISCUSSÃO

Este estudo buscou investigar o potencial de virulência de amostras de *Streptococcus agalactiae* provenientes de diferentes espécimes e, também, verificar se uma mesma cepa era capaz de colonizar e causar infecção em diferentes indivíduos. Para tal, foram estudadas amostras oriundas de quadros infecciosos e de colonização, que apresentavam os tipos capsulares mais frequentes.

Na prática clínica, *S. agalactiae* possui importância principalmente no contexto das doenças neonatais; porém, também são relatados quadros infecciosos em gestantes e indivíduos não-grávidos. A eficácia da profilaxia antibiótica intraparto em gestantes se limita à doença de início precoce e às parturientes que se encaixam no quadro de riscos. Assim, outras maneiras de prevenir a doença neonatal têm sido estudadas como, por exemplo, o desenvolvimento de vacinas voltadas para as gestantes. Os alvos vacinais precisam englobar as estruturas mais comuns de EGB; portanto, é importante caracterizar as amostras e avaliar os fatores bacterianos mais envolvidos no desenvolvimento dos quadros infecciosos.

A cápsula polissacarídica de *S. agalactiae* é uma das estruturas mais estudadas por desempenhar um papel fundamental como fator de virulência e por ser considerada o mais importante marcador epidemiológico. A diversidade de tipos capsulares tem sido utilizada como ferramenta para tipificar amostras, tanto em estudos de prevalência de colonização materna e de doença neonatal, como fora do contexto materno-infantil, especialmente em infecções invasivas de adultos não-grávidos. A partir da tipificação capsular foi possível estabelecer a prevalência global, dos tipos capsulares, com destaque para Ia, Ib, II, III e V. Estes correspondem a 98% dos tipos capsulares detectados, tanto na colonização materna como em infecções em neonatos e adultos, em todo o mundo (RUSSEL *et al.*, 2017; DO NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Diversos estudos apontam uma correlação entre o tipo capsular e a patogenicidade da espécie. Por exemplo, o tipo III é tradicionalmente associado à maioria dos casos de sepse e meningite na doença neonatal tardia (PHARES *et al.*, 2008). Já os tipos V e Ia são comumente associados a doenças invasivas em adultos e infecções em mulheres grávidas, respectivamente (PHARES *et al.*, 2008; EDWARDS *et al.*, 2011). Quanto à prevalência de cada tipo, diferenças geográficas

são observadas. No Brasil, segundo Dutra *et al.*, (2014), os tipos II, Ia e Ib foram os mais frequentes no Sudeste, enquanto que no Sul, destacaram-se os tipos Ia, II e IV. O tipo Ia predominou no Centro-Oeste, enquanto os tipos Ib e V foram os mais comuns nas regiões Nordeste e Norte, este último representado por pouquíssimas amostras. Observa-se uma falta de dados relacionados à região Norte do país, o que aponta a necessidade de se realizar mais estudos nesta região. A cápsula também vem sendo empregada como alvo para o desenvolvimento de vacinas; entretanto, a diversidade dos tipos capsulares, assim como o fenômeno de “capsular switching”, representam estratégias de evasão do sistema imune que podem dificultar o desenvolvimento de vacinas. Portanto, é importante que a distribuição dos tipos capsulares seja monitorada globalmente (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018).

Neste estudo, a técnica de PFGE, ferramenta robusta para avaliar a diversidade genética das amostras, foi empregada para investigar se uma mesma cepa era capaz de colonizar assintomaticamente e causar infecção em diferentes indivíduos; e também para avaliar a diversidade genética entre amostras epidemiologicamente não-relacionadas que expressavam o mesmo tipo capsular. Pôde-se observar maior homogeneidade entre amostras pertencentes aos tipos capsulares Ia, Ib e IV, e maior heterogeneidade entre amostras dos tipos II, III e V. Skjaervold *et al.* (2004) observaram homogeneidade no perfil de PFGE para as amostras dos tipos Ib, III e V, e heterogeneidade para amostras dos tipos Ia, II e IV. Já o estudo de Palmeiro *et al.* (2010) relataram perfis de PFGE similares entre amostras dos tipos Ia, IV, and V, enquanto amostras dos tipos Ib, II e III mostraram maior heterogeneidade. Pillai *et al.* (2009) também relataram maior heterogeneidade nesses tipos capsulares, e destacaram o tipo V como o mais homogêneo.

Entre amostras do tipo Ia e do tipo Ib, foi observado que uma mesma cepa estava envolvida em colonização e infecção. Também foram observadas amostras do tipo IV ou do tipo V, de origens diferentes, alocadas em um mesmo grupo clonal. Um mesmo tipo capsular pode estar envolvido com a colonização em alguns indivíduos, e com processos infecciosos em outros, o que enfatiza a complexidade da interação EGB-hospedeiro (FURFARO *et al.*, 2018). Amostras com o mesmo perfil de PFGE, porém obtidas de localização geográfica e/ou anatômica diferentes, sugerem a disseminação de algumas cepas específicas (MANNING, 2003; PILLAI *et al.*, 2009).

Estudos sugerem uma significativa relação clonal entre amostras isoladas de gestantes e recém-nascidos, assim como entre gêmeos e entre parceiros sexuais (EDWARDS *et al.*, 2011), e destacam o potencial do EGB em fazer a transição de colonizador assintomático a patógeno invasivo (YANG *et al.*, 2012; ARMISTEAD *et al.*, 2019). Neste estudo, uma amostra do tipo capsular Ib foi isolada de secreção orofaríngea de um indivíduo não-grávido. Acredita-se que a colonização orofaríngea por EGB entre os adultos jovens aconteça pela transmissão a partir do contato sexual (VAN DER MEE-MARQUET *et al.*, 2008). Outro fato que merece destaque é a distância cronológica entre duas amostras do tipo III, geneticamente idênticas, isoladas de sangue de recém-natos em um espaço de tempo de 14 anos. Tal achado corrobora a possível da circulação de cepas específicas por longos períodos.

Outro aspecto avaliado neste estudo foi o potencial de virulência das amostras. Além da cápsula polissacarídica, uma série de proteínas presentes na superfície das células de EGB, como a proteína C, constitui importantes fatores de virulência. Dessa forma, foi feita a investigação dos genes que codificam as porções alfa, codificada pelo gene *bca*, e beta, codificada pelo gene *bac*, da proteína C. Estas estruturas, segundo a literatura, são fatores de virulência envolvidos na invasão celular e evasão do sistema imune, respectivamente. De acordo com Pietrocola *et al.* (2018), a proteína C alfa é predominantemente expressa em amostras pertencentes aos tipos capsulares Ia, Ib e II, e raramente expressa por amostras do tipo III. Neste estudo foi observada associação significativa entre *bac* e *bca* e o tipo capsular Ib. Ao avaliar esta amostragem em conjunto com amostras de um estudo anterior, aqui chamadas de grupo externo, foi possível observar que o gene *bca* foi significativamente associado às amostras oriundas de colonização. Este dado está de acordo com outros estudos, que mostram que amostras de colonização albergam o gene *bca* em maior frequência que aquelas oriundas de sítios de infecção (MANNING *et al.*, 2006; DUTRA *et al.*, 2014).

A beta-hemolisina/citolisina (β -H/C), codificada pelo operon *cyiE*, está associada a lesão tecidual e disseminação sistêmica (BOBADILLA *et al.*, 2021), contribuindo para transição da colonização para quadros invasivos. A maioria das amostras de EGB produz β -H/C e a hiperprodução dessa toxina é associada aos casos mais graves de infecção, como meningite em recém-nascidos, pneumonia e sepse (SIGGE *et al.*, 2008; WHIDBEY *et al.*, 2013; ROSA-FRAILE *et al.*, 2014). Ainda

que haja a associação entre tipos capsulares e quadros invasivos em neonatos ou em adultos não-grávidos, nenhum tipo capsular tem se mostrado significativamente associado à hiperprodução de β -H/C e à sobrevivência de EGB no meio intracelular (CUMLEY *et al.*, 2012; LUPO *et al.*, 2014). Nesse estudo também não houve associação entre amostras fortes produtoras de β -H/C e o tipo capsular, porém foi observada uma tendência, ainda que não significativa, entre o tipo capsular II e a fraca produção de β -H/C.

Whidbey *et al.* (2013) demonstraram que a β -H/C promove a invasão das células epiteliais amnióticas humanas contribuindo para penetração bacteriana na placenta e corioamnio humanos. Além de sua atividade invasiva, β -H/C induz apoptose, recruta neutrófilos e estimula a liberação de citocinas. A colonização vaginal por EGB em gestantes é a primeira etapa crítica na patogênese da doença neonatal invasiva (RANDIS *et al.*, 2014). Randis *et al.* (2014), usando um modelo de colonização vaginal em murinos, observaram uma vantagem competitiva significativa no estabelecimento e persistência da colonização vaginal *in vivo* para amostras de EGB que expressam β -H/C. Além disso, destacam que estudos anteriores (OVERMAN *et al.*, 2002; GUPTA; BRISKI, 2004) demonstraram que a grande maioria das amostras de EGB oriundas de mulheres grávidas são hemolíticas.

No presente estudo foi observada uma tendência, ainda que não significativa, de produção forte de β -H/C entre amostras isoladas de sítios de colonização e produção moderada entre amostras de sítios de infecção. Entre as amostras provenientes de secreção vaginal de gestantes foi observada a produção forte ou moderada dessa toxina em oito das nove amostras estudadas. Isto pode estar relacionado à potencial capacidade de transição do estado de colonização para infecção, onde a ascensão bacteriana pode levar à invasão da placenta e contaminação do feto, e gerar quadros graves no recém-nascido. Ainda que haja, na literatura, a relação entre a hiperprodução de β -H/C e quadros infecciosos, no estudo de Gendrin *et al.* (2018) foram encontradas amostras de EGB não hemolíticas que se mantêm virulentas, destacando o papel de outros fatores de virulência. Ademais, Sagar *et al.* (2013) demonstraram que a ausência da expressão de β -H/C em amostras de EGB poderia permitir que as bactérias sobrevivessem em maior número dentro de fagócitos, uma capacidade que pode ser benéfica em certos estágios das infecções por *S. agalactiae*, possibilitando o escape do sistema imune.

Alguns estudos relataram a importância da toxina β -H/C na patogênese das infecções do trato urinário (ITU) e demonstraram que a agressão, inflamação, e a persistência de *S. agalactiae* na bexiga, são mediadas por β -H/C (LECLERCQ *et al.*, 2016; SULLIVAN *et al.*, 2017). *S. agalactiae* é responsável por aproximadamente 2–3% de todas ITU, podendo causar diferentes quadros clínicos, como bacteriúria assintomática, cistite e pielonefrite. A prevalência de ITU por EGB aumenta quando se tratando de mulheres, idosos e pacientes imunocomprometidos (SCHUAB *et al.*, 2015). Neste estudo, todas as amostras isoladas de urina foram produtoras fortes ou moderadas de β -H/C.

Outro determinante de virulência estudado foi a capacidade de produção de biofilme por EGB. Rosini e Margarit (2015) destacaram a importância da formação de biofilme em infecções persistentes, facilitando a sobrevivência e proliferação bacteriana e aumentando a resistência às defesas do hospedeiro e aos antimicrobianos. As variações das condições ambientais observadas na maioria dos estudos incluem: concentração de glicose, pH e porcentagem de CO₂ no meio. Miranda *et al.* (2018) apontaram a importância do pH ácido na maior expressão de adesinas que contribuem para a formação do biofilme. Previamente, Park *et al.* (2012) demonstraram que o sistema de dois componentes CovRS e o pH neutro do meio poderiam agir como importantes fatores reguladores de adesão do EGB a proteínas de matriz extracelular e superfícies abióticas. Outros estudos (KAUR *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2012) também observaram maior produção de biofilme em condições de pH neutro.

A variabilidade intrínseca das diferentes amostras e sua capacidade de sobreviver no ambiente ácido podem explicar discrepâncias (ALVES-BARROCO *et al.*, 2020). Sendo assim, amostras isoladas de diferentes espécimes, provenientes de infecção ou de colonização, podem apresentar capacidade variável de produção de biofilme. Alvim *et al.*, (2019) sugerem que a variação dos níveis de pH pode ter um impacto na colonização de diferentes sítios anatômicos. Por exemplo, na vagina humana saudável os níveis de pH estão geralmente em torno de 4, enquanto que em condição de disbiose o pH está entre 6 e 7. Ho *et al.* (2013) apontam que em pH vaginal fisiológico a sobrevivência e a produção de biofilme por EGB são favorecidas, o que estimula a colonização da vagina e aumenta o risco de vaginose e de infecção neonatal. Nie *et al.* (2018) afirmam que a produção de biofilme é intensificada em pH

ácido e pode contribuir para a colonização e persistência vaginal favorecendo, dessa forma, a transmissão para neonatos.

Nesse estudo, a capacidade de produção de biofilme foi avaliada no meio THB (pH 7,8 +/- 0,2) acrescido de 1% de glicose; portanto, a acidificação do meio ocorreu devido aos produtos do metabolismo do carboidrato. Em relação à origem das amostras, foi observada uma tendência, ainda que não significativa, de maior produção de biofilme por aquelas isoladas de sítios de infecção. Em destaque, as amostras de urina foram todas fortes produtoras de biofilme. D'Urzo *et al.* (2014) encontraram maior frequência de amostras fortes produtoras entre amostras oriundas de sítios estéreis de neonatos, em comparação com amostras provenientes de sítios de colonização. Outro estudo (NIE *et al.*, 2018) descreve que amostras provenientes de quadros invasivos foram mais propensas a forte produção de biofilme do que as amostras isoladas de pacientes com quadros não invasivos, sugerindo a ação de outros fatores de virulência relacionados à maior capacidade de produzir biofilmes que ainda não foram totalmente elucidados. Em contraste, Kaur *et al.*, (2009) observaram maior produção de biofilme entre amostras de EGB isoladas de pacientes assintomáticos, principalmente entre amostras de secreção vaginal, em comparação com pacientes sintomáticos.

A produção de biofilme tem sido associada, entre outros fatores, à expressão da cápsula polissacarídica. Xia *et al.* (2015) destacam que a cápsula de EGB é necessária para a formação de biofilme na presença de plasma humano. Shabayek e Spellerberg (2018) complementam que o baixo pH e a presença de plasma aparecem como fatores ambientais cruciais de regulação da expressão de estruturas da superfície bacteriana, como os pili e a cápsula, envolvidas na produção de biofilme. Nesse estudo, a forte produção de biofilme foi observada entre as amostras do tipo IV e na maioria das amostras dos tipos II, Ib e III. Kaur *et al.*, (2009) observaram maior produção de biofilme entre amostras do tipo Ia, seguido pelos tipos Ib, III e V. Já Ho *et al.* (2013) encontraram maior produção de biofilme entre amostras dos tipos III e V. Outro estudo observou que amostras do tipo III e V foram fortes produtoras de biofilme em condições ácidas, e destacou a maior produção de biofilme por amostras do tipo III, pertencentes ao clone hipervirulento ST17 (D'URZO *et al.*, 2014).

A diversidade de manifestações clínicas causadas por EGB reflete uma adaptabilidade eficiente das bactérias aos diferentes sítios anatômicos no hospedeiro

(OTAGUIRI *et al.*, 2013). Sendo assim, este estudo também buscou avaliar o “fitness” *in vitro*, ou seja, a capacidade do microrganismo de sobreviver, se replicar e se adaptar às condições ambientais (como a presença de glicose e o pH do meio) (BHATTER *et al.*, 2012). Nesse estudo foi observado que amostras oriundas de colonização cresceram mais rapidamente, nas primeiras horas da curva, que amostras oriundas de quadros infecciosos. Existem poucos estudos *in vitro* que avaliam a cinética de crescimento de EGB sob ótica da patogênese. É importante investigar as características do crescimento bacteriano acerca da instalação dos processos infecciosos e esclarecer os possíveis mecanismos subjacentes responsáveis pela relação complexa parasita-hospedeiro (MALIN; PAOLETTI, 2001).

O estudo de Johri *et al.* (2005), utilizando células epiteliais respiratórias polarizadas, demonstrou que o crescimento mais acelerado das amostras auxiliou na translocação de EGB nas barreiras celulares, e destacou a importância de um ambiente rico em nutrientes e níveis amplos de oxigênio nesse processo. Van der Mee-Marquet *et al.* (2006) sugeriram que cepas lisogênicas de *S. agalactiae* podem possuir diversos fatores de aptidão (“fitness”) que propiciam a atividade metabólica e o crescimento bacteriano. Estes autores observaram que amostras envolvidas em infecções invasivas em neonatos possuíam características de crescimento, produção de enzimas e níveis de produção capsular mais exacerbadas do que amostras que não causavam doença invasiva. Por outro lado, um estudo utilizando amostras de *Streptococcus oralis* encontrou maior taxa de crescimento em amostras não e/ou minimamente invasivas, e crescimento mais lento em amostras altamente invasivas (CORCUERA *et al.*, 2013).

Observou-se nesse estudo que a adição de glicose ao meio promoveu um aumento contínuo na população bacteriana, enquanto que no meio de cultura sem glicose, a densidade torna-se estável após 5-6 h de incubação. Silvestre *et al.* (2020) observaram aumento na densidade bacteriana de amostras cultivadas em THB suplementado com 1% de glicose em pH 7,6 em comparação com pH 4,5, e destacam que modificações de pH induzida pela presença da glicose podem ser suficientes para maior taxa de crescimento e produção de biofilme. Outro estudo (D’URZO *et al.*, 2014) também observou aumento na densidade bacteriana, tanto em meio de cultura com pH ácido quanto em meio suplementado com glicose em pH neutro. Em contraste, Malin e Paoletti (2001) relataram que a invasão por EGB estaria associada ao menor

tempo de geração nas amostras, pertencentes ao tipo capsular III, em ambiente limitado de glicose.

Nos últimos anos têm sido realizadas abordagens de avaliação global do potencial de virulência de EGB. Neste estudo, não foi possível observar diferenças significativas no tempo de geração das amostras que produziam biofilme forte ou moderadamente. Corroborando com esse resultado, outros estudos (D'URZO *et al.*, 2014; NIE *et al.*, 2018) analisaram a taxa de crescimento das amostras de EGB submetidas a diferentes condições no meio de cultura, e destacaram que não foram encontradas diferenças significativas na taxa de crescimento de amostras produtoras fortes, fracas ou não produtoras de biofilme. Yang *et al.* (2012) sugerem que a sobrevivência de EGB pode ser duradoura a partir do crescimento em biofilme. Estes autores destacaram que a capacidade de EGB colonizar persistentemente pode ser dependente tanto da produção de biofilme, quanto da expressão gênica altamente coordenada.

Outro aspecto analisado foi o tempo de geração em função dos tipos capsulares. Hooven *et al.* (2017) encontraram que 75% dos genes envolvidos no "fitness" de EGB estavam envolvidos na biossíntese da cápsula polissacarídica. Nesse estudo, foi visto que amostras dos tipos Ib, IV e III apresentaram as menores médias de TG, enquanto que na cinética de crescimento, os tipos Ia, II e III apresentaram a maior densidade celular nas primeiras 3h, com inclusão do tipo Ib a partir de 4h. Ross *et al.* (1999) observaram, entre amostras dos tipos capsulares Ia, Ib e III, um aumento na produção de cápsula de acordo com o menor TG das amostras, demonstrando um papel regulatório por meio da taxa de crescimento. D'Urzo *et al.* (2014) destacam maior densidade bacteriana em amostras pertencentes ao tipo III, principalmente pertencentes ao ST-17, e também em amostras dos tipos V e Ia.

Neste estudo observa-se a ocorrência de amostras que apresentaram todos ou a maioria dos fatores associados à virulência avaliados, pertencentes a poucos clones e oriundas de sítios de colonização e de infecção. Tais achados demonstram a versatilidade de EGB, em que uma mesma cepa é capaz de colonizar ou infectar diferentes indivíduos. O fato de albergar genes e/ou de expressar moléculas ou mecanismos que auxiliam na colonização e invasão de barreiras epiteliais, na evasão do sistema imune, na persistência e na maior adaptação ao hospedeiro, observado

em um grupo bastante representativo de amostras, ilustra a potencialidade desta espécie como patógeno humano.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Foram observadas amostras idênticas, isoladas de espécimes associados a infecção e à colonização, bem como a circulação de uma mesma cepa na região por longos períodos;
- ✓ Foi observada associação significativa entre os genes *bac* e *bca* e o tipo capsular Ib, assim como entre o gene *bca* e amostras oriundas de colonização;
- ✓ Não se observou associação significativa entre a expressão de β -H/C e a origem das amostras ou o tipo capsular. Entretanto, observou-se forte ou moderada expressão de β -H/C na maioria das amostras de secreção vaginal. Amostras oriundas de sítios infecciosos, em sua maioria, apresentaram um padrão moderado de expressão de β -H/C;
- ✓ Observou-se que amostras isoladas de urina, em sua totalidade, apresentaram forte produção de biofilme, independentemente do tipo capsular;
- ✓ Amostras oriundas de sítios de colonização se adaptaram mais rapidamente ao meio, o que pode ser comprovado pelo crescimento significativamente mais rápido em comparação com amostras oriundas de sítios infecciosos;
- ✓ O tempo de geração médio foi 92 min, não sendo observadas diferenças significativas em função da origem das amostras nem dos tipos capsulares;
- ✓ A adição de glicose ao meio de cultura favoreceu o crescimento contínuo das amostras até o fim do ensaio de cinética de crescimento, entretanto não se observou diferença na performance das amostras em função de sua origem de isolamento;
- ✓ Cerca de $\frac{1}{4}$ das amostras destacaram-se por albergar e/ou expressar todos ou a maioria dos determinantes de virulência abordados nesse estudo e apresentar menor tempo de geração, em destaque as amostras do tipo capsular Ib.

7. REFERÊNCIAS

ACOG Committee Opinion, Number 782. Prevention of group B streptococcal early-onset disease in newborns. *Obstet Gynecol*, 134:e19-e40. 2020.

Alp F, Findik D, Dagi HT, Arslan U, Pekin AT, Yilmaz SA. Screening and genotyping of group B *Streptococcus* in pregnant and non-pregnant women in Turkey. *J Infect Dev Ctries*. 2016 Mar 31;10(3):222-6.

Alves-Barroco C, Paquete-Ferreira J, Santos-Silva T, Fernandes AR. Singularities of pyogenic Streptococcal biofilms - from formation to health implication. *Front Microbiol*. 2020 Dec 23;11:584947.

Alvim DCSS, Ferreira AFM, Leal MA, Oliveira LMA, Botelho AMN, Botelho ACN, et al. Biofilm production and distribution of pilus variants among *Streptococcus agalactiae* isolated from human and animal sources. *Biofouling*. 2019 Sep;35(8):938-944.

Armistead B, Oler E, Adams Waldorf K, Rajagopal L. The double life of group B *Streptococcus*: asymptomatic colonizer and potent pathogen. *J Mol Biol*. 2019 Jul 26;431(16):2914-2931.

Baron MJ, Bolduc GR, Goldberg MB, Aupérin TC, Madoff LC. Alpha C protein of group B *Streptococcus* binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2004 Jun 4;279(23):24714-24723.

Beall B, Facklam R, Thompson T. Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J Clin Microbiol*. 1996 Apr;34(4):953-958.

Bhatter P, Chatterjee A, D'souza D, Tolani M, Mistry N. Estimating *fitness* by competition assays between drug susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* of predominant lineages in Mumbai, India. *PLoS One*. 2012;7(3):e33507.

Bobadilla FJ, Novosak MG, Cortese IJ, Delgado OD, Laczeski ME. Prevalence, serotypes and virulence genes of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women with 35-37 weeks of gestation. *BMC Infect Dis*. 2021 Jan 14;21(1):73.

Borges S, Silva J, Teixeira P. Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012 Mar;101(3):677-682.

Botelho ACN, Oliveira JG, Damasco AP, Santos KTB, Ferreira AFM, Rocha GT, et al. *Streptococcus agalactiae* carriage among pregnant women living in Rio de Janeiro, Brazil, over a period of eight years. *PLoS One*. 2018 May 11;13(5):e0196925.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de

Atenção Básica. Atenção ao Pré-Natal de Baixo Risco. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, (Cadernos de Atenção Básica, nº 32). 2012.

Brittan JL, Nobbs AH. Group B *Streptococcus* pili mediate adherence to salivary glycoproteins. *Microbes Infect.* 2015 May;17(5):360-8.

Burcham LR, Spencer BL, Keeler LR, Runft DL, Patras KA, Neely MN, et al. Determinants of Group B streptococcal virulence potential amongst vaginal clinical isolates from pregnant women. *PLoS One.* 2019 Dec 18;14(12):e0226699.

CLSI - Clinical Laboratory Standard Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA, USA, 2018.

Corcuera MT, Gómez-Lus ML, Gómez-Aguado F, Maestre JR, Ramos Mdel C, Alonso MJ, et al. Morphological plasticity of *Streptococcus oralis* isolates for biofilm production, invasiveness, and architectural patterns. *Arch Oral Biol.* 2013 Nov;58(11):1584-1593.

Corrêa AB, Silva LG, Pinto Tde C, Oliveira IC, Fernandes FG, Costa NS, et al. The genetic diversity and phenotypic characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 Dec;106(8):1002-1006.

COSTA, HPF. Prevenção da doença perinatal pelo estreptococo do grupo B. Sociedade Brasileira de Pediatria, 2011. Disponível em: <https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/2015/02/SBPEGBCDC2011-2.pdf>. Acesso em: Agosto de 2020.

Cumley NJ, Smith LM, Anthony M, May RC. The CovS/CovR acid response regulator is required for intracellular survival of group B *Streptococcus* in macrophages. *Infect Immun.* 2012 May;80(5):1650-1661.

Darabi R, Tadi S, Mohit M, Sadeghi E, Hatamizadeh G, Kardeh B, et al. The prevalence and risk factors of group B *Streptococcus* colonization in Iranian pregnant women. *Electron Physician.* 2017 May 25;9(5):4399-4404.

Dmitriev A, Shakleina E, Tkáčiková L, Mikula I, Totolian A. Genetic heterogeneity of the pathogenic potentials of human and bovine group B streptococci. *Folia Microbiol.* 2002;47(3):291-295.

do Nascimento CS, Dos Santos NFB, Ferreira RCC, Taddei CR. *Streptococcus agalactiae* in pregnant women in Brazil: prevalence, serotypes, and antibiotic resistance. *Braz J Microbiol.* 2019 Oct;50(4):943-952.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):167-193.

Dutra VG, Alves VM, Olendzki AN, Dias CA, de Bastos AF, Santos GO, et al. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. BMC Infect Dis. 2014 Jun 12;14:323.

D'Urzo N, Martinelli M, Pezzicoli A, De Cesare V, Pinto V, Margarit I, et al. Acidic pH strongly enhances in vitro biofilm formation by a subset of hypervirulent ST-17 *Streptococcus agalactiae* strains. Appl Environ Microbiol. 2014 Apr;80(7):2176-2185.

Edwards MS, Nizet V, Baker CJ. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn (Seventh Edition): CHAPTER 12 - Group B Streptococcal Infections. 2011; 419–469. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6400-8.00012-2>.

Fabbrini M, Rigat F, Rinaudo CD, Passalacqua I, Khacheh S, Creti R, et al. The protective value of maternal group B *Streptococcus* antibodies: quantitative and functional analysis of naturally acquired responses to capsular polysaccharides and pilus proteins in european maternal sera. Clin Infect Dis. 2016 Sep 15;63(6):746-753.

Facklam R, Wilkinson, H. The Family *Streptococcaceae* (Medical Aspects). In: The prokaryotes. A handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. MP Starr, H Stolp, H Truper, A Ballows & H Schlegel (eds). Springer-Verlag. New York. 1981; 1572-1597.

Fiolo K, Zanardi CE, Salvadego M, Bertuzzo CS, Amaral E, Calil R, et al. Taxa de infecção e sorotipos de *Streptococcus agalactiae* em amostras de recém-nascidos infectados na cidade de Campinas (SP), Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet. 2012 Dec;34(12):544-549. Portuguese.

Furfaro LL, Chang BJ, Payne MS. Perinatal *Streptococcus agalactiae* epidemiology and surveillance targets. Clin Microbiol Rev. 2018 Aug 15;31(4):e00049-18.

Gendrin C, Vornhagen J, Armistead B, Singh P, Whidbey C, Merillat S, et al. A nonhemolytic Group B *Streptococcus* strain exhibits hypervirulence. J Infect Dis. 2018 Mar 5;217(6):983-987.

Gómez-Mejía A, Gámez G, Hammerschmidt S. *Streptococcus pneumoniae* two-component regulatory systems: The interplay of the pneumococcus with its environment. Int J Med Microbiol. 2018 Aug;308(6):722-737.

Gupta C, Briski LE. Comparison of two culture media and three sampling techniques for sensitive and rapid screening of vaginal colonization by group B *Streptococcus* in pregnant women. J Clin Microbiol. 2004 Sep;42(9):3975-7.

Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2017 May 1;41(3):276-301.

Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, et al. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. BMC Bioinformatics. 2015 Aug 26;16:270.

Ho YR, Li CM, Yu CH, Lin YJ, Wu CM, Harn IC, et al. The enhancement of biofilm formation in group B streptococcal isolates at vaginal pH. *Med Microbiol Immunol*. 2013 Apr;202(2):105-115.

Hooven TA, Catomeris AJ, Bonakdar M, Tallon LJ, Santana-Cruz I, Ott S, et al. The *Streptococcus agalactiae* stringent response enhances virulence and persistence in human blood. *Infect Immun*. 2017 Dec 19;86(1):e00612-17.

Johri AK, Patwardhan V, Paoletti LC. Growth rate and oxygen regulate the interactions of group B *Streptococcus* with polarized respiratory epithelial cells. *Can J Microbiol*. 2005 Apr;51(4):283-6.

Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, Oliver KA, Chan MS, Kunst F, et al. Multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun;41(6):2530-6.

Kaur H, Kumar P, Ray P, Kaur J, Chakraborti A. Biofilm formation in clinical isolates of group B streptococci from north India. *Microb Pathog*. 2009 Jun;46(6):321-327.

Kimura K, Suzuki S, Wachino J, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, et al. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Aug;52(8):2890-7.

Kobayashi M, Vekemans J, Baker CJ, Ratner AJ, Le Doare K, Schrag SJ. Group B *Streptococcus* vaccine development: present status and future considerations, with emphasis on perspectives for low and middle income countries. *F1000Res*. 2016 Sep 22;5:2355.

Kong F, Gidding HF, Berner R, Gilbert GL. *Streptococcus agalactiae* C β protein gene (*bac*) sequence types, based on the repeated region of the cell-wall-spanning domain: relationship to virulence and a proposed standardized nomenclature. *J Med Microbiol*. 2006 Jul;55(Pt 7):829-837.

Landwehr-Kenzel S, Henneke P. Interaction of *Streptococcus agalactiae* and cellular innate immunity in colonization and disease. *Front Immunol*. 2014 Oct 29;5:519.

Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012 Apr;50(4):1355-61.

Larsson C, Lindroth M, Nordin P, Ståhlhammar-Carlemalm M, Lindahl G, Krantz I. Association between low concentrations of antibodies to protein alpha and Rib and invasive neonatal group B streptococcal infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2006 Nov;91(6):F403-8.

Le Doare K, Heath PT. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine*. 2013 Aug 28;31 Suppl 4:D7-12.

Le Doare K, Kampmann B. Breast milk and group B streptococcal infection: vector of transmission or vehicle for protection? *Vaccine*. 2014 May 30;32(26):3128-3132.

Leclercq SY, Sullivan MJ, Ipe DS, Smith JP, Cripps AW, Ulett GC. Pathogenesis of *Streptococcus* urinary tract infection depends on bacterial strain and β -hemolysin/cytolysin that mediates cytotoxicity, cytokine synthesis, inflammation and virulence. *Sci Rep*. 2016 Jul 7;6:29000.

Lupo A, Ruppen C, Hemphill A, Spellerberg B, Sendi P. Phenotypic and molecular characterization of hyperpigmented group B streptococci. *Int J Med Microbiol*. 2014 Jul;304(5-6):717-724.

Madhi SA, Cutland CL, Jose L, Koen A, Govender N, Wittke F, et al. Safety and immunogenicity of an investigational maternal trivalent group B *Streptococcus* vaccine in healthy women and their infants: a randomised phase 1b/2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2016 Aug;16(8):923-934.

Madhi SA, Dangor Z. Prospects for preventing infant invasive GBS disease through maternal vaccination. *Vaccine*. 2017 Aug 16;35:4457-4460.

Madigan MT, Martinko JM, Bender K, Buckley D, Stahl D. *Microbiologia de Brock*. 14^a edição. Tradução de Alice Freitas Versiani *et al*. Porto Alegre: Editora Artmed, 2016.

Magalhães VD, Ferreira JC, Barelli C, Darini ALC. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia - uma revisão técnica. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 10 fev 2005; 64:155-161. Portuguese.

Maisey HC, Doran KS, Nizet V. Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev Mol Med*. 2008 Sep 22;10:e27.

Malin G, Paoletti LC. Use of a dynamic in vitro attachment and invasion system (DIVAS) to determine influence of growth rate on invasion of respiratory epithelial cells by group B *Streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 6;98(23):13335-40.

Manning SD. Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*). *Front Biosci*. 2003 Jan 1;8:s1-18.

Manning SD, Ki M, Marrs CF, Kugeler KJ, Borchardt SM, Baker CJ, et al. The frequency of genes encoding three putative group B streptococcal virulence factors among invasive and colonizing isolates. *BMC Infect Dis*. 2006 Jul 17;6:116.

Melo SC, Santos NC, Oliveira M, Scodro RB, Cardoso RF, Pádua RA, et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016 Nov 3;58:83.

Miranda PSD, Lannes-Costa PS, Pimentel BAS, Silva LG, Ferreira-Carvalho BT, Menezes GC, et al. Biofilm formation on different pH conditions by *Streptococcus*

agalactiae isolated from bovine mastitic milk. Lett Appl Microbiol. 2018 Sep;67(3):235-243.

Murayama SY, Seki C, Sakata H, Sunaoshi K, Nakayama E, Iwata S, et al. Capsular type and antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from newborns to the elderly, with invasive infections. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Jun;53(6):2650-3.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia Médica. 6ª edição. Tradução de Carlos Pelleschi Taborda et al. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2009.

Nie S, Lu X, Hu YW, Zheng L, Wang Q. Influence of environmental and genotypic factors on biofilm formation by clinical isolates of group B streptococci. Microb Pathog. 2018 Aug;121:45-50.

Nizet V, Gibson RL, Chi EY, Framson PE, Hulse M, Rubens CE. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. Infect Immun. 1996 Sep;64(9):3818-26.

Otaguiri ES, Morguette AE, Tavares ER, dos Santos PM, Morey AT, Cardoso JD, et al. Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. BMC Microbiol. 2013 Dec 21;13:297.

Overman SB, Eley DD, Jacobs BE, Ribes JA. Evaluation of methods to increase the sensitivity and timeliness of detection of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. J Clin Microbiol. 2002 Nov;40(11):4329-31.

Palmeiro JK, Dalla-Costa LM, Fracalanza SE, Botelho AC, da Silva Nogueira K, Scheffer MC, et al. Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in southern Brazil. J Clin Microbiol. 2010 Dec;48(12):4397-4403.

Paoletti LC, Kasper DL. Surface structures of group B *Streptococcus* important in human immunity. Microbiol Spectr. 2019 Mar;7(2).

Parida R, Samanta L. *In silico* analysis of candidate proteins sharing homology with *Streptococcus agalactiae* proteins and their role in male infertility. Syst Biol Reprod Med. 2017 Feb;63(1):15-28.

Parida R. Human MOSPD2: A bacterial Lmb mimicked auto-antigen is involved in immune infertility. J Transl Autoimmun. 2019 May 28;1:100002.

Park SE, Jiang S, Wessels MR. CsrRS and environmental pH regulate group B *Streptococcus* adherence to human epithelial cells and extracellular matrix. Infect Immun. 2012 Nov;80(11):3975-84.

Parker RE, Laut C, Gaddy JA, Zadoks RN, Davies HD, Manning SD. Association between genotypic diversity and biofilm production in group B *Streptococcus*. BMC Microbiol. 2016 May 20;16:86.

Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. JAMA. 2008 May 7;299(17):2056-65.

Pietrocola G, Arciola CR, Rindi S, Montanaro L, Speziale P. *Streptococcus agalactiae* non-pilus, cell wall-anchored proteins: involvement in colonization and pathogenesis and potential as vaccine candidates. Front Immunol. 2018 Apr 5;9:602.

Pillai P, Srinivasan U, Zhang L, Borchardt SM, Debusscher J, Marrs CF, et al. *Streptococcus agalactiae* pulsed-field gel electrophoresis patterns cross capsular types. Epidemiol Infect. 2009 Oct;137(10):1420-5.

Poyart C, Tazi A, Réglie-Poupet H, Billoët A, Tavares N, Raymond J, et al. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. J Clin Microbiol. 2007 Jun;45(6):1985-8.

Raabe VN, Shane AL. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*). Microbiol Spectr. 2019 Mar;7(2):10.1128/microbiolspec.GPP3-0007-2018.

Randis TM, Gelber SE, Hooven TA, Abellar RG, Akabas LH, Lewis EL, et al. Group B *Streptococcus* β -hemolysin/cytolysin breaches maternal-fetal barriers to cause preterm birth and intrauterine fetal demise *in vivo*. J Infect Dis. 2014 Jul 15;210(2):265-273.

Rinaudo CD, Rosini R, Galeotti CL, Berti F, Necchi F, Reguzzi V, et al. Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B *Streptococcus*. PLoS One. 2010 Feb 15;5(2):e9216.

Rosini R, Margarit I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. Front Cell Infect Microbiol. 2015 Feb 4;5:6.

Ross RA, Madoff LC, Paoletti LC. Regulation of cell component production by growth rate in the group B *Streptococcus*. J Bacteriol. 1999 Sep;181(17):5389-94.

Rosa-Fraile M, Dramsi S, Spellerberg B. Group B streptococcal haemolysin and pigment, a tale of twins. FEMS Microbiol Rev. 2014 Sep;38(5):932-946.

Russell NJ, Seale AC, O'Driscoll M, O'Sullivan C, Bianchi-Jassir F, Gonzalez-Guarin J, et al. Maternal colonization with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. Clin Infect Dis. 2017 Nov 6;65(suppl_2):S100-S111.

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

Schuab RB, Arêas GP, Souza VC, Barros RR. Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* recovered from significant bacteriuria. Infect Dis (Lond). 2015 Sep;47(9):637-642.

Shabayek S, Spellerberg B. Group B Streptococcal colonization, molecular characteristics, and epidemiology. Front Microbiol. 2018 Mar 14;9:437.

Sigge A, Schmid M, Mauerer S, Spellerberg B. Heterogeneity of hemolysin expression during neonatal *Streptococcus agalactiae* sepsis. J Clin Microbiol. 2008 Feb;46(2):807-809.

Silvestre I, Borrego MJ, Jordão L. Biofilm formation by ST17 and ST19 strains of *Streptococcus agalactiae*. Res Microbiol. 2020 Dec;171(8):311-318.

Skjaervold NK, Bergh K, Bevanger L. Distribution of PFGE types of invasive Norwegian group B streptococci in relation to serotypes. Indian J Med Res. 2004 May;119 Suppl:201-204.

Souza VC, Kegele FC, Souza SR, Neves FP, de Paula GR, Barros RR. Antimicrobial susceptibility and genetic diversity of *Streptococcus agalactiae* recovered from newborns and pregnant women in Brazil. Scand J Infect Dis. 2013 Oct;45(10):780-785.

Srinivasan V, Metcalf BJ, Knipe KM, Ouattara M, McGee L, Shewmaker PL, et al. *vanG* element insertions within a conserved chromosomal site conferring vancomycin resistance to *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus anginosus*. mBio. 2014 Jul 22;5(4):e01386-14.

Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods. 2000 Apr;40(2):175-179.

Sullivan MJ, Leclercq SY, Ipe DS, Carey AJ, Smith JP, Voller N, et al. Effect of the *Streptococcus agalactiae* virulence regulator CovR on the pathogenesis of urinary tract infection. J Infect Dis. 2017 Feb 1;215(3):475-483.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 10ª edição. Tradução de Aristóboło Mendes da Silva *et al.* Porto Alegre: Editora Artmed, 2012.

Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 6ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

van der Mee-Marquet N, Domelier AS, Mereghetti L, Lanotte P, Rosenau A, van Leeuwen W, et al. Prophagic DNA fragments in *Streptococcus agalactiae* strains and association with neonatal meningitis. J Clin Microbiol. 2006 Mar;44(3):1049-58.

van der Mee-Marquet N, Fourny L, Arnault L, Domelier AS, Salloum M, Lartigue MF, et al. Molecular characterization of human-colonizing *Streptococcus agalactiae* strains isolated from throat, skin, anal margin, and genital body sites. *J Clin Microbiol*. 2008 Sep;46(9):2906-11.

Vasilyeva A, Santos Sanches I, Florindo C, Dmitriev A. Natural mutations in *Streptococcus agalactiae* resulting in abrogation of β antigen production. *PLoS One*. 2015 Jun 5;10(6):e0128426.

Vekemans J, Crofts J, Baker CJ, Goldblatt D, Heath PT, Madhi SA, et al. The role of immune correlates of protection on the pathway to licensure, policy decision and use of group B *Streptococcus* vaccines for maternal immunization: considerations from World Health Organization consultations. *Vaccine*. 2019 May 27;37(24):3190-3198.

Whidbey C, Harrell MI, Burnside K, Ngo L, Becraft AK, Iyer LM, et al. A hemolytic pigment of group B *Streptococcus* allows bacterial penetration of human placenta. *J Exp Med*. 2013 Jun 3;210(6):1265-81.

Xia FD, Mallet A, Caliot E, Gao C, Trieu-Cuot P, Dramsi S. Capsular polysaccharide of group B *Streptococcus* mediates biofilm formation in the presence of human plasma. *Microbes Infect*. 2015 Jan;17(1):71-76.

Yang HH, Madoff LC, Guttormsen HK, Liu YD, Paoletti LC. Recombinant group B *Streptococcus* beta C protein and a variant with the deletion of its immunoglobulin A-binding site are protective mouse maternal vaccines and effective carriers in conjugate vaccines. *Infect Immun*. 2007 Jul;75(7):3455-61.

Yang Q, Porter AJ, Zhang M, Harrington DJ, Black GW, Sutcliffe IC. The impact of pH and nutrient stress on the growth and survival of *Streptococcus agalactiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012 Aug;102(2):277-287.

Zeyad A, Hamad M, Amor H, Hammadeh ME. Relationships between bacteriospermia, DNA integrity, nuclear protamine alteration, sperm quality and ICSI outcome. *Reprod Biol*. 2018 Mar;18(1):115-121.

8. ANEXO

Amostra	Paciente	Espécime	Ano	Cps	Clin	Eri	Tet	<i>bac</i>	<i>bca</i>	β-H/C	Biofilme	TG min
03	RN	Sangue	2002	Ib	S	S	R	pos	pos	Moderado	Forte	67,8
27	RN	Sangue	2005	III	S	S	R	neg	neg	Moderado	Moderado	78,6
39	RN	Sangue	2005	Ia	S	S	R	neg	neg	Moderado	Moderado	176,4
40	RN	Sangue	2006	V	S	S	R	neg	neg	Fraco	Forte	101,4
47	RN	Sangue	2006	Ia	S	S	S	neg	neg	Moderado	Moderado	93,6
234	M/61 anos	Esperma	2008	V	S	S	R	neg	neg	Moderado	Moderado	93
242	M/24 anos	Sec Uret	2008	II	R	R	R	neg	neg	Fraco	Forte	94,8
253	G/27 anos	Sec Vaginal	2008	IV	S	S	R	neg	neg	Forte	Forte	89,4
265	M	Esperma	2008	III	S	S	S	neg	neg	Moderado	Forte	79,2
277	M/44 anos	Esperma	2008	V	S	I	R	neg	neg	Fraco	Forte	88,2
368	G/36 anos	Urina	2008	IV	S	S	R	pos	neg	Moderado	Forte	71,4
400	F/23 anos	Sec Uret	2009	II	S	S	R	neg	pos	Fraco	Forte	108,6
708	F/49 anos	Urina	2011	III	R	R	I	neg	neg	Moderado	Forte	67,8
755	F/31 anos	Urina	2011	V	R	R	R	neg	neg	Moderado	Forte	94,2
850	G/24 anos	Urina	2012	II	S	S	I	neg	neg	Moderado	Forte	97,2
869	G/30 anos	Urina	2013	Ia	S	S	R	neg	neg	Moderado	Forte	88,8
882	G/32 anos	Sec Vaginal	2014	III	S	S	R	neg	neg	Moderado	Moderado	84
925	G/33 anos	Sec Vaginal	2015	Ia	S	S	R	neg	neg	Moderado	Forte	98,4
935	G/27 anos	Sec Vaginal	2015	Ib	S	S	R	pos	pos	Moderado	Forte	99
946	F/20 anos	Sec Orof	2015	III	S	S	S	neg	neg	Forte	Forte	103,2
958	G/29 anos	Sec Vaginal	2016	V	S	S	S	neg	neg	Moderado	Moderado	103,8

Continuação na próxima página

Amostra	Paciente	Espécime	Ano	Cps	Clin	Eri	Tet	<i>bac</i>	<i>bca</i>	β-H/C	Biofilme	TG min
962	G/23 anos	Urina	2016	II	S	S	R	neg	neg	Moderado	Forte	112,2
963	F/25 anos	Sec Orof	2016	Ia	S	S	S	neg	pos	Forte	Forte	73,8
965	F/22 anos	Sec Orof	2016	Ia	S	S	S	neg	neg	Moderado	Moderado	82,2
976	M/20 anos	Sec Orof	2016	Ib	S	S	R	pos	pos	Moderado	Moderado	67,8
996	G/41 anos	Urina	2017	Ib	S	S	R	pos	pos	Forte	Forte	78,6
997	G/20 anos	Sec Vaginal	2017	II	S	S	I	neg	neg	Fraco	Moderado	106,8
1000	G/41 anos	Urina	2017	Ia	S	S	R	neg	neg	Moderado	Forte	84
1001	G/28 anos	Sec Vaginal	2017	Ia	S	S	R	neg	neg	Forte	Moderado	81
1005	G/27 anos	Sec Vaginal	2018	V	S	S	S	neg	pos	Forte	Moderado	103,2
1006	G/22 anos	Sec Vaginal	2018	II	S	S	R	pos	pos	Moderado	Forte	85,8
1021	RN	Sangue	2019	III	S	S	R	neg	neg	Moderado	Forte	94,2

Cps: tipo capsular; Clin: clindamicina; Eri: eritromicina; Tet: tetraciclina; β -H/C: beta-hemolisina/citolisina; TG: tempo de geração; RN: recém-nascido; G: gestante; F: sexo feminino; M: sexo masculino; Sec: secreção; Orof: orofaríngea; Uret: uretral; S: sensível; R: resistente; I: resistência intermediária; pos: positivo; neg: negativo.