



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ELIANE SAORI OTAGUIRI

**ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DE INFECÇÕES  
CAUSADAS POR *Streptococcus agalactiae***

---

Londrina  
2017

ELIANE SAORI OTAGUIRI

**ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DE INFECÇÕES  
CAUSADAS POR *Streptococcus agalactiae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Nível de Doutorado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de doutor em Microbiologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Otaguiri, Eliane Saori .

Estratégias para o controle de infecções causadas por *Streptococcus agalactiae* / Eliane Saori Otaguiri. - Londrina, 2017.  
93 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Coorientador: Márcia Regina Eches Perugini.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. *Streptococcus* do grupo B - Tese. 2. Curva de melting - Tese. 3. Óleo de copaíba - Tese. 4. Nanopartícula de prata biológica - Tese. I. Ogatta, Sueli Fumie Yamada . II. Perugini, Márcia Regina Eches . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

ELIANE SAORI OTAGUIRI

**ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DE INFECÇÕES CAUSADAS  
POR *Streptococcus agalactiae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Nível de Doutorado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de doutor em Microbiologia

**BANCA EXAMINADORA**



---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Fumie Yamada  
Ogatta  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bárbara Gionco  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

---

Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gilselena Kerbauy  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 31 de Julho de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Sueli Fumie Yamada Ogatta, por sua dedicação durante todo o meu período de mestrado e doutorado, pelo conhecimento compartilhado, por todo o apoio, companheirismo e compreensão.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina Eches Perugini, pela ajuda durante a elaboração do projeto e por todo o incentivo.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lucy Megumi Yamauchi Lioni pelos conselhos e sugestões que contribuíram muito para o desenvolvimento do meu projeto.

À Ana Elisa Belotto Morguette pela amizade, incentivo e por toda a dedicação durante a execução do projeto.

Aos membros da banca Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bárbara Gionco, Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gilselena Kerbauy, Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha pelo apoio e disponibilidade.

Gostaria de agradecer também a todos os alunos de Iniciação Científica, mestrandos e doutorandos do NIP5 por contribuírem na execução do meu trabalho, pelo apoio e amizade.

À Universidade Estadual de Londrina e a todos os docentes do programa de Pós-graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo e apoio financeiro (PROAP). À Fundação Araucária pelo apoio financeiro (Edital PPSUS-Gestão Compartilhada em Saúde 2008-2009 – Chamada de Projetos 08/2010).

Aos meus queridos pais, meu irmão e meu esposo, pelo infinito apoio, meu eterno agradecimento. Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma no desenvolvimento deste trabalho.

OTAGUIRI, Eliane Saori. **Estratégias para o controle de infecções causadas por *Streptococcus agalactiae***. 2017. 93 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

*Streptococcus agalactiae* ou estreptococos do grupo B (EGB) de Lancefield continua sendo uma das principais causas de infecções invasivas e potencialmente fatais em recém-nascidos em todo o mundo, apesar da antibioticoterapia profilática intraparto (API). O objetivo principal deste estudo foi analisar estratégias alternativas para o controle de infecções neonatais por EGB. Inicialmente, um ensaio de multiplex PCR em tempo real baseado em curva de *melting* foi padronizado para detecção simultânea de EGB e marcadores de resistência a macrolídeos e lincosamidas diretamente de *swab* vaginal-retal. Oligonucleotídeos iniciadores específicos e complementares aos genes *cfb* (codifica para fator CAMP), *erm(A)* e *erm(B)* (codificam para metilases) e *mef(A)* (codifica para bomba de efluxo) foram desenhados a partir de sequências nucleotídicas de EGB depositadas em bancos de dados públicos. O ensaio de multiplex PCR apresentou 100% de especificidade e um limite de detecção de  $10^4$  unidades formadoras de colônias equivalentes por reação. A prevalência de colonização de EGB entre a população estudada foi de 15.7% (16/102) com base nos resultados de cultura positiva e do multiplex PCR em tempo real. Entre os isolados de EGB, somente dois apresentaram resistência aos antimicrobianos, tanto pelo método fenotípico quanto molecular. Também foi avaliado pela primeira vez o efeito do oleoresina obtido de *Copaifera multijuga* Hayne (óleo de copaíba) isoladamente ou em combinação com nanopartículas de prata produzidas metabólitos de *Fusarium oxysporum* (AgNPbio) contra célula planctônica e séssil de isolados de EGB. O óleo de copaíba apresentou atividade bactericida dose-dependente em células planctônicas de EGB, incluindo aqueles resistentes à eritromicina ou clindamicina. Análises de microscopia eletrônica de transmissão e varredura de células planctônicas tratadas com o óleo de copaíba apresentaram ruptura de parede celular com extravazamento de conteúdo citoplasmático. Este composto também apresentou atividade antibacteriana sobre biofilmes de EGB, inibindo sua formação, bem como a viabilidade de biofilmes maduros. Além disso, a combinação do óleo de copaíba com AgNPbio resultou em efeito sinérgico em células planctônicas e na formação de biofilme, reduzindo significativamente os valores de concentração inibitória mínima de ambos os compostos. Os resultados obtidos neste estudo mostram que a multiplex PCR em tempo real é um ensaio rápido, acessível e sensível, adequado para detecção direta de EGB e marcadores de resistência à eritromicina ou clindamicina diretamente em *swabs* vaginal-retal. Adicionalmente, revelam o potencial do óleo de copaíba, sozinho ou em combinação com AgNPbio, para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas para o controle de colonização e infecções por EGB.

**Palavras-chave:** *Streptococcus* do grupo B. Colonização de gestantes. Curva de *melting*. Óleo de copaíba. Nanopartícula de prata biológica.

OTAGUIRI, Eliane Saori. **Strategies for the control of *Streptococcus agalactiae* infections**. 2017. 93 p. Thesis (Doctoral Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

*Streptococcus agalactiae* or Lancefield's Group B streptococci (GBS) remains a major cause of invasive and life-threatening infections in newborns worldwide, despite intrapartum prophylactic antibiotic therapy (IAP). The aim of this study was to analyze alternative strategies for the control of neonatal infections due to GBS. Initially, a real-time PCR multiplex assay based on melting curve was standardized for simultaneous detection of GBS and resistance markers to macrolides and lincosamides directly from vaginal-rectal swab. Specific oligonucleotide primers complementary to the genes *cfb* (coding for CAMP factor), *erm(A)* and *erm(B)* (coding for methylases) and *mef(A)* (coding for efflux pump) were designed from nucleotide sequences of GBS deposited in public databases. The multiplex-PCR assay had a specificity of 100% and a detection limit of  $10^4$  colony forming units equivalent per reaction. The prevalence of GBS colonization among the studied population was 15.7% (16/102) based on the positive culture and the real time multiplex-PCR results. Among the GBS isolates, only two presented antimicrobial resistance, both by the phenotypic and molecular method. The effect of oleoresin obtained from *Copaifera multijuga* Hayne (copaiba oil) alone or in combination with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* (AgNPbio) metabolites against planktonic and sessile cells of GBS isolates was also evaluated for the first time, in this study. Copaiba oil showed a dose-dependent bactericidal activity in planktonic cells of GBS, including those resistant to erythromycin or clindamycin. Transmission and scanning electron microscopy analysis of planktonic cells treated with copaiba oil presented disruption of cell wall and leakage of cytoplasmic content. This compound also presented antibacterial activity on GBS biofilms, inhibiting its formation, as well as the viability of mature biofilms. In addition, the combination of copaiba oil with AgNPbio resulted in a synergistic effect on planktonic cells and biofilm formation, significantly reducing the minimum inhibitory concentration values of both compounds. The results obtained in this study show that the real-time multiplex-PCR multiplex is a rapid, affordable and sensitive assay suitable for direct detection of GBS and antimicrobial resistance markers directly on vaginal-rectal swabs. Additionally, they reveal the potential of copaiba oil, alone or in combination with AgNPbio, for the development of new pharmaceutical formulations for the control of GBS colonization and infections.

**Keywords:** Group B *Streptococcus*. Colonization of pregnant women. Melting curve. Copaiba oil. Biogenic silver nanoparticles.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
2.2.1 Desenvolvimento de multiplex-PCR em tempo real para detecção simultânea de EGB e de marcadores de resistência a antimicrobianos em amostras de <i>swab</i> vaginal-retal de gestantes.....	10
2.2.2 Analisar a atividade antibacteriana do oleoresina de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne combinado à nanopartícula de prata biogênica em EGB.....	10
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	12
3.1 <i>Streptococcus agalactiae</i> e impacto da colonização de gestantes .....	12
3.2 Antibioticoterapia profilática intraparto e resistência aos antimicrobianos.....	15
3.2.1 Critérios recomendados para API.....	15
3.2.2 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	15
3.3 Métodos moleculares para detecção de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	17
3.4 Óleo de copaíba .....	20
3.4.1 Atividade antimicrobiana do óleo de copaíba .....	21
3.5 Combinação entre substâncias antimicrobianas e nanopartícula de prata.....	22
3.6 Controle do biofilme formado por <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	24
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	26
<b>5. ARTIGO 1</b> .....	33
<b>6. ARTIGO 2</b> .....	59

<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>91</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>93</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Streptococcus agalactiae* (estreptococos do grupo B - EGB) pode colonizar o trato gastrointestinal e geniturinário de indivíduos saudáveis sem sintomas de doença (MCCORD, et al. 2001). Entretanto, esta bactéria é um importante agente de infecção principalmente por causar doenças invasivas em neonatos a partir da transmissão intraparto.

As infecções nos recém-nascidos são classificadas em doença neonatal de início precoce (EOD - *early-onset disease*) cuja evolução ocorre nas primeiras 24 horas até o 7º dia após o nascimento, ou em doença neonatal de início tardio (LOD – *late-onset disease*) que ocorre após o 7º dia até 3 meses do nascimento (POYART et al., 2008). A colonização da mucosa vaginal de gestantes por EGB em presença de outros fatores de risco, tais como: bacteriúria (contagem de unidades formadoras de colônias  $\geq 10^4$  em qualquer fase da gestação), febre intraparto, parto prematuro (antes da 37ª semana gestacional), ruptura prematura da membrana amniótica com duração superior a 18 horas e antecedente de neonato acometido por EGB, aumenta significativamente a incidência de EOD por essa bactéria (WOOD; DILLON 1981; BOYER et al., 1983). Ao contrário da EOD, a aquisição de EGB nos casos de LOD nem sempre ocorre por transmissão vertical, podendo ser adquirida a partir de fontes ambientais contaminadas (MULLANEY, 2001; MACFARQUHAR et al., 2010) ou leite materno (GODAMBE et al., 2005).

Atualmente, de acordo com as diretrizes do CDC, a estratégia pré-natal para detecção da colonização por EGB é baseada em cultura, devendo ser realizada entre a 35ª e 37ª semana de gestação, com o objetivo de estabelecer a antibioticoterapia profilática intraparto (API). Entretanto, um dos problemas associado a esta ferramenta de diagnóstico é a indisponibilidade de resultados para gestantes com parto prematuro ou que não realizaram exames no período pré-natal (SCHRAG, 2004).

A detecção de EGB em um curto período de tempo pode diminuir o risco de transmissão vertical de EGB. Deste modo, a necessidade do desenvolvimento de novas metodologias que permitam um diagnóstico mais rápido para EGB, associada

à detecção de resistência aos antimicrobianos utilizados na API tem sido discutida (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010).

Testes de diagnósticos moleculares aprovados para uso pelo *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos como, por exemplo, BD GeneOhm™ StrepB (BD Diagnostics), já são comercializados. Estes realizam a detecção rápida de EGB por PCR em tempo real. São testes rápidos que podem ser aplicados diretamente na amostra de *swab* vaginal-retal, integrando todo o processo de extração, amplificação e detecção de DNA de forma totalmente automatizada (SCICCHITANO; BOURBEAU 2009), no entanto não detectam a resistência aos antimicrobianos utilizados na API. Além disso, o aumento do uso de antimicrobianos para a profilaxia tem levantado preocupações sobre a emergência de resistência microbiana aos mesmos, o que pode trazer um impacto na eficácia da própria profilaxia (VERANI; SCHRAG, 2010), reforçando a necessidade de estudos epidemiológicos e a importância da análise de novas estratégias para o controle de EGB.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Analisar estratégias alternativas para o controle de infecções neonatais por *Streptococcus agalactiae* (EGB).

### 2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Desenvolvimento de multiplex-PCR em tempo real para detecção simultânea de EGB e de marcadores de resistência a antimicrobianos em amostras de *swab* vaginal-retal de gestantes.

- Analisar e selecionar sequências nucleotídicas específicas para os genes de interesse;
- Desenhar oligonucleotídeos iniciadores específicos;
- Padronizar as condições de amplificação para cada par de oligonucleotídeo iniciador específico;
- Analisar a sensibilidade e especificidade dos iniciadores;
- Padronizar as condições da reação de multiplex PCR em tempo real;
- Detectar a presença de EGB e genes que codificam resistência a macrolídeos e lincosamidas a partir de *swab* vaginal-retal colhidos de gestantes entre a 35<sup>a</sup> e 37<sup>a</sup> semana gestacional.

2.2.2. Analisar a atividade antibacteriana do oleoresina de *Copaifera multijuga* Hayne combinado à nanopartícula de prata biogênica em EGB.

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do óleo de copaíba e nanopartícula de prata sobre células planctônicas de EGB;
- Analisar o efeito do óleo de copaíba sobre a cinética de crescimento de EGB;
- Identificar as alterações morfológicas e ultraestruturais provocadas pelo óleo de copaíba sobre as células planctônicas de EGB;
- Avaliar a atividade do óleo de copaíba sobre a formação de biofilme e sobre biofilmes maduros de EGB;
- Investigar o efeito da combinação entre o óleo de copaíba e a nanopartícula

de prata produzidas por metabólitos de *Fusarium oxysporum* sobre o crescimento de EGB;

- Determinar a citotoxicidade para células de mamíferos do óleo de copaíba e nanopartícula de prata em sinergismo.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Streptococcus agalactiae* e impacto da colonização de gestantes

*Streptococcus agalactiae*, ou estreptococo do grupo B de Lancefield (EGB), são cocos Gram-positivos agrupados em cadeias ou aos pares, beta-hemolíticos, embora cerca de 4% não produzam hemólise. A bactéria expressa uma cápsula formada por um polissacarídeo rico em ácido siálico, que permite a classificação dos isolados de EGB em 10 diferentes sorotipos [Ia, Ib, II-VIII (CIESLEWICZ et al, 2005) e IX (SLOTVED et al., 2007)].

EGB pode fazer parte da microbiota humana, colonizando principalmente o trato gastrointestinal e geniturinário (MCCORD, 2001). No entanto, pode causar doenças em gestantes, adultos não-gestantes, idosos e pacientes imunocomprometidos. Sendo um patógeno conhecido principalmente em recém-nascidos, por causar meningite, sepse e infecções invasivas (RADTKE et al., 2010).

Durante a gestação ou no período pós-parto, a colonização do trato genital por EGB geralmente é assintomática, porém manifestações clínicas também podem ser observadas na puerpera, como: infecções do trato urinário, corioamnionite, infecções associadas à cesariana ou episiotomia, sepse puerperal e, eventualmente, meningite, podem ser observadas (SCHUCHAT, 1999; SCHRAG et al., 2000).

A presença de EGB na mucosa vaginal de gestantes quando associado a outros fatores de risco, tais como: parto prematuro (antes da 37<sup>a</sup> semana gestacional), bacteriúria [com contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)  $\geq 10^4$  em qualquer fase da gestação], ruptura prematura da membrana amniótica com duração superior a 18 horas e antecedente de neonato acometido por EGB, aumenta de forma significativa a incidência de infecção neonatal por este microrganismo (SCHUCHAT, 1999).

A transmissão de EGB da mãe colonizada para o recém-nascido pode ocorrer *in utero* devido à infecção ascendente caso haja ruptura prematura da membrana; durante a passagem do feto pelo canal de parto; ou quando o neonato aspira fluido amniótico ou vaginal contaminado pelo microrganismo (WOOD; DILLON, 1981; BOYER et al., 1983; SCHUCHAT, 1998). Nestes casos, a colonização vaginal materna está fortemente associada ao desenvolvimento da doença de início precoce

(EOD - *early-onset disease*), cuja evolução ocorre nas primeiras 24 horas até o 7º dia após o nascimento, sendo as principais manifestações clínicas sepse e pneumonia grave, e em menor frequência, meningite (SCHUCHAT, 1999).

No entanto, a aquisição de EGB nem sempre ocorre por transmissão vertical, podendo ser adquirida a partir de fontes ambientais contaminadas (MACFARQUHAR et al., 2010) ou leite materno (GODAMBE; SHAH; SHAH, 2005). Geralmente essas vias de transmissão estão associadas às doenças neonatais de início tardio (LOD – *late-onset disease*) que ocorre após o 7º dia até 3 meses do nascimento, sendo caracterizada por bacteremia com alto risco de evolução para meningite (POYART et al., 2008).

Cerca de 10 a 30% das gestantes podem estar colonizadas por EGB, e aproximadamente 1 a 3% dos recém-nascidos colonizados durante o parto desenvolvem EOD em ausência de medidas de prevenção da transmissão desta bactéria. Aqueles que sobrevivem à infecção podem apresentar sequelas neurológicas graves (MIURA; MARTIN, 2001; VERANI; SCHRAG, 2010).

No final de 1980, ensaios clínicos mostraram que a EOD por EGB poderia ser evitada pelo uso de antibioticoterapia profilática intraparto (API) em mulheres colonizadas (BOYER; GOTOFF, 1986; SCHUCHAT, 1999). Diferentes iniciativas foram propostas a fim de se prevenir as doenças neonatais de início precoce. Estas foram primeiramente promovidas nos EUA, sendo posteriormente adaptadas e traduzidas para diretrizes nacionais em alguns países europeus. Em 1996, o *Centers for Disease Control and Infection* (CDC) dos EUA recomendou a triagem de EGB em meios de cultivo ou na abordagem baseada em fatores de risco como procedimentos igualmente aceitáveis (CDC 1996; SCHRAG, 2004). Em 2002, após um extenso estudo mostrando a eficácia da cultura bacteriológica para a triagem de EGB, o CDC recomendou que todas as gestantes no pré-natal realizassem este procedimento, com o objetivo de estabelecer a API em mulheres colonizadas.

De acordo com as diretrizes do CDC, a estratégia pré-natal para detecção da colonização por EGB baseada em cultura de *swab* vaginal-retal deve ser realizada entre a 35ª e 37ª semana de gestação (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010). No entanto, o tempo para obtenção do resultado é uma das principais desvantagens do diagnóstico baseado em cultura.

A rotina para a detecção de EGB consiste em, primeiramente, realizar a incubação da amostra do *swab* vaginal-retal em caldo seletivo de enriquecimento LIM por 24 horas com posterior subcultura em ágar sangue (SCHRAG et al., 2002), o que exige aproximadamente 72 horas para a liberação do resultado. Portanto, este método não seria viável para gestantes com parto prematuro ou que não realizaram exames no período pré-natal (SCHRAG, 2004). Além disso, estima-se que a cultura direta de *swabs* produz falso-negativo em até 50% das amostras analisadas (CDC, 2010). Outra desvantagem associada ao método de cultura é que os cultivos realizados antes do parto não podem prever com segurança o estado da portadora no intraparto já que a colonização vaginal por EGB pode ser intermitente.

Em concordância com essa desvantagem, El Helali et al., (2009) avaliaram 818 mulheres que tiveram resultados negativos de rastreio durante a 35<sup>a</sup> a 37<sup>a</sup> semana de gestação, destas 65 (7,9%) foram positivas na detecção pré-parto para EGB, mas não receberam API. Dentre essas gestantes, foram documentados 4 neonatos infectados e 9 colonizados.

Corroborando com os dados previamente apresentados, Abdelazim (2013) verificou que 23,1% das mulheres com cultura de EGB anteparto negativa apresentaram cultura pré-parto positiva. Estas mulheres também não receberam API. Além disso, 14 (4,3%) mulheres, que receberam API, com cultura anteparto positiva apresentaram cultura pré-parto negativa.

Um estudo realizado por Lin et al., (2011) mostrou que aproximadamente 10% das gestantes negativas para EGB no pré-natal tornaram-se positivas durante o trabalho de parto e, conseqüentemente, não receberam profilaxia intraparto, estando nestes casos, os recém-nascidos propensos a adquirir EGB. Resultado compatível com o estudo realizado por Puopolo; Madoff; Eichenwald (2005) no qual a maioria dos casos de doença neonatal de início precoce ocorreu em mulheres que apresentaram resultados negativos para colonização por EGB no pré-natal. Além disso, há a possibilidade de mulheres positivas para EGB no pré-natal se tornarem negativas durante o parto, não necessitando a API (LIN et al., 2011).

Ademais, fundamentado em estudos sobre fatores de riscos, algumas gestantes recebem API devido ao alto risco de transmissão vertical de EGB, entretanto o uso generalizado de antibióticos pode estar associado com anafilaxia

materna (WEISS; ADKINSON, 1988), custo hospitalar (VERANI; SCHRAG, 2010), além de alterar a microbiota normal.

### **3.2 Antibioticoterapia profilática intraparto e resistência aos antimicrobianos**

#### **3.2.1 Critérios recomendados para API**

A penicilina G por via intravenosa (I.V., 1ª dose:  $5,0 \times 10^6$  unidades seguido por  $2,5-3,0 \times 10^6$  unidades a cada 4 horas), é o agente de escolha para a profilaxia intraparto, podendo alternativamente ser utilizada a ampicilina com dose inicial de 2 g I.V. na admissão da gestantes seguido por 1 g I.V. a cada 4 horas até o parto (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010).

Entretanto, gestantes alérgicas à penicilina devem receber clindamicina, 900 mg I.V. a cada 8 horas até o parto, caso o isolado de EGB seja sensível à clindamicina e eritromicina no teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro*. Já em casos em que os isolados são intrinsecamente resistentes à clindamicina, com resistência induzível ou quando o perfil a esses agentes são desconhecidos, a gestante deve ser tratada com vancomicina na dose de 1 g a cada 12 horas. Em contrapartida, ainda é limitado o conhecimento sobre a capacidade da clindamicina e vancomicina de atingirem concentrações satisfatórias na corrente sanguínea do feto (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010).

#### **3.2.2 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos**

A penicilina e ampicilina continuam sendo os fármacos de escolha para a profilaxia, assim como para o tratamento de infecções por EGB em adultos, uma vez que a maioria dos isolados clínicos permanece sensível a esses antimicrobianos em diferentes países (OTAGUIRI et al., 2013; JIANG et al., 2016; MARTINS et al., 2017). Nenhum critério para classificar o isolado de EGB como "resistente à penicilina" foi estabelecido até o momento pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), sendo classificado como isolados não sensíveis aqueles que apresentam Concentração Inibitória Mínima (CIM)  $> 0,12$  e  $> 0,25$  mg/mL para penicilina e ampicilina, respectivamente (KIMURA et al., 2008; CLSI, 2017). O

principal mecanismo de resistência a esse fármaco é a mutação das PBPs (*penicillin-binding-protein*), proteínas que participam da biossíntese da parede celular. O acúmulo de mutações nas proteínas de ligação à penicilina PBP1, PBP2b e PBP2X, já foram descritas (BETRIU et al., 1994; KIMURA et al., 2008, NAGANO et al., 2009).

Ao contrário da penicilina, a resistência aos macrolídeos e lincosamidas em isolados de EGB tem sido descrita em diversos países (UENO et al., 2012; OVIEDO et al., 2013; ROJO-BEZARES et al., 2016; MARTINS et al., 2017). Os mecanismos de resistência à macrolídeos mais comuns em *Streptococcus* spp. ocorrem por metilação pós-transcricional dos resíduos de adenina presentes no RNA ribossomal 23S (WEISBLUM, 1985) ou por efluxo do antimicrobiano mediado por uma proteína ligada à membrana (CLANCY et al., 1996).

A resistência de EGB aos macrolídeos e lincosamidas é codificada pelos genes *erm* e *mef*. Genes *erm* tais como *erm(B)*, *erm(A)* (subclasse *ermTR*) ou *erm(C)* codificam metilases responsáveis pela metilação do sítio-alvo nos ribossomos. A expressão destes genes é descrita como fenótipo MLS<sub>B</sub>, responsável por gerar resistência cruzada a macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B. Este mecanismo pode ser constitutivo (cMLS<sub>B</sub>) quando a bactéria é resistente a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B ou indutivo (iMLS<sub>B</sub>) que gera resistência à lincosamidas e estreptograminas do grupo B induzida pelo macrolídeo (LECLERCQ, 2002). A resistência induzível à clindamicina é avaliada pelo teste de difusão de disco-duplo (teste D), que consiste em testar a eritromicina (15 µg) e clindamicina (2 µg) por disco-difusão dispondo os discos a uma distância de 12 mm. Um resultado positivo é interpretado visualmente como achatamento (assemelhando-se a letra D) do halo de inibição da clindamicina adjacente ao disco de eritromicina (CLSI, 2017). Enquanto as bombas de efluxo são codificadas pelos genes *mef*, responsáveis pelo fenótipo M, que conferem resistência apenas aos macrolídeos. Os genes variantes principais, *mef(A)* e *mef(E)*, foram primeiramente identificados em *Streptococcus pyogenes* (CLANCY et al., 1996) e *Streptococcus pneumoniae* (TAIT-KAMRADT et al., 1997) respectivamente, podendo ambos estar presentes em isolados de EGB (ZENG et al., 2006).

O uso da API tem levantado preocupações sobre a emergência de resistência microbiana aos mesmos, podendo trazer um impacto na eficácia da própria profilaxia. A resistência de EGB aos macrolídeos e lincosamidas tem sido descrita em vários estudos. Uma pesquisa que abrangeu a caracterização de EGBs isolados de 15 locais diferentes do Brasil, representante das cinco regiões geográficas brasileiras, mostrou uma taxa de resistência à eritromicina e clindamicina de 4,1% e 3%, respectivamente. Entre os isolados resistentes à eritromicina, o fenótipo cMLS<sub>B</sub> foi o predominante, seguido pelos fenótipos M e iMLS<sub>B</sub> (DUTRA et al., 2014). Resultados obtidos por Melo et al. (2016) mostraram resistência de 8,1% e 5,9% para eritromicina e clindamicina, respectivamente entre isolados de EGB obtidos de gestantes no Paraná. Entretanto, uma prevalência de 16,7% de EGBs resistentes a clindamicina foi descrito em isolados obtidos de *swab* vaginal-retal de gestantes no Rio de Janeiro (CORREA et al., 2011). Neste mesmo estado do Brasil, entre 2002 e 2010 foram detectados 4,5% de isolados resistentes à eritromicina e clindamicina, enquanto que entre 2011 a 2013 houve um crescimento na taxa de resistência para 12,2% e 14,3% para clindamicina e eritromicina, respectivamente (BARROS; SOUZA; LUIZ, 2016).

A taxa de isolados de EGB resistentes aos macrolídeos e lincosamidas no Brasil é similar aos valores reportados na Argentina (11,6%), Japão (12,8%) (UENO et al., 2012; OVIEDO et al., 2013), no entanto menores que as taxas relatadas em estudos epidemiológicos realizados na Europa no qual a prevalência varia de 16 a 36% para eritromicina e 14 a 43% para clindamicina (HAYS et al. 2016; MATANI et al., 2016, ROJO-BEZARES et al., 2016; MARTINS et al., 2017). Além disso, taxas significativas de resistência têm sido relatadas na China de 69 a 78% para eritromicina e 50 a 64% para clindamicina (WANG et al., 2015; JIANG et al., 2016).

### 3.3 Métodos moleculares para detecção de *Streptococcus agalactiae*

Na ausência de uma vacina disponível contra EGB, a detecção de colonização materna por um método rápido, sensível e específico é crucial para o controle da transmissão da bactéria ao neonato e, conseqüentemente, o desenvolvimento de EOD (ZOYSA et al., 2012).

Um teste de triagem ideal é aquele que pode identificar com precisão as gestantes colonizadas por EGB em um curto período de tempo, já que a cultura é um método demorado. Os esforços para minimizar o tempo de obtenção do resultado levaram ao desenvolvimento de técnicas baseadas em amplificação de ácidos nucleicos, tais como PCR em tempo real, que tem revolucionado a área de diagnóstico de doenças infecciosas. Estes testes podem ser utilizados no período perinatal, principalmente em mulheres que desconhecem o *status* de colonização por EGB, permitindo o estabelecimento de API quando necessário e, assim, reduzir a probabilidade de EOD no recém-nascido (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010; DE LUCA et al., 2016).

Testes aprovados para uso pelo *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos como, BD GeneOhm™ StrepB (BD Diagnostics), assim como o IDI-Strep B (Infectio Diagnostic) e GBS-GeneXpert (Cepheid) baseiam-se na amplificação em tempo real do gene *cfb* que codifica o fator CAMP (*Christie, Atkins e Munch-Petersen*) que é utilizado para identificação fenotípica de EGB. São testes rápidos que podem ser aplicados diretamente na amostra de *swab* vaginal-retal, integrando todo o processo de extração, amplificação e detecção de DNA de forma totalmente automatizada (SCICCHITANO; BOURBEAU 2009).

Diferentes estudos realizaram uma análise comparativa entre métodos baseados em PCR e o método de cultura para detecção de colonização por EGB em gestantes. De Paris et al., (2011) reportaram que a PCR em tempo real utilizando o gene *atr* (codifica um transportador de aminoácidos) apresentou sensibilidade de 100% quando comparado com os resultados de cultura positiva, e especificidade de 82,6% onde ambas as técnicas foram negativas. Neste estudo, provavelmente a alta sensibilidade ocorreu devido ao uso prévio de caldo seletivo e de enriquecimento anterior a PCR. Feuerschuette et al., (2012) analisaram a PCR em tempo real utilizando o gene *sip* (codifica uma proteína imunogênica de superfície) e reportaram uma sensibilidade de 89,0% e especificidade de 82,0%.

Chan et al., (2014) utilizaram o kit BD GeneOhm™ StrepB para detecção de EGB em gestantes com ruptura de membrana a termo (37ª semana ou mais). Comparado ao método de cultura, o teste molecular apresentou sensibilidade de 89,0% e especificidade de 97,9%. Abdelazim (2013) mostrou que o kit GBS-GeneXpert apresentou sensibilidade de 98,3% e especificidade de 99,0%

comparado à sensibilidade e especificidade de 73,0% e 95,5%, respectivamente, para o método de cultura anteparto. Recentemente Tanaka et al., (2016) compararam o desempenho do kit GBS-GeneXpert realizado a partir de DNA extraído diretamente de amostras de *swab* vaginal-retal com o método de cultura. Apenas cinco das 152 amostras analisadas apresentaram discordância, sendo uma amostra com PCR positivo e cultura negativa e quatro amostras com PCR negativo e cultura positiva. A sensibilidade e a especificidade do método molecular foi de 86,2% e 99,2%, respectivamente. De forma semelhante, El Helali et al., (2009) mostraram que o kit GBS-GeneXpert apresentou sensibilidade de 98,5% e especificidade de 99,6% quando comparado ao método de cultura de *swab* vaginal-retal de gestantes.

Uma vantagem associada ao uso do PCR em tempo real é o tempo de execução do método que permite sua utilização nas horas que antecedem o parto realizado a partir da admissão da gestante na maternidade. O tempo de 48 - 72 horas necessárias para a identificação de EGB em culturas pré-parto dificultam a sua utilização para rastreio pré-parto. O tempo médio para os resultados do teste pelo sistema comercial GeneXpert ficar disponível é de  $87,8 \pm 12,3$  minutos, sendo o tempo médio de admissão de mulheres até o nascimento de  $534,0 \pm 582,0$  min (ABDELAZIM, 2013). Deste modo, como mencionado anteriormente, testes rápidos baseados em PCR na admissão para o parto podem melhorar a precisão do rastreio ao identificar o estado de colonização nas primeiras horas da admissão da gestante nas maternidades (VAN DYKE et al., 2009).

Considerando a existência de resistência aos macrolídeos e lincosamidas entre isolados de EGB, a detecção combinada da bactéria e de marcadores de resistência constitui-se em um avanço no manejo da API em gestantes alérgicas à penicilina com alto risco de anafilaxia (MELIN, 2011). Assim, novos métodos que combinam identificação e detecção de resistência aos antimicrobianos devem ser explorados para direcionar API apropriada para cada gestante e desta forma minimizar falhas na profilaxia. Até o momento, somente um estudo reportado na literatura descreveu a detecção simultânea de EGB e marcadores de resistência. Dela Cruz et al., (2007) descreveram uma PCR em tempo real baseado em sondas para detectar a presença de genes de resistência à clindamicina e macrolídeos (*ermB*, *ermTR*, *mefA*) e identificação de EGB (*cfb*) utilizando DNA bacteriano após o

isolamento em cultura. No entanto este estudo não analisou o uso deste método em DNA extraído diretamente de amostras de *swab* vaginal-retal.

### 3.4 Óleo de copaíba

O estudo sobre produtos naturais que possam fornecer novas estratégias de tratamento e prevenção de doenças é de constante interesse científico. Neste sentido, o óleo de copaíba, que é amplamente utilizado como planta medicinal pela população da região Amazônica brasileira, vem sendo estudado em decorrência de suas diferentes atividades biológicas que incluem: atividade anti-inflamatória (VEIGA JUNIOR et al., 2007), anti-tumoral (LIMA et al., 2003), anti-nociceptivo (GOMES et al., 2010) e antimicrobiana (VASCONCELOS et al., 2008). Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* corroboram com o uso do óleo de copaíba como nova estratégia de tratamento em seres humanos. Dados mostram que o tratamento com creme vaginal contendo 2,5% de óleo de copaíba em ratas gestantes (*Rattus norvegicus*) não causou toxicidade materna, não interferiu no desempenho reprodutivo durante a gravidez na dose testada e não ocasionou anomalias externas e / ou malformações em ratos recém-nascidos (LIMA et al., 2011). *In vitro*, diterpenos extraídos de óleo de copaíba apresentaram baixa toxicidade em glóbulos vermelhos de humanos, achado importante para seu uso em medicações que atuam no sistema circulatório (SANTOS et al., 2013)

No Brasil, são conhecidas mais de 25 espécies de árvores do gênero *Copaifera*, da família Fabaceae, que crescem principalmente na região norte (Amazonas e Pará), e nordeste (Ceará) do Brasil. Estas árvores produzem um oleoresina, conhecido como óleo de copaíba, que é obtida por exsudação dos troncos de árvores. O material exsudado é transparente, líquido com uma coloração que varia de amarelo ao castanho-claro (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002).

O óleo de copaíba é importante a partir de um ponto de vista químico por ser rico em diterpenos e sesquiterpenos (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002). Na composição química do óleo de *C. multijuga* Hayne já foram identificados trinta e cinco componentes, sendo trinta e um sesquiterpenos e quatro diterpenos, no qual o  $\beta$ -cariofileno e óxido de cariofileno são os principais constituintes. Um estudo feito com dezesseis amostras de óleo extraídas de *C.*

*multijuga* mostrou que não existem diferenças quantitativas entre os principais constituintes. As variações qualitativas dos óleos apresentaram uma relação com o tipo de solo, e permitiram a diferenciação das amostras em dois grupos com composições distintas, contendo o primeiro como substância majoritária o  $\beta$ -cariofileno e o segundo a presença de óxido de cariofileno. Entretanto a sazonalidade e o diâmetro à altura do peito não apresentaram influência significativa na composição química destas espécies (BARBOSA et al., 2012)

O óleo é também descrito como um composto volátil emitido pelas plantas para a atmosfera em resposta ao ataque de herbívoros. Deste modo, a variação na composição química pode ser indiretamente influenciada pela disponibilidade de água na estação chuvosa. Este ambiente favorece a atividade de microrganismos, como fungos e bactérias, e insetos herbívoros, que também são abundantes neste período. Assim, os componentes que defendem as plantas de agentes externos estariam enriquecidos no óleo de copaíba coletado neste período (BARBOSA et al., 2012).

O uso do óleo de copaíba na medicina popular, sua padronização e controle de qualidade são pontos importantes. Fonseca et al., obtiveram dados que confirmam diferenças químicas entre amostras de óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) vendidas no mercado. Todas as amostras testadas apresentaram propriedade antimicrobiana *in vitro* confirmando o potencial antimicrobiano do óleo de copaíba, entretanto, os resultados da análise físico-química reforçam a necessidade do uso de métodos convencionais para análise do óleo e regulação da qualidade destes produtos.

#### 3.4.1 Atividade antimicrobiana do óleo de copaíba

Pesquisas relacionadas com o efeito antimicrobiano do óleo de copaíba de diferentes espécies, como *C. multijuga*, *C. oblongifolia*, *C. martii*, *C. cearensis*, *C. paupera*, *C. langsdorffii*, *C. officinalis*, *C. lucens* e *C. reticulata* em diferentes isolados de bactérias e fungos foram realizados no Brasil (SANTOS et al., 2008; MENDONÇA; ONOFRE, 2009; MORAES et al., 2016).

Um estudo que avaliou o efeito do óleo de copaíba de diferentes espécies em bactérias Gram positivas e Gram negativas, leveduras e dermatófitos mostrou uma

boa atividade somente em bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* sensível e resistente à meticilina (MSSA e MRSA, respectivamente), *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, e uma atividade moderada frente aos dermatófitos (SANTOS et al., 2008). Compatível com o estudo de Abrão et al. (2015) no qual as bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus capitis*, *E. faecalis* e *Streptococcus pneumoniae*, foram mais sensíveis aos compostos testados do que as bactérias Gram-negativas.

Mendonça e Onofre (2009) reportaram que óleo de *C. multijuga* inibe o crescimento de *Escherichia coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Vasconcelos et al., (2008) observaram que o oleoresina de *C. multijuga* Hayne associado com hidróxido de zinco (ZnO) e hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>] apresentaram atividade antimicrobiana quando usado como cimento dental para *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguine*.

O efeito bacteriostático de *C. officinalis*, foi previamente relatado em *S. mutans* (PIERI et al., 2012), e terpenoides obtidos de *C. langsdorffii* apresentaram atividade antibacteriana em *Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* (SOUZA et al., 2011), *Streptococcus dysgalactiae*, *S. pneumoniae*, *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* e *S. agalactiae* (ABRAO et al., 2015).

Os mecanismos pelos quais o oleoresina de *Copaifera* spp. inibe o crescimento microbiano ainda não foram esclarecidos. Santos et al., (2008) mostraram que o oleoresina de *C. martii* induz a ruptura da parede celular, liberação de conteúdo citoplasmático, e diminuição do volume celular em isolados de *S. aureus*, indicando que o este composto pode afetar a integridade da parede celular.

### 3.5 Combinação entre substâncias antimicrobianas e nanopartícula de prata

Devido à detecção de resistência antimicrobiana e ausência de novos fármacos, pesquisas com compostos, como a nanopartículas de prata, aumentaram devido ao seu potencial efeito antimicrobiano (CARDOZO et al., 2013; ADAMS et al., 2014). As nanopartículas foram inicialmente produzidas com sucesso por via química ou física, entretanto são métodos caros e envolvem o uso de produtos

químicos nocivos ao ambiente e ao homem. Portanto, como alternativa recorreu-se ao uso da biossíntese de nanopartícula, utilizando-se microrganismos ou plantas, conhecida por ser uma alternativa sustentável, eco-amigável, de custo baixo e biocompatível (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010).

Um importante aspecto da atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata é o efeito sinérgico que ocorre quando estas são combinadas com outros compostos naturais e sintéticos. Pesquisas envolvendo esse efeito sinérgico são promissoras, pois oferecem a possibilidade de se reduzir o uso de antimicrobianos a fim de se combater a resistência bacteriana (DURÁN et al, 2016).

Além disso, estudos envolvendo sinergismo têm sido muito importantes para a terapia antibacteriana, principalmente para bactérias multirresistentes. A combinação de fenazina-1-carboxamida e nanopartícula de prata produzida por metabólitos de *Fusarium oxysporum* (AgNPbio) mostraram efeito sinérgico com diminuição de até 32 vezes o valor da CIM da fenazina em MRSA (CARDOSO et al., 2013). Biasi-Garbin et al., (2015) observaram que o eugenol possui atividade bactericida em isolados de EGB, incluindo aqueles que exibem diferentes mecanismos de resistência à eritromicina e/ou clindamicina. Este composto em sinergismo com AgNPbio apresentou valores diminuídos da CIM do eugenol e nanopartícula de prata de 4 a 8 vezes e 4 a 256 vezes, respectivamente. A combinação do óleo de orégano com AgNPbio foi capaz de reduzir os valores de CIMs dos compostos quando comparados aos resultados obtidos nos tratamentos individuais, resultando em sinergismo ou aditismo para diferentes microrganismos que incluem: isolados de *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella enterica* Typhimurium; assim como isolados de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos, tais como MRSA, *E.coli* KPC, *E.coli* ESBL e *Acinetobacter baumannii* CR (SCANDORIEIRO et al. 2016).

Fayaz et al., (2010) mostraram que a nanopartícula de prata biossintetizada pelo fungo *Trichoderma viride* possui atividade contra isolados de *E. coli*, *Salmonella typhi*, *S. aureus* e *Micrococcus luteus*. Além disso, esta nanopartícula em combinação com antibióticos comerciais, como ampicilina, canamicina, eritromicina e cloranfenicol potencializam o efeito antibacteriano. Este efeito sinérgico pode ser explicado pela interação dos grupos hidroxilas e amidas dos antibióticos, que reagem facilmente com nanopartícula por quelação. Assim, por exemplo, a

ampicilina interfere na biossíntese da parede celular, alterando sua estrutura e dessa forma facilita a penetração das nanopartículas na bactéria. O complexo nanopartícula-ampicilina reage com o DNA impedindo seu desenovelamento, o que resultaria em danos mais graves para as células bacterianas.

### 3.6 Controle do biofilme formado por *Streptococcus agalactiae*

O biofilme é definido como uma comunidade de células irreversivelmente associadas a superfícies bióticas ou abióticas, formando microcolônias envoltas por uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas (DONLAN, 2002).

Semelhante a outras bactérias Gram-positivas que colonizam o hospedeiro humano, EGB pode formar biofilmes que facilitam a sua sobrevivência em condições de estresse ambiental (PARKER et al., 2016). A colonização e a infecção por EGB em superfícies epiteliais dependem da sua capacidade de adesão e persistência na superfície epitelial da mucosa. Neste *habitat*, a formação dessas comunidades podem facilitar a sobrevivência e aumentar a resistência às defesas do hospedeiro e privação de nutrientes (ROSINI; MARGARIT, 2015).

Os antibióticos podem ter apenas efeitos mínimos a longo prazo na prevenção ou tratamento de biofilmes estabelecidos, já que a maioria dos antibióticos são projetados para agir em células planctônicas metabolicamente ativas, podendo não atuar em células sésseis (COSTERTON; STEWART, 2001).

Como relatado na literatura para outros microrganismos (DI LUCA et al., 2017) as concentrações de antimicrobianos como fosfomicina, rifampicina, benzilpenicilina, daptomicina e levofloxacina, para erradicar biofilmes de *S. agalactiae*, *S. pyogenes* e *S. oralis* são consideravelmente maiores (125 vezes maior) quando comparadas às necessárias em células planctônicas. Além disso, essas concentrações não podem ser alcançadas na prática clínica. Entre vários antimicrobianos testados contra células sésseis, apenas a gentamicina erradicou completamente o biofilme com baixa concentração que variou de 4 a 16 mg/L (MORENO; TRAMPUZ; DI LUCA, 2017). O uso do digluconato de clorexidina apresentou um efeito inibitório significativo no crescimento planctônico de EGB, no entanto, não foi observada inibição significativa durante os estágios de formação do biofilme (EBRAHIMI et al., 2014).

A nanopartícula de prata utilizada isoladamente ou em combinação com antimicrobianos (gentamicina, tetraciclina, estreptomicina, cafalospolina, kanamicina e penicilina) apresenta uma atividade antibiofilme promissora contra isolados de EGB, sendo sua ação maior quando utilizada com antimicrobianos (EBRAHIMI et al., 2017)

Poucos estudos analisaram o efeito de substâncias naturais sobre o biofilme de EGB. O eugenol apresenta atividade inibitória sobre o crescimento de células planctônicas quanto em biofilmes de EGB isolados de gestantes, com capacidade de inibir sua formação, bem como a viabilidade de biofilme maduro *in vitro* (BIASIGARBIN et al., 2015).

Um estudo que avaliou a atividade antibiofilme de méis, natural e artificial, em biofilme multi-espécies, constituído de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*, mostrou que os méis naturais testados foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular do biofilme maduro, entretanto, o mel artificial não teve efeito significativo, após 24 e 48 h de tratamento (SOJKA et al., 2016)

Pesquisas relatam a atividade do óleo de copaíba em biofilmes formados por diferentes microrganismos. O oleoresina de *C. oblongifolia* apresentou atividade antibiofilme contra bactérias causadoras de infecções orais, como *Lactobacillus case*, *Peptostreptococcus micros*, *S. mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mitis* e *Porphyromonas gingivalis* (MORAES et al., 2016). Enquanto o oleoresina de *C. officinalis* interferiu na adesão de *C. albicans*, importante agente da candidíase oral, à superfície de um composto que mimetiza a dentadura (TOBOUTI et al., 2016) . No entanto, não há estudos da atividade do óleo de copaíba em células sésseis de EGB.

#### 4 REFERÊNCIAS

- ABDELAZIM, I. A. Intrapartum polymerase chain reaction for detection of group B *Streptococcus* colonisation. **Aust N Z J Obst Gynaecol**, v. 53, n. 3, p. 236-242, 2013.
- ABRAO, F. et al. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 443, 2015.
- ADAMS, C. P. et al. Size-dependent antimicrobial effects of novel palladium nanoparticles. **PloS one**, v. 9, n. 1, p.e85981, 2014.
- BARBOSA, P. C. S. et al. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. **J Braz Chem Soc**, v. 23, p. 1823-1833, 2012.
- BARROS, R. R.; DE SOUZA, A. F.; LUIZ, F. B. Polyclonal spread of *Streptococcus agalactiae* resistant to clindamycin among pregnant women in Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, n. 7, p. 2054-2056, 2016.
- BETRIU, C. et al. Antibiotic resistance and penicillin tolerance in clinical isolates of group B streptococci. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, n. 9, p. 2183-2186, 1994.
- BIASI-GARBIN, R. P. et al. Effect of Eugenol against *Streptococcus agalactiae* and Synergistic Interaction with Biologically Produced Silver Nanoparticles. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2015, p. 861497, 2015.
- BOYER, K. M. et al. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. **The Journal of infectious diseases**, v. 148, n. 5, p. 802-809, 1983.
- BOYER, K. M.; GOTOFF, S. P. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. **N Engl J Med**, v. 314, n. 26, p. 1665-1669, 1986.
- CARDOZO, V. F. et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 12, p. 12, 2013.
- CDC. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. Centers for Disease Control and Prevention. **MMWR Recomm Rep**, v. 45, n. RR-7, p. 1-24, 1996.
- CHAN, W. S. et al. Rapid identification of group B *Streptococcus* carriage by PCR to assist in the management of women with prelabour rupture of membranes in term pregnancy. **Aust N Z J Obst Gynaecol**, v. 54, n. 2, p. 138-145, 2014.

- CIESLEWICZ, M. J. et al. Structural and genetic diversity of group B *Streptococcus* capsular polysaccharides. **Infect Immun**, v. 73, n. 5, p. 3096-3103, 2005.
- CLANCY, J. et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. **Mol Microbiol**, v. 22, n. 5, p. 867-879, 1996.
- CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Documento M100-S27. Wayne, PA, USA, 2017.
- CORREA, A. B. et al. The genetic diversity and phenotypic characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 1002-1006, 2011.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S. Battling biofilms. **Sci Am**, v. 285, n. 1, p. 74-81, 2001.
- DE LUCA, C. et al. Screening and management of maternal colonization with *Streptococcus agalactiae*: an Italian cohort study. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 29, n. 6, p. 911-915, 2016.
- DE PARIS, F. et al. Group B *Streptococcus* detection comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women. **Braz J Infect Dis**, v.15 n.4, p. 323- 327, 2011.
- DELA CRUZ, W. P. et al. Rapid determination of macrolide and lincosamide resistance in group B *Streptococcus* isolated from vaginal-rectal swabs. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 2007, p. 46581, 2007.
- DI LUCA, M. et al. Detection of biofilms in biopsies from chronic rhinosinusitis patients: in vitro biofilm forming ability and antimicrobial susceptibility testing in biofilm mode of growth of isolated bacteria. **Adv Exp Med Biol**, 2017.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.
- DURAN, N. et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: NBM**, v. 12, n. 3, p. 789-799, 2016.
- DUTRA, V. G. et al. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. **BMC Infect Dis**, v. 14, p. 323, 2014.
- EBRAHIMI, A. et al. Chlorhexidine digluconate effects on planktonic growth and biofilm formation in some field isolates of animal bacterial pathogens. **Jundishapur J Nat Pharm Prod**, v. 9, n. 2, p. e14298, 2014.

- EBRAHIMI, A. et al. Evaluation of Anti biofilm and Antibiotic Synergistic Activities of Silver Nano particles Against Some Common Bacterial Pathogens. **Int J Basic Sci Med**, v.2, n.3, p.128-132, 2017.
- EL HELALI, N. et al. Diagnostic accuracy of a rapid real-time polymerase chain reaction assay for universal intrapartum group B *Streptococcus* screening. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 3, p. 417-423, 2009.
- FAYAZ, A. M. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine: NBM**, v. 6, n. 1, p. 103-109, 2010.
- FEUERSCHUETTE, O. M. et al. Performance of RT-PCR in the detection of *Streptococcus agalactiae* in the anogenital tract of pregnant women. **Arch Gynecol Obstet**, v. 286, n. 6, p. 1437-1442, 2012.
- FONSECA, R. G. et al. Physicochemical and antimicrobial properties of copaiba oil: implications on product quality control. **Acta Sci Pol Technol Aliment**, v. 14, n. 3, p. 215-225, 2015.
- GODAMBE, S.; SHAH, P. S.; SHAH, V. Breast milk as a source of late onset neonatal sepsis. **Pediatr Infect Dis J**, v. 24, n. 4, p. 381-382, 2005.
- GOMES, N. M. et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **J Ethnopharmacol**, v. 128, n. 1, p. 177-183, 2010.
- HAYS, C. et al. Changing Epidemiology of Group B *Streptococcus* Susceptibility to Fluoroquinolones and Aminoglycosides in France. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 12, p. 7424-7430, 2016.
- JIANG, H. et al. Molecular Characterization of *Streptococcus agalactiae* Causing Community- and Hospital-Acquired Infections in Shanghai, China. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1308, 2016.
- KIMURA, K. et al. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 8, p. 2890-2897, 2008.
- LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clin Infect Dis**, v.34, n. 4, p. 482-492, 2002.
- LIMA, S. R. et al. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytother Res: PTR**, v. 17, n. 9, p. 1048-1053, 2003.
- LIMA, C. S. et al. Pre-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1013-1023, 2011.

- LIN, F. Y. et al. Assessment of intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of early-onset group B streptococcal disease. **Pediatr Infect Dis J**, v. 30, n. 9, p. 759-763, 2011.
- MACFARQUHAR, J. K. et al. Outbreak of late-onset group B *Streptococcus* in a neonatal intensive care unit. **Am J Infect Control**, v. 38, n. 4, p. 283-288, 2010.
- MARTINS, E. R. et al. *Streptococcus agalactiae* Causing Neonatal Infections in Portugal (2005-2015): Diversification and Emergence of a CC17/PI-2b Multidrug Resistant Sublineage. **Front Microbiol**, v. 8, p. 499, 2017.
- MATANI, C. et al. *Streptococcus agalactiae*: prevalence of antimicrobial resistance in vaginal and rectal swabs in Italian pregnant women. **Le Infez Med**, v. 24, n. 3, p. 217-221, 2016.
- MCCORD, N. et al. A complete audit cycle of intrapartum group B *Streptococcus* prophylaxis. **Health Bull (Edinb)**, v. 59, n. 4, p. 263-267, 2001.
- MELIN, P. Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 9, p. 1294-1303, 2011.
- MELO, S. C. et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 58, p. 83, 2016.
- MENDONÇA, D.E.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Braz J Pharmacogn**, v.19, 577-581, 2009.
- MIURA, E; MARTIN, M.C. Group B streptococcal neonatal infections in Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.43, n.5, 243-246, 2001.
- MORAES, T.S. et al. In vitro Evaluation of *Copaifera oblongifolia* Oleoresin Against Bacteria Causing Oral Infections and Assessment of Its Cytotoxic Potential. **Current Pharm Biotechn**, v. 17, n. 10, p. 894-904, 2016.
- MORENO, M. G.; TRAMPUZ, A.; DI LUCA, M. Synergistic antibiotic activity against planktonic and biofilm-embedded *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus oralis*. **J Antimicrob Chemother**, 2017.
- MULLANEY, D. M. Group B streptococcal infections in newborns. **J Obstet Gynecol Neonatal Nurs: JOGNN**, v. 30, n. 6, p. 649-658, 2001.
- NAGANO, N. et al. Molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility recurrently isolated from a sacral decubitus ulcer. **J Antimicrob Chemother**, v. 64, n. 6, p. 1326-1328, 2009.
- NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 156, n. 1-2, p. 1-13, 2010.

OVIEDO, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. First study in a province of Argentina. **Braz J Microbiol**, v. 44, n. 1, p. 253-258, 2013.

OTAGUIRI, E. S. et al. Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Parana, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. **BMC Microbiol**, v. 13, p. 297, 2013.

PARKER, R. E. et al. Association between genotypic diversity and biofilm production in group B *Streptococcus*. **BMC Microbiol**, v. 16, p. 86, 2016.

PIERI, F. A. et al. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Braz Dent J**, v. 23, n. 1, p. 36–38, 2012.

POYART, C. et al. Invasive group B streptococcal infections in infants, France. **Emerg Infect Dis**, v. 14, p. 1647-1649, 2008.

PUOPOLO, K. M.; MADOFF, L. C.; EICHENWALD, E. C. Early-onset group B streptococcal disease in the era of maternal screening. **Pediatrics**, v. 115, n. 5, p. 1240-1246, 2005.

RADTKE, A. et al. Rapid multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) for genotyping of *Streptococcus agalactiae*. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 7, p. 2502-2508, 2010.

ROJO-BEZARES, B. et al. *Streptococcus agalactiae* from pregnant women: antibiotic and heavy-metal resistance mechanisms and molecular typing. **Epidemiol Infect**, v. 144, n. 15, p. 3205-3214, 2016.

ROSINI, R.; MARGARIT, I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 5, p. 6, 2015.

SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008.

SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59-64, 2013.

SCANDORIEIRO, S. et al. Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. **Front Microbiol**, v. 7, p. 760, 2016.

SCHRAG, S. J. et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. **N Engl J Med**, v. 342, n. 1, p. 15-20, 2000.

SCHRAG, S. et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. **MMWR Recomm Rep**, v. 51, n. RR-11, p. 1-22, 2002.

SCHRAG, S. J. The past and future of perinatal group B streptococcal disease prevention. **Clin Infect Dis**, v. 39, n. 8, p. 1136-1138, 2004.

SCHUCHAT, A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 3, p. 497-513, 1998.

SCHUCHAT, A. Group B *Streptococcus*. **Lancet**, v. 353, n. 9146, p. 51-56, 1999.

SCICCHITANO, L. M.; BOURBEAU, P. P. Comparative evaluation of the AccuProbe Group B *Streptococcus* Culture Test, the BD GeneOhm Strep B assay, and culture for detection of group B streptococci in pregnant women. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 9, p. 3021-3023, 2009.

SLOTVED, H. C. et al. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 9, p. 2929-2936, 2007.

SOJKA, M. et al. Antibiofilm efficacy of honey and bee-derived defensin-1 on multi-species wound biofilm. **J Med Microbiol**, 2016.

SOUZA, A.B. et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytother Res**, v.25, n.2, p.215-220, 2011.

TAIT-KAMRADT, A. et al. *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, p. 2251–2255, 1997.

TANAKA, K. et al. Intrapartum group B *Streptococcus* screening using real-time polymerase chain reaction in Japanese population. **Matern Fetal Neonatal Med**, v. 29, n. 1, p. 130-134, 2016.

TOBOUTI, P. L. et al. Influence of melaleuca and copaiba oils on *Candida albicans* adhesion. **Gerodontology**, v. 33, n. 3, p. 380-385, 2016.

UENO, H. et al. Characterization of group B *Streptococcus* isolated from women in Saitama city, Japan. **Jpn J Infect Dis**, v.65, p.516–521, 2012.

VAN DYKE, M. K. et al. Evaluation of universal antenatal screening for group B *Streptococcus*. **N Engl J Med**, v. 360, n. 25, p. 2626-2636, 2009.

VASCONCELOS, K. R. F. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. **Rev Bras Farmacog**, v. 18, p. 733-738, 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - a comparative study. **J Ethnopharmacol**, v. 112, n. 2, p. 248-254, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero copaifera L. **Quím Nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.

- VERANI, J. R.; MCGEE, L.; SCHRAG, S. J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. **MMWR Recomm Rep**, v. 59, n. RR-10, p. 1-36, 2010.
- VERANI, J. R.; SCHRAG, S. J. Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges. **Clin Perinatol**, v. 37, n. 2, p. 375-392, 2010.
- WANG, P. et al. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* isolates circulating in Beijing, China. **PLoS one**, v. 10, n. 3, p. e0120035, 2015.
- WEISBLUM, B. Inducible resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin type B antibiotics: the resistance phenotype, its biological diversity, and structural elements that regulate expression--a review. **J Antimicrob Chemother**, v. 16, p. 63-90, 1985.
- WEISS, M. E.; ADKINSON, N. F. Immediate hypersensitivity reactions to penicillin and related antibiotics. *Clin Allergy*, v. 18, n. 6, p. 515-540, 1988.
- WOOD, E. G.; DILLON, H. C., JR. A prospective study of group B streptococcal bacteriuria in pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 140, n. 5, p. 515-520, 1981.
- ZENG, X.; KONG, F.; WANG, H.; DARBAR, A.; GILBERT, G. L.. Simultaneous detection of nine antibiotic resistance-related genes in *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization assay. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 204-209, 2006.
- ZOYSA, A. et al. Non-culture detection of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B *Streptococcus*) in clinical samples by real-time PCR. **J Med Microb**, v. 61, p. 1086-1090, 2012.

## 5. ARTIGO 1

OTAGUIRI, E. S. et al. Simultaneous detection of *Streptococcus agalactiae* and genes encoding resistance to macrolides and lincosamides by multiplex real-time PCR in vaginal-rectal swab specimens. Submetido para **BMC Pregnancy and Childbirth**.

**Title: Simultaneous detection of *Streptococcus agalactiae* and genes encoding resistance to macrolides and lincosamides by multiplex real-time PCR in vaginal-rectal swab specimens**

Eliane Saori Otaguiri<sup>1</sup>, Ana Elisa Belotto Morguette<sup>1</sup>, Alexandre Tadachi Morey<sup>1</sup>, Eliandro Reis Tavares<sup>1</sup>, Gilselena Kerbauy<sup>2</sup>, Rosangela S.L. de Almeida Torres<sup>3</sup>; Maurício Chaves Junior<sup>4</sup>; Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>5</sup>; Viviane Monteiro Goes<sup>6</sup>; Marco Aurélio Krieger<sup>6</sup>; Marcia Regina Eches Perugini<sup>7</sup>, Lucy Megumi Yamauchi<sup>1</sup>, Sueli Fumie Yamada-Ogatta<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. <sup>2</sup>Departamento de Enfermagem, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. <sup>3</sup>Laboratory of Bacteriology, Epidemiology Laboratory and Disease Control Division, Laboratório Central do Estado do Paraná – LACEN - PR. <sup>4</sup>Departamento de Medicina, Hospital Universitário de Maringá, Universidade Estadual de Maringá. <sup>5</sup> Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá. <sup>6</sup> Instituto Carlos Chagas, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Curitiba, Brazil. <sup>7</sup> Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

\*Corresponding author:

Sueli Fumie Yamada-Ogatta, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380. CEP 86057-970.

Tel: +55-43-3371-5503; fax: +55-43-3371-4788. e-mail: [ogatta@uel.br](mailto:ogatta@uel.br)

**Abstract**

**Background:** *Streptococcus agalactiae* or Group B *Streptococcus* (GBS) remains the leading cause of infections in newborns worldwide. Prenatal GBS screening of pregnant women for vaginal-rectal colonization is recommended in many countries to manage appropriate intrapartum antimicrobial prophylaxis for those identified as carriers. In this study, a novel melting-curve based multiplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of GBS and macrolide and lincosamide resistance markers in a vaginal-rectal swab was developed for rapid and accurate prenatal GBS screening.

**Methods:** One hundred two pregnant women who were at 35-37 weeks of gestation were enrolled in this study. The analytical performance of the multiplex real-time PCR was first tested using a panel of reference and clinical bacterial and fungal strains. To test the clinical performance, vaginal-rectal swabs were obtained from pregnant women who were seen at the teaching hospital for regular prenatal care. The results of multiplex real-time were compared with those obtained from microbiological analyses.

**Results:** The multiplex real-time PCR assay showed 100% specificity and a limit of detection of  $10^4$  colony forming units equivalent per reaction. The prevalence of GBS colonization among the population studied was 15.7% (16/102) based on a positive culture and the real-time multiplex PCR results. Agreement between the two assays was found for 11 (68.75%) GBS colonized women. Using the culture-based results as a reference, the multiplex real-time PCR had a sensitivity of 91.7% (11/12, CI 59.7-99.6%), a specificity of 95.5% (86/90, CI 89.8-98.7%), a positive predictive value of 73.3% (11/15, CI 44.8-91.1%) and a negative predictive value of 98.9% (86/87, CI 92.9-99.9%).

**Conclusion:** The multiplex real-time PCR is a rapid, affordable and sensitive assay suitable for direct detection of GBS and its erythromycin/clindamycin resistance markers in vaginal-rectal swabs.

**Keywords:** *cfb* gene, *erm* and *mef* antimicrobial resistance markers, Group B *Streptococcus*, melting curve, pregnant women; vaginal-rectal swab

## Background

*Streptococcus agalactiae* or Group B *Streptococcus* (GBS) is a leading cause of infections in newborns worldwide [1,2]. Neonatal GBS diseases are associated with significant morbidity and mortality, and infants who survive may incur long-term disabilities [3,4]. GBS can asymptotically colonize the human gastrointestinal and/or genital tract [5-7]. During pregnancy, this colonization represents the most important risk factor for the development of invasive GBS diseases, most of which affect babies within the first week of life [8]. Maternal GBS transmission to the newborn may occur vertically by ascending infection or during passage through the birth canal [9].

Women can be transiently, intermittently or persistently colonized by GBS in their vaginal or anorectal mucosae [6]. Accordingly, the risk of maternal GBS transmission to the newborn and development of infection persists. The prevention strategy based on bacterium screening and intrapartum antimicrobial prophylaxis (IAP) in those pregnant women identified as carriers has led to a substantial reduction in the incidence of neonatal GBS diseases in various regions of the world [10]. Currently penicillin is recommended as first-line antibacterial for IAP, and clindamycin or erythromycin (second line) may be used in penicillin-allergic pregnant

women at risk of anaphylaxis [8]. In general, GBS isolates remain susceptible to penicillin [5,11] however isolates with reduced susceptibility to this antibacterial have been reported [12]. In contrast, resistance to clindamycin and erythromycin among GBS isolated from pregnant women is increasing in different regions of the world [5,11,13,14]. The most common antimicrobial resistance mechanisms are post-transcriptional methylation of adenine residues present in 23S rRNA, which is mediated by *erm* class gene-encoded methylases [15], and efflux of the antibiotic mediated by a membrane-bound protein encoded by *mef* genes [16]. The expression of *erm* genes usually results in cross-resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin B, the MLS<sub>B</sub> phenotype [17]. On the other hand, resistance encoded by *mef* genes (phenotype M) confers resistance only to 14- and 15-membered ring macrolides (erythromycin and azithromycin) [18].

Standard culture-based methods for GBS detection involve the inoculation of a vaginal-rectal swab specimen into selective enrichment broth medium. Following enrichment, the specimen was subcultured on blood agar plates or alternatively on chromogenic Granada agar for visual detection of beta-hemolytic or orange carotenoid pigment-producing colonies, respectively. The identification of presumptive GBS colonies is performed by phenotypic methods. Moreover, it is also recommended that GBS isolated from penicillin-allergic pregnant women at risk of anaphylaxis should be screened for antimicrobial susceptibility pattern [8]. Corroborating this, a study of Desai and colleagues [19] reported that 8.8% of GBS-positive pregnant women also had a penicillin allergy at delivery.

In general, these procedures may require up to 72 h for results, which does not impact pregnant women undergoing routine prenatal care. However, many cases of GBS diseases have been reported in newborns from mothers with negative

prenatal bacterial screen. These false-negative results may be due to limitations of the current culture methods that cannot promptly detect either non-hemolytic nor non-pigment producing isolates [20]. In addition, a small proportion of pregnant women may become colonized with GBS in the period following prenatal screening and the onset of labor [21]. Another concern associated with culture-based strategies is the unavailability of results for pregnant women in premature labor or who have not had prenatal care [22].

There is a need for a rapid and sensitive test for detecting GBS-colonized pregnant women at the time of delivery, and determining GBS antibacterial resistance to manage appropriate IAP. The aim of this study was to develop a melting curve-based multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for simultaneous detection of GBS and macrolide and lincosamide resistance markers in vaginal-rectal swab specimens. The assay targets the *cfb* gene used for specific identification of GBS and *erm* and *mef* genes. The *cfb* gene encodes an extracellular pore-forming protein [23] known as CAMP (acronym for Christie, Atkins and Munch-Peterson) factor [24], which has been widely used for phenotypic identification of GBS isolates [25]. Furthermore, most nucleic acid amplification tests (including commercially available ones) target *cfb* gene for detection of GBS vaginal-rectal colonization [26]. The results of the multiplex real-time PCR assay were compared with those obtained with culture-based analyses.

## **Material and methods**

### **2.1 Microbial strains**

A panel of 37 microbial species (27 bacteria and 10 fungi, Table 1) was used to develop the assays. These included various streptococcal and closed-related

species and other microbial components of the intestinal and genital microbiota. Reference strains were kindly donated by Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) and Laboratório Central do Paraná (LACEN, Paraná, Brazil). LMC and HU strains were obtained from the bacterial collection of the Laboratório de Microbiologia Clínica of the Universidade Estadual de Londrina (UEL); LBBA strains were obtained from the Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada of UEL. Bacterial and fungal species were cultivated at 37°C for 24 h in tryptic soy broth (TSB, Oxoid) and Sabouraud dextrose broth (SDB, Himedia), respectively. Bacteria and fungi were kept at -20°C in TSB containing 20% glycerol and 5% sheep blood and SDB containing 20% glycerol, respectively.

## 2.2 DNA isolation from in vitro cultured microbial species

The Genra Puregene Blood kit (Qiagen, Brazil) was used for DNA isolation, according to manufacturer's recommendations. All clinical and reference strains (Table 1) were cultivated in specific broth medium at 37°C for 24 h. Microbial cultures were centrifuged at 10,000 x g for 5 min, and the pellets were washed twice with sterile 0.15 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2 before DNA extraction.

**Table 1.** Panel of microorganisms used to evaluate the multiplex real-time PCR specificity and sensitivity

Species	Source	Species	Source
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Streptococcus agalactiae</i>	LMC UEL 15	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
<i>Streptococcus agalactiae</i>	LMC UEL 65	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
<i>Streptococcus agalactiae</i>	LMC UEL 66	<i>Proteus mirabilis</i>	HU-UEL
<i>Streptococcus agalactiae</i> serotype Ia	LMC UEL 43	<i>Providencia stuartii</i>	HU-UEL
<i>Streptococcus agalactiae</i> serotype II	LMC UEL 92	<i>Salmonella</i> sp.	HU-UEL

<i>Streptococcus agalactiae</i> serotype III	LMC UEL 59	<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 13313
<i>Streptococcus agalactiae</i> serotype V	LMC UEL 73	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Streptococcus agalactiae</i> serotype IX	LMC UEL 11	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 6569
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> group G.	LACEN 6196	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> group C	LACEN 53157	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LBBA-UEL
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 49456	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	LBBA-UEL 22
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>	LBBA-UEL 22-1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LBBA-UEL 704
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	<i>Candida albicans</i>	ATCC 26790
<i>Streptococcus sanguis</i>	ATCC10557	<i>Candida bracarensis</i>	LMC UEL1217
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	<i>Candida dubliniensis</i>	LMC UEL 947C
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	<i>Candida glabrata</i>	LMC UEL 51B
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ATCC 29668	<i>Candida metapsilosis</i>	LMC UEL 2263
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	HU-UEL	<i>Candida orthopsilosis</i>	LMC UEL 2259
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 23857	<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
<i>Aeromonas</i> sp.	HU-UEL	<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 28707
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	<i>Cryptococcus gattii</i>	ATCC 56990
<i>Citrobacter freundii</i>	HU-UEL	<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 66031

ATCC: American Type Culture Collection; LMC: Laboratório de Microbiologia Clínica; UEL: Universidade Estadual de Londrina; LACEN: Laboratório Central do Estado do Paraná; HU:- Hospital Universitário de Londrina; LBBA: Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada

### 2.3 Oligonucleotide primers and PCR design

The nucleotide sequences of *cfb* encoding genes from *S. agalactiae* deposited in the GenBank/EMBL databases were analyzed using the *BioEdit v.7.2.0* software. Specific primers were designed using a consensus sequence and the OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com>) tool. Primers for genes [*erm(A)* subclass of *erm(TR)*], *erm(B)* and *mef(A/E)* encoding erythromycin and clindamycin resistance were as described previously [5]. Primers targeting the human ribonuclease P (*RNAseP*) encoding gene were included as an internal amplification control [27]. The primer sequences and expected size of amplicons are shown in Table 2. All primers were

used in conventional PCR in a final volume of 25  $\mu\text{L}$  containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 5 mM KCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$  of each dNTP, 10  $\mu\text{mol}$  of each forward and reverse primer, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), and 2  $\mu\text{L}$  of genomic DNA. The amplification reactions were performed in a Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems) with an initial denaturation at 95°C for 1 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, annealing at 67°C for 1 min and an extension step at 72°C for 45 s. Negative template control (NTC) reactions without any template DNA were carried out simultaneously. Amplicons were analyzed by 3% agarose gel electrophoresis after DNA staining with 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ethidium bromide. The identity of the amplicons was confirmed after determination of the nucleotide sequences with a 3730 xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) using the Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit. Search for homologies in the GenBank/EMBL databases was carried out with the Blast algorithm.

#### **2.4 Multiplex Real-time PCR assay**

All PCRs were performed on a Rotor-Gene Q 5-Plex (Qiagen, Germany), and the assay conditions were optimized for various parameters, including concentration of each primer set, annealing temperature and number of PCR cycles (data not shown). The optimized assay was performed in two separate tubes each containing a final volume of 25  $\mu\text{L}$ : a) 2x High-Resolution Melt (HRM) PCR Master Mix (Qiagen, Brazil), 10  $\mu\text{mol}$  of forward and reverse *erm*(B) and *cfb* primer sets, and 20  $\mu\text{mol}$  of forward and reverse *mef*(A/E) primers; b) 2x HRM PCR Master Mix and 10  $\mu\text{mol}$  of forward and reverse *erm*(A) and human *RNaseP* primers. For both reaction mixtures, 6  $\mu\text{L}$  of template DNA were added and the final volume was adjusted with deionized water. The cycling conditions included an initial denaturation step at 95°C

for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 10 s, annealing at 67°C for 30 s and an extension step at 72°C for 20 s. Melting curves were acquired using 0.05°C steps with a hold of 60 s at each step from 75 to 85°C. NTC reactions were carried out simultaneously. Data were analyzed using Rotor Gene software version.

**Table 2.** Oligonucleotide primers of melting curve-based multiplex real-time PCR

Target <sup>a</sup>	Nucleotide sequence (5' to 3') <sup>b</sup>	Amplicon size (bp)	Reference
<i>cfb</i>	F: CACACATGCTGTTGGAGTTCAGTTGA R: ACGAAGTCGACAGCATCACACGAAA	138	This study
<i>erm(A)/(TR)</i>	F: CCGGCAAGGAGAAGGTTATAATGA R: GCATTCACCCGTTGACTCATTTC	190	Otaguiri et al. [5]
<i>erm(B)</i>	F: GCTCTTGACACTCAAGTCTCGAT R: ACATCTGTGGTATGGCGGGTAAGT	117	Otaguiri et al. [5]
<i>mef(A/E)</i>	F: GCGATGGTCTTGTCTATGGCTTCA R: AGCTGTTCCAATGCTACGGAT	225	Otaguiri et al. [5]
<i>RNaseP</i>	F: AGATTTGGACCTGCGAGCG R: GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	64	WHO [27]

<sup>a</sup>*cfb* gene encodes the CAMP factor; *erm* genes encode 23S rRNA methylases; and *mef* gene encodes efflux pumps. <sup>b</sup>The nucleotide sequences of *Streptococcus agalactiae* genes deposited in the GenBank/EMBL databases were used for specific primer design.

### 2.5 Analytical specificity and sensitivity

Multiplex real-time PCR specificity was analyzed using 100 ng genomic DNA obtained from cultures of a panel of bacteria and fungi (Table 1). All amplification reactions were performed in duplicate in three independent experiments. *In silico* analysis was also carried out to determine the specificity of the *cfb* amplification reactions. Primer sequences targeting the *cfb* gene were compared with nucleotide sequences available in GenBank databases of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the Blast algorithm (*blastn*).

Multiplex real-time PCR sensitivity was determined empirically using macrolide and lincosamide resistant GBS strains (LMC UEL 15 *cfb*<sup>+</sup>, *mef(A/E)*<sup>+</sup>; LMC UEL 65 *cfb*<sup>+</sup>, *erm(A)*<sup>+</sup>; LMC UEL 66 *cfb*<sup>+</sup>, *erm(B)*<sup>+</sup>), according to published recommendations [28]. Three colonies forming unit (CFU) of each GBS strains were cultivated in TSB at 37 °C for 24 h. The bacterial cells were harvested by centrifugation (10,000 x *g* for 5 min), washed twice with sterile PBS and the cell density was adjusted to 9.0 x 10<sup>8</sup> (3.0 McFarland standard) using the DensiCHECK™ PLUS colorimeter (bioMérieux, Brazil) in 1.0 mL of the same buffer. DNA extraction was performed as above. Each strain was processed in duplicate on five consecutive days. Tenfold serial dilutions were prepared and 6 μL of DNA template of each dilution were included in amplification reactions. For each primer pair, a standard curve was generated from the Ct values as a function of log CFU and R<sup>2</sup> was calculated to evaluate the efficiency of the reaction. The slope of this line was used to determine the efficiency (E) according to the equation:  $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ .

## ***2.6 Performance of the multiplex real-time PCR assay in clinical samples in comparison to culture based analysis***

The performance of real-time PCR in clinical samples was compared with the results obtained from microbiological analyses. A total of 102 pregnant women seen at the Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brazil from June to December 2015, and October 2017 were enrolled in this study. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina (Document 193/12-CEP/UEL). Written informed consent was obtained from the women to participate in this study, agreeing with the publication of this report and any accompanying images. Two vaginal-rectal swabs of each woman were collected.

Sampling was performed on the lower third of the vagina followed by the rectum using the COPAN Transystem Stuart collection device (COPAN Diagnostic, Italy).

One swab specimen was inoculated into a Granada Biphasic broth (BioMérieux, Brazil) and incubated at 37°C for 24 h. After incubation, the sample was subcultured on Columbia blood agar base (Oxoid, Brazil) containing 5% sheep blood (Newprov, Brazil) at 37°C for 24 h. Suggestive colonies of GBS were subjected to standard phenotypic identification based on colony morphology, Gram staining, catalase and CAMP tests. Concomitantly, tests for growth in 6.5% NaCl, bile-esculin reaction, sodium hippurate hydrolysis, and susceptibility to bacitracin and sulfamethoxazole *plus* trimethoprim were also performed. Bacteria were kept at -20°C in TSB containing 20% glycerol and 5% sheep blood. The second swab was vortexed for 2 min in 1 mL of deionized sterile water, the suspension was centrifuged and the pellet was used for DNA extraction as described above. DNA was stored at -20°C until use.

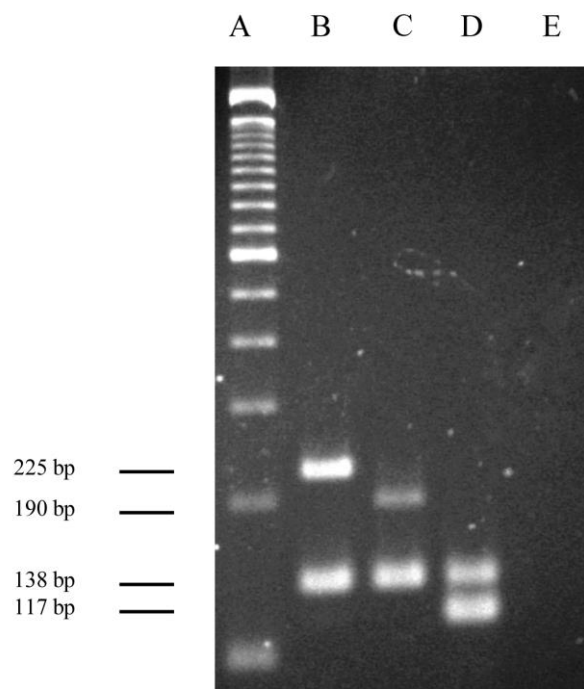
GBS isolates were tested for penicillin, clindamycin and erythromycin susceptibility using the disk-diffusion method according to the recommendations of the Clinical Laboratory Standards Institute [29]. The phenotypes of erythromycin- and clindamycin-resistant GBSs were determined by the double-disk diffusion method as described by Seppala et al. [30].

## Results

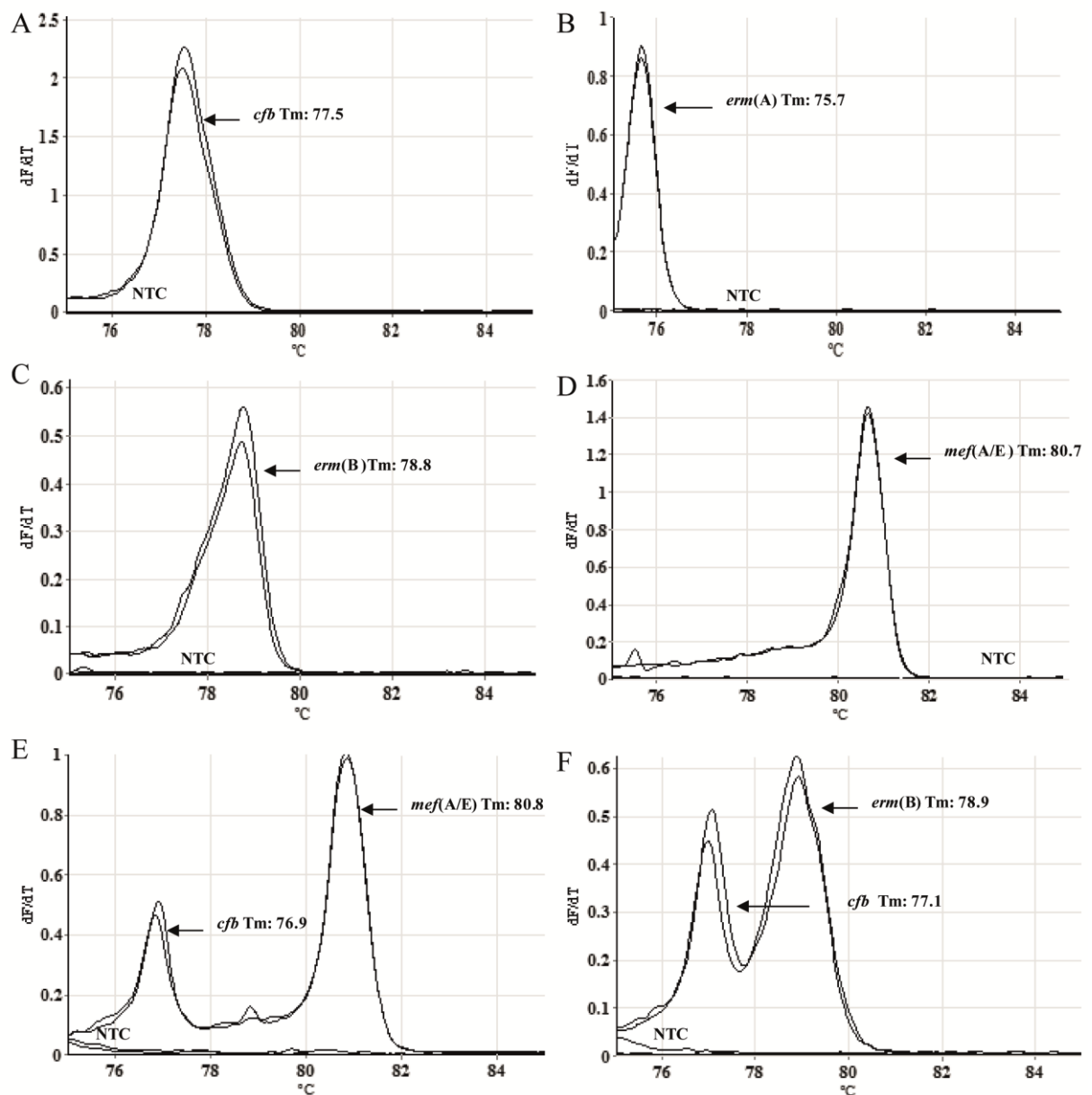
### 3.1 Assay design

In this study, a multiplex-PCR assay using real-time and melting curves was standardized for simultaneous detection of the genes *cfb*, *erm(A)*, *erm(B)*, and *mef(A/B)*. The conditions of amplification for simultaneous detection of these genes were first standardized in conventional monoplex PCR using genomic DNA of GBS strains. All specific primer pairs generated amplicons with the expected size shown in Table 2 using an annealing temperature of 67°C. The identity of each amplicon was further confirmed by sequencing and searching for nucleotide sequence homology in the GenBank/EMBL databases. After determining the optimal conditions for amplification, all primer pairs were combined in a conventional multiplex-PCR format and the results are shown in Figure 1. For establishment of melting-curve based multiplex real-time PCR, equivalent melting temperatures ( $T_m$ ) of each primer pair were initially detected in a monoplex real-time PCR assay. All primer pairs successfully amplified the corresponding genes generating a dissociation curve with a single peak, and the  $T_m$  values of all amplicons were as follows:  $76.7 \pm 0.4^\circ\text{C}$  for *cfb*,  $75.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  for *erm(A)*,  $78.8 \pm 0.7^\circ\text{C}$  for *erm(B)*,  $80.65 \pm 0.55^\circ\text{C}$  for *mef(A/E)* (Figure 2). To evaluate potential PCR interfering substances, oligonucleotide primers target the human *RNase P* gene, serving as an internal control for the nucleic acid extraction and amplification [27] were included in this study and a  $T_m$  value of  $82.8 \pm 0.55^\circ\text{C}$  (Additional file 1) was detected. RNase P is an RNA processing endonuclease that specifically cleaves precursors of tRNA, releasing 5' precursor sequences and mature tRNAs. RNase P is involved in processing all species of tRNA and is present in all cells and organelles that carry out tRNA synthesis [31]. RNaseP amplification signal was detected in all reactions, indicating no PCR inhibitors. NTC

amplification signals were not detected in any specific PCR. According to these data, the multiplex real-time PCR assay was performed with two tubes in one reaction. One tube corresponded to the targets *cfb*, *erm(B)* and *mef(A/E)* genes and the other to the target *erm(A)* and *RNaseP* genes.



**Figure 1.** Multiplex PCR assay for simultaneous detection of erythromycin and clindamycin resistance-encoding genes in conventional PCR. (A) 100-bp molecular size ladder; (B) LMC UEL 15 [*mef(A/E)* and *cfb*]; (C) LMC UEL 65 [*erm(A)* and *cfb*]; (D) LMC UEL 66 [*erm(B)* and *cfb*]; (E) negative template control.

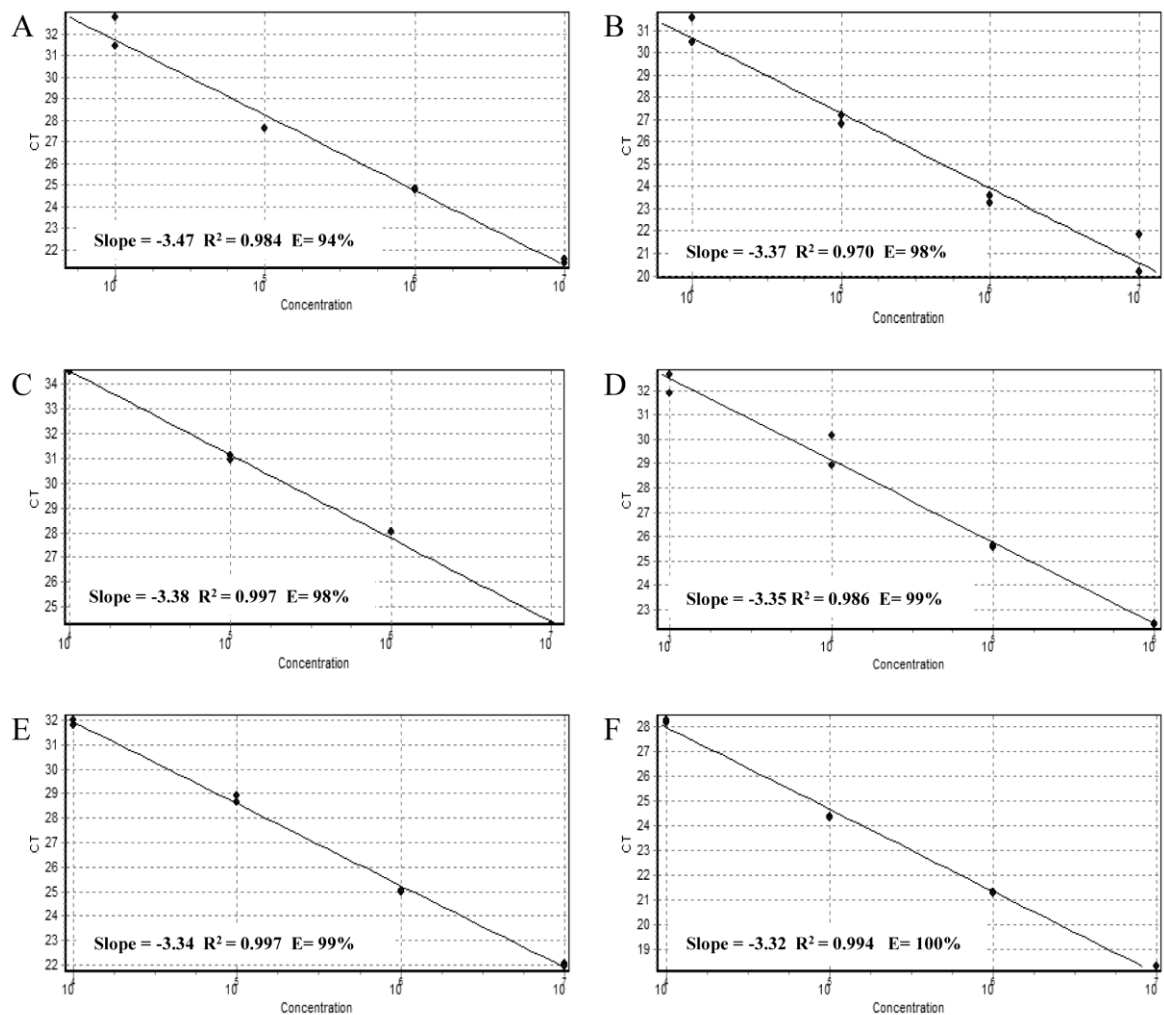


**Figure 2.** Melting curve analysis showing the melting temperature peaks ( $T_m$ ) of *Streptococcus agalactiae* with macrolide and lincosamide resistance genes and negative template controls (NTC). (A) LMC UEL 65 (*cfb*); (B) LMC UEL 65 [*erm(A)*]; (C) LMC UEL 66 [*erm(B)*]; (D) LMC UEL 15 [*mef(A/E)*]; (E) LMC UEL 15 [*cfb* and *mef(A/E)*]; (F) LMC UEL 66 [*cfb* and *erm(B)*].

### 3.2 Analytical performance

The specificity of multiplex real-time PCR was determined using genomic DNA from a panel of bacteria and fungi (Table 1), and amplification signals were detected for all

GBS strains, including five different capsular serotypes. No cross-reactivity was observed between non-GBS strains. Primer specificity for the *cfb* gene was also evaluated *in silico* using the GenBank/EMBL database of the NCBI homepage, and no matches were found other than those with the corresponding gene of GBS.



**Figure 3.** Sensitivity of multiplex real-time PCR assays. (A) LMC UEL 65 (*cfb*); (B) LMC UEL 65 [*erm(A)*]; (C) LMC UEL 66 [*erm(B)*]; (D) LMC UEL 15 [*mef(A/E)*]; (E) LMC UEL 15 [*cfb* and *mef(A/E)*]; (F) LMC UEL 66 [*cfb* and *erm(B)*]. Amplification plot of 10-fold serial dilution corresponding to  $10^4$ – $10^7$  CFU; standard curve represented by linear regression line for threshold cycle (Ct) versus sample log concentration. Slope, regression coefficient and efficiency of the real-time PCR method are noted (A-F).

The linearity and limits of detection (LOD) of the multiplex real-time PCR for the target DNAs were determined with tenfold serial dilutions (at a cell density of  $10^7$  to 10 CFU equivalents per reaction) of each genomic DNA from macrolide- and lincosamide-resistant GBS strains. Each concentration was analyzed in 6 replicates on five different days ( $n=30$ ). The LOD of the multiplex real-time PCR for the target DNAs was  $10^4$  CFU equivalents per reaction, and the reaction efficiencies calculated from the slope of the standard curve were within the range of 94 to 100% (Figure 3).

### **3.3 Evaluation of real-time multiplex PCR in clinical samples**

Performance of the multiplex real-time PCR assay was analyzed in vaginal-rectal swabs obtained from 102 pregnant women, and the results were compared to the standard culture-based method for GBS detection. The prevalence of GBS colonization among the population studied was 15.7% (16/102) based on a positive culture and the multiplex real-time PCR results. Agreement between the two assays was found for 11 (68.75%) GBS-colonized women. Four samples (25%) were positive by multiplex real-time PCR and negative by the culture method, and one (6.25%) was negative by multiplex real-time PCR and positive by the culture method.

Using the culture-based results as a reference, the multiplex real-time PCR had a sensitivity of 91.7% (11/12, CI 59.7-99.5%), a specificity of 95.5% (86/90, CI 88.4-98.6%), a positive predictive value of 73.3% (11/15, CI 44.8-91.1%) and a negative predictive value of 98.9% (86/87, CI 92.9-99.9%) (Table 3).

**Table 3.** Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV)

Multiplex real-time PCR	Culture <sup>a</sup>		Total
	Positive	Negative	
Positive	11	4	15
Negative	1	86	87
Total	12	90	102
Sensitivity (95% CI) <sup>b</sup>			91.7% (59.7 – 99.5%)
Specificity (95% CI) <sup>b</sup>			95.5% (88.4 – 98.6%)
PPV (95% CI) <sup>b</sup>			73.3% (44.8 - 91.1%)
NPV (95% CI) <sup>b</sup>			98.9% (92.9 – 99.9%)

<sup>a</sup>Standard routine culture of vaginal-rectal swab specimen collected from pregnant women at 35-37 weeks of gestation; <sup>b</sup>Values calculated with 95% confidence interval (CI) using the program available at <http://faculty.vassar.edu/lowry/clin1.html>.

All GBS isolates were susceptible to penicillin according to the disk-diffusion method. Regarding the erythromycin and clindamycin susceptibility profile, of the 11 GBS-positive isolates by the culture method, 10 were susceptible and one was resistant to both antibacterials according to the phenotypic methods. Of the four vaginal-rectal swabs testing positive for GBS by multiplex real-time PCR, one was negative for antimicrobial resistance markers, two tested positive for *erm*(B) and *mef*(A/E) genes, and the other tested positive for *mef*(A/E) genes.

For the comparison analysis, the GBS-colonized pregnant women whose *cfb* gene was not detected by multiplex real-time PCR or tested negative in culture approaches were excluded from the comparative analysis. The phenotypic results were in accordance with those obtained in real-time multiplex PCR for nine GBS-colonized pregnant women. No antimicrobial resistance marker was detected in seven susceptible isolates. One erythromycin/clindamycin-resistant isolate displayed

the constitutive macrolide-lincosamide-streptogramin B (cMLS<sub>B</sub>) phenotype, and carried the *erm(A)* and *erm(B)* genes. Whereas, one erythromycin-resistant isolate carried the *mef(A/E)* gene. In the discordant results, two pregnant women colonized with erythromycin/clindamycin susceptible isolates, one tested positive for *erm(A)* and *mef(A/E)* and the other for *erm(B)* genes by the multiplex real-time PCR assay (Table 4).

All GBS isolates were subjected to re-examination using genomic DNA extracted from axenic cultures and there was no difference between the concordant results. For the above mentioned two discrepant results, the *erm(A)*, *erm(B)* and *mef(A/E)* genes were not detected by multiplex real-time PCR, confirming the phenotypic results, and indicating the presence of other bacteria carrying the detected genes in the vaginal-rectal swab sample.

**Table 4.** Data from phenotypic characterization and multiplex real-time PCR of *Streptococcus agalactiae*

Isolates	Susceptibility phenotype		Real-time multiplex PCR			
	E <sup>a</sup>	DA <sup>b</sup>	<i>cfb</i> <sup>c</sup>	<i>erm(A)</i> <sup>c</sup>	<i>erm(B)</i> <sup>c</sup>	<i>mef(A/E)</i> <sup>c</sup>
LMC UEL 5	S	S	+	-	-	-
LMC UEL 21	S	S	+	-	-	-
LMC UEL 23	S	S	+	-	+	-
LMC UEL 27	S	S	+	-	-	-
LMC UEL 30	S	S	+	-	-	-
LMC UEL 34	S	S	+	-	-	-
LMC UEL 43	S	S	+	-	-	-
LMC UEL 43A	R	R	+	+	+	-
LMC UEL 57	S	S	+	+	-	+
LMC UEL 60	S	S	+	-	-	-
LMC UEL 68	S	S	-	-	-	-

LMC UEL 103	R	S	+	-	-	+
LMC UEL 28	CN	CN	+	-	-	-
LMC UEL 63	CN	CN	+	-	+	+
LMC UEL 95	CN	CN	+	-	-	+
LMC UEL 99	CN	CN	+	-	+	+

<sup>a</sup>E (erythromycin) and <sup>b</sup>DA (clindamycin) resistance phenotypes were determined by the double-disk diffusion method [29]. (S) Susceptible; (R) Resistant; (CN) Culture-Negative. <sup>c</sup>Target genes detected in vaginal-rectal swab specimens by multiplex real-time PCR. (+) Presence; (-) Absence.

## Discussion

Real-time PCR is one of the rapid and feasible methods for maternal intrapartum GBS screening [32]. In this study, a sensitive melting curve-based multiplex real-time PCR was designed and evaluated for simultaneous detection of GBS and the most prevalent macrolide and lincosamide resistance markers. Analytical and experimental data showed that the oligonucleotide primers designed to target the GBS *cfb* gene did not cross-react with another nucleotide sequence of different microbial species. In fact, several real-time PCR-based assays have been developed in the last decades for GBS detection in vaginal-rectal swab from pregnant women [33]. Most of these studies target the *cfb* gene for specific detection of GBS [8,33-35]. However, the following genes were also used as targets for GBS detection by real-time PCR assays: those of the operon *dlt* [33,36], which catalyze the incorporation of D-alanine residues into GBS cell wall lipoteichoic acids [37]; *cyB* [38], which encodes a transmembrane protein of ABC transporter required for the production of GBS hemolysin [39]; *ssrA* [40], encoding tmRNA involved in the degradation of truncated proteins [41]; and *sip* [42], encoding a surface immunogenic protein [43].

In general, nucleic acid amplification tests (NAAT) have been proven highly specific and with higher sensitive (reported sensitivity range of 86 to 100%) for detection of GBS vaginal-rectal colonization compared to the conventional culture-based test [8,44]. This difference can be due to the presence of both non-viable cells or GBS antagonistic microorganisms [45]. Although a number of commercial kits are available, their utilization has not yet been universally implemented in hospitals, primarily due to costs and inability to determine the antimicrobial susceptibility profile if a NAAT shows positive. Indeed, most of the real-time PCR assays previously described (including those commercially available ones) use a specific probe for the target gene, besides oligonucleotide primers, which increases the costs [31-36,40].

One limitation of this study was the number of vaginal-rectal swabs from pregnant women analyzed. More samples may provide better estimates with less uncertainty [28]. Despite this limitation, the clinical sensitivity and specificity of the multiplex real-time PCR assay were determined to be 91.7 and 95.1%, respectively, which was comparable to the results of previously reported studies based on probe approaches [44]. In this study, labor costs (the equipment and personal were not included) for sample collection and processing of multiplex real-time PCR were estimated at US\$3.47, compared with culture screening estimated cost of US\$4.95 *per* swab. Furthermore, the assay provided a short turnaround time as full test, including DNA extraction, sample preparation and multiplex real-time PCR analysis, which can be performed in about 4 h. Another limitation of this study is that the time between vaginal-rectal swab collection and delivery was not analyzed and it was not possible to evaluate whether the result could be available in time for IAP. However, this assay provides reliable and faster results than culture that will help make

appropriate decisions about the administration of antibiotics for neonates of women with unknown GBS colonization *status*.

One GBS-colonized pregnant woman was falsely identified as a non-GBS carrier by multiplex real-time PCR. In this case, the presence of PCR inhibitors was discarded since the amplification signal of the RNaseP internal control was detected in the reaction (Additional file Figure A1). Thus, this result could be explained by the low bacterial load on the swab, which was below the LOD of the assay. Similarly, other real-time PCR-based assays for GBS detection have shown discrepant results when compared to culture-based approach [46], including those marketed tests [35].

The IAP for prevention of GBS neonatal infections has raised worries about the selection of antimicrobial resistant and/or potentially more virulent microorganisms for newborns [10]. Since the *erm* genes are located mainly on mobile genetic elements such as plasmids and conjugative transposons [47], selective pressure imposed by the antimicrobials may trigger horizontal DNA transfer between microbiota members, contributing to the spread of resistance. Thus, besides reliable GBS detection, the determination of its antimicrobial susceptibilities is important to implement effective IAP for all GBS-colonized pregnant women, thereby preventing inappropriate use of antimicrobials.

No available commercial kits have this feature [26] and only the study of Dela Cruz and colleagues [34] reported an assay for simultaneous detection of GBS and antimicrobial resistance markers. These authors developed a probe-based real-time multiplex PCR for detection of *cfb*, *erm*(TR), *erm*(B) and *mef*(A/E) genes in genomic DNA extracted from GBS cultures isolated from vaginal-rectal swabs. However, the authors did not evaluate the clinical performance of the assays. In this study, a good agreement was observed between microbiological results and multiplex real-time

PCR for erythromycin and clindamycin resistance markers. Two false-positive results were detected by multiplex real-time PCR regarding erythromycin and clindamycin resistance. In fact, other bacterial species colonizing the urogenital and intestinal tracts that are known to harbor *erm* and *mef* genes [48] can be detected in a molecular assay. These results lead to an unnecessary replacement of, but not stopping, the antimicrobial for GBS prophylaxis.

## Conclusion

The results presented here showed that the multiplex real-time PCR is a rapid, affordable and sensitive assay suitable for direct detection of GBS colonization and its erythromycin/clindamycin resistance markers. Accordingly, the present molecular assay has potential usefulness during the intrapartum period, mainly for women who did not have a prenatal screening result.

## REFERENCES

- [1] Seale AC, Koech AC, Sheppard AE, Barsosio HE, Langat J, Anyango E, et al. Maternal colonization with *Streptococcus agalactiae*, and associated stillbirth and neonatal disease in coastal Kenya. *Nat Microbiol*. 2016;1:1-10.
- [2] Cools P, Melin P. Group B *Streptococcus* and perinatal mortality. *Res Microbiol*. 2017. doi: 10.1016/j.resmic.2017.04.002.
- [3] Likitnukul S, Pokato S, Nunthapisud P. Group B streptococcal sepsis and meningitis complicated with severe sensorineural hearing loss in a fourteen-year-old boy. *Pediatr Infect Dis J*. 1996;15:468-470.
- [4] Tibussek D, Sinclair A, Yau I, Teatero S, Fittipaldi N, Richardson SE, et al. Late-onset group B streptococcal meningitis has cerebrovascular complications. *J. Pediatr*. 2015;166:1187-1192.
- [5] Otaguiri ES, Morguette AEB, 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;13:297.

- [6] Kwatra G, Cunnington MC, Merrall E, Adrian PV, Ip M, Klugman KP, et al. Prevalence of maternal colonisation with group B *Streptococcus*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(9):1076–1084.
- [7] Slotved HC, Dayie NTKD, Banini JAN, Frimodt-Moller N. Carriage and serotype distribution of *Streptococcus agalactiae* in third trimester pregnancy in southern Ghana. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2017;17:238.
- [8] Center for Disease Control and Prevention. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010;59:1-36.
- [9] Melin P. Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1294-1303.
- [10] Verani JR, Schrag SJ. Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges. *Clin Perinatol*. 2010;37:375-392.
- [11] Teatero S, Ferrieri P, Martin I, Demczuk W, McGeer A, Fittipaldi N. Serotype distribution, population structure, and antimicrobial resistance of group B *Streptococcus* strains recovered from colonized pregnant women. *J Clin Microbiol*. 2017;55:412-422.
- [12] Kimura K, Matsubara K, Yamamoto G, Shibayama K, Arakawa Y. Active screening of group B *streptococci* with reduced penicillin susceptibility and altered serotype distribution isolated from pregnant women in Kobe, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2013;66:158-160.
- [13] Bolukaoto JY, Monyama CM, Chukwu MO, Lekala SM, Nchabeleng M, Maloba MR, et al. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa. *BMC Res Notes*. 2015;8:364.
- [14] Barros RR, de Souza AF, Luiz FB. Polyclonal spread of *Streptococcus agalactiae* resistant to clindamycin among pregnant women in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71:2054-2056.
- [15] Weisblum B. Inducible resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin type B antibiotics: the resistance phenotype, its biological diversity, and structural elements that regulate expression-a review. *J Antimicrob Chemother*, 1985;16:63-90.
- [16] Luna VA, Coates P, Eady EA, Cove JH, Nguyen TT, Roberts MC. A variety of Gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J Antimicrob Chemother*. 1999;44:19-25.
- [17] Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis*. 2002;34:482-492.
- [18] Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath AV, et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol*. 1996;22:867-879.

- [19] Desai SH, Kaplan MS, Chen Q, Macy EM. Morbidity in pregnant women associated with unverified penicillin allergies, antibiotic use, and Group B *Streptococcus* infections. *Perm J*. 2017. doi: 10.7812/TPP/16-080.
- [20] Six A, Firon A, Plainvert C, Caplain C, Touak G, Dmytruk N, et al. Molecular Characterization of Nonhemolytic and Nonpigmented Group B *Streptococci* Responsible for Human Invasive Infections. *J Clin Microbiol*. 2016;54:75-82.
- [21] Tejada MB, Stan CM, Boulvain M, Renzi G, François P, Irion O, et al. Development of a rapid PCR assay for screening of maternal colonization by group B *Streptococcus* and neonatal invasive *Escherichia coli* during labor. *Gynecol Obstet Invest*. 2010;70:250-255.
- [22] Schrag SJ. The past and future of perinatal group B streptococcal disease prevention. *Clin Infect Dis*. 2004;39:1136-1138.
- [23] Lang S, Palmer M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. *J Biol Chem*. 2003;278:38167-38173.
- [24] Christie R, Atkins NE, Munch-Petersen E. A note on a lytic phenomenon shown by group B *streptococci*. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1944;22:197-200.
- [25] Phillips EA, Tapsall JW, Smith DD. Rapid tube CAMP test for identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B). *J Clin Microbiol*. 1980;12:135-137.
- [26] Emonet S, Schrenzel J, Tejada BM. Molecular-based screening for perinatal group B streptococcal infection: implications for prevention and therapy. *Mol Diagn Ther*. 2013;17:355-361.
- [27] World Health Organization (WHO). CDC protocol of real-time RTPCR for swine influenza A (H1N1). 2009.  
[http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimerTPCRprotocol\\_2009042](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimerTPCRprotocol_2009042)
- [28] Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS Genetics*. 2010;6:e1001233.
- [29] Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth informational supplement. Document M100-S22. Wayne, PA. 2012.
- [30] Seppala H, Nissinen A, Yu Q, Huovinen P. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J Antimicrob Chemother*. 1993;32:885-891.
- [31] Altman S. The road to RNase P. *Nat Struct Biol*. 2000;7:827-828.
- [32] Honest H, Sharma S, Khan KS. Rapid tests for group B *Streptococcus* colonization in laboring women: a systematic review. *Pediatrics*. 2006;117:1055-1066.

- [33] Morozumi M, Chiba N, Igarashi Y, Mitsuhashi N, Wajima T, Iwata S, et al. Direct identification of *Streptococcus agalactiae* and capsular type by real-time PCR in vaginal swabs from pregnant women. *J Infect Chemother*. 2015;21:34-38.
- [34] Dela Cruz WP, Richardson JY, Broestler JM, Thornton JA, Danaher PJ. Rapid determination of macrolide and lincosamide resistance in group B *Streptococcus* isolated from vaginal-rectal swabs. *Infect Dis in Obstet Gynecol*. 2007;46581.
- [35] Jost C, Bercot B, Jacquier H, Raskine L, Barranger E, Mouchnino G, et al. Xpert GBS assay for rapid detection of group B *Streptococcus* in gastric fluid samples from newborns. *J Clin Microbiol*. 2014;52:657-659.
- [36] Furfaro LL, Chang BJ, Payne MS. A novel one-step real-time multiplex PCR assay to detect *Streptococcus agalactiae* presence and serotypes Ia, Ib, and III. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;89:7-12.
- [37] Poyart C, Lamy MC, Boumaila C, Fiedler F, Trieu-Cuot P. Regulation of D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* involves a novel two-component regulatory system. *J Bacteriol*. 2001;183:6324-6334.
- [38] Winkler DS, Rocha A, Fabião CD, De Marco M, Proto-Siqueira R. Highly Sensitive and Efficient Screening of *Streptococcus agalactiae* Through Improved Real-Time PCR Protocols and Optimized Analytical Parameters. *Clin Lab*. 2015;61:1581-1584.
- [39] Spellerberg B, Pohl B, Haase G, Martin S, Weber-Heynemann J, Lütticken R. Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of *Streptococcus agalactiae* by ISS1 transposition. *J Bacteriol*. 1999;181:3212-3219.
- [40] Wernecke M, Mullen C, Sharma V, Morrison J, Barry T, Maher M, et al. Evaluation of a novel real-time PCR test based on the *ssrA* gene for the identification of group B *streptococci* in vaginal swabs. *BMC Infect Dis*. 2009;4:148.
- [41] Keiler KC, Waller PR, Sauer RT. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science*. 1996;271:990-993.
- [42] Bergseng H, Bevanger L, Rygg M, Bergh K. Real-time PCR targeting the *sip* gene for detection of group B *Streptococcus* colonization in pregnant women at delivery. *J Med Microbiol*. 2007;56:223-228.
- [43] Brodeur BR, Boyer M, Charlebois I, Hamel J, Couture F, Rioux CR, et al. Martin D Identification of group B streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity. *Infect Immun*. 2000;68:5610-5618.
- [44] Couturier BA, Weight T, Elmer H, Schlaberg R. Antepartum screening for group B *Streptococcus* by three FDA-cleared molecular tests and effect of shortened enrichment culture on molecular detection rates. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3429-3432.

[45] Dunne WMJr, Holland-Staley CA. Comparison of NNA agar culture and selective broth culture for detection of group B streptococcal colonization in women. J Clin Microbiol. 1998;36:2298-300

[46] Park JS, Cho DH, Yang JH, Kim MY, Shin SM, Kim EC, et al. Usefulness of a rapid real-time PCR assay in prenatal screening for group B *Streptococcus* colonization. Ann Lab Med. 2013;33:39-44.

[47] Horaud, T., Le Bouguenec, C., Pepper, K. Molecular genetics of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin B (MLS) in *streptococci*. J Antimicrob Chemother. 1985; 16: 111-135.

[48] Abdelkareem MZ, Sayed M, Hassuna NA, Mahmoud MS, Abdelwahab SF. Multi-drug-resistant *Enterococcus faecalis* among Egyptian patients with urinary tract infection. J Chemother. 2016;28:1-9.

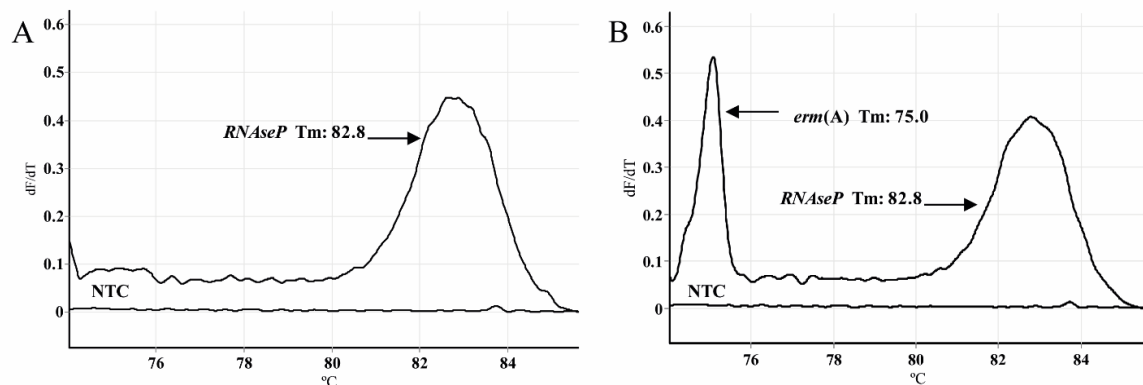


Figure A1 - Melting curve analysis showing the melting temperature peaks ( $T_m$ ) of *Streptococcus agalactiae* with ribonuclease P and macrolide and lincosamide resistance genes and negative template controls (NTC). (A) LMC UEL 68 [*RNaseP*]; (B) LMC UEL 43A [*erm(A)* and *RNaseP*];

## 6 ARTIGO 2

OTAGUIRI, E. S. et al. Antibacterial combination of oleoresin from *Copaifera multijuga* Hayne and biogenic silver nanoparticles towards *Streptococcus agalactiae*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.18, p. 177-190, 2017.

### **Combinação antibacteriana do oleoresina de *Copaifera multijuga* Hayne e nanopartículas de prata biogênicas em *Streptococcus agalactiae***

Otaguiri ES<sup>1</sup>, Morguette AEB<sup>1</sup>, Biasi-Garbin RP<sup>1</sup>, Morey AT<sup>1</sup>, Lancheros CAC<sup>1</sup>, Kian D<sup>1</sup>, Oliveira Jr AG<sup>1</sup>, Kerbauy G<sup>2</sup>, Perugini MRE<sup>3</sup>, Durán N<sup>4</sup>, Nakamura CV<sup>5</sup>, Veiga Junior VF<sup>6</sup>, Nakazato G<sup>1</sup>, Pinge-Filho P<sup>7</sup>, Yamauchi LM<sup>1</sup>, Yamada-Ogatta SF<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>*Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil;*

<sup>2</sup>*Departamento de Enfermagem, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil;*

<sup>3</sup>*Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil;*

<sup>4</sup>*Departamento de Físico-Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil;*

<sup>5</sup>*Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil;*

<sup>6</sup>*Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil;*

<sup>7</sup>*Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.*

\*Autora correspondente:

Sueli Fumie Yamada-Ogatta, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380. CEP 86057-970.

Tel: +55-43-3371-5503; fax: +55-43-3371-4788. e-mail: [ogatta@uel.br](mailto:ogatta@uel.br)

## RESUMO

**Introdução:** *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* do grupo B - EGB) continua a ser uma das principais causas de infecções neonatais e uma importante causa de infecções invasivas em adultos com condições subjacentes. **Métodos:** Este estudo avaliou pela primeira vez o efeito do oleoresina coletado de *Copaifera multijuga* Hayne (óleo de copaíba) isolado ou em combinação com nanopartículas de prata produzidas por síntese verde utilizando *Fusarium oxysporum* (AgNPbio) em células planctônicas e sésseis de EGB obtidas de mulheres colonizadas. **Resultados:** O óleo de copaíba mostrou uma atividade bactericida dose-dependente contra células planctônicas de EGB, incluindo aqueles resistentes à eritromicina e / ou clindamicina. A microscopia eletrônica de varredura e transmissão de EGB tratada com óleo de copaíba revelou alterações morfológicas e ultraestruturais, exibindo ruptura da parede celular e diminuição da densidade eletrônica devido ao vazamento de conteúdo citoplasmático. O óleo de copaíba também exibiu atividade antibacteriana contra biofilmes de isolados de EGB, inibindo sua formação, bem como a viabilidade de biofilmes maduros. Além disso, a combinação do óleo de copaíba com AgNPbio resultou em um efeito sinérgico contra células planctônicas e biofilmes em formação, reduzindo os valores da concentração inibitória mínima de ambos os compostos. Nenhuma atividade hemolítica foi detectada para ambos os compostos. **Conclusão:** Estes resultados indicam o potencial do óleo de copaíba, isolado ou em combinação com AgNPbio, para o desenvolvimento de novas estratégias alternativas para o controle de infecções por EGB.

**Palavras-chave:** *Streptococcus* do Grupo B, resistência à clindamicina e eritromicina, óleo de copaíba, nanopartículas de prata biológicas, *Fusarium oxysporum*, sinergismo antimicrobiano, biofilme.

## 1 INTRODUÇÃO

*Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus* do grupo B (EGB) continua a ser a principal causa de infecções invasivas e potencialmente fatais nos recém-nascidos em todo o mundo, apesar da estratégia de antibioticoterapia profilática intraparto (API) para gestantes de risco [1-6]. Além disso, os recém-nascidos que sobrevivem à infecção por EGB podem desenvolver sequelas neurológicas graves [3, 7]. A colonização vaginal-retal por EGB em gestantes aumenta significativamente o risco de transmissão vertical da bactéria para o recém nascido durante o parto [1]. Estima-se que 1-3% dos neonatos colonizados durante o parto podem desenvolver doença de início precoce (< 7 dias após o nascimento, com maior incidência durante as primeiras 24-48 horas) geralmente apresentando sepse e pneumonia, e menos frequentemente meningite [1, 5, 6]. Em contraste, a aquisição da doença de início tardio (após 7 dias até 3 meses) pode ocorrer através da transmissão vertical [3], pelo contato com fontes contaminadas de ambiente hospitalar ou comunitário [8] ou leite materno [3], sendo sepse e meningite as principais manifestações clínicas [1, 3, 6, 7].

O número de doenças invasivas de EGB em adultos está aumentando globalmente e a maioria dos casos não está relacionada com a gravidez. Diabetes, doenças cardíacas, insuficiência renal crônica são os principais fatores predisponentes para infecção por EGB nessa população, e a taxa de mortalidade é maior nos idosos [4, 9-11]. As manifestações clínicas mais comuns incluem bacteremia com foco não identificado, infecções de pele / tecido mole e do osso / articulação, infecções do trato urinário e pneumonia [4, 12]. Também foram descritas apresentações clínicas graves, como endocardite [9] e síndrome do choque tóxico estreptocócico [10], que são raras, mas associadas a alta mortalidade.

Como não existe uma vacina eficaz contra infecção por EGB, a quimioterapia continua a ser uma medida importante para o controle de doenças de EGB [13]. Atualmente, os beta-lactâmicos penicilina ou ampicilina são os antibacterianos de primeira linha utilizados para a API e tratamento de infecções por EGB. Clindamicina e vancomicina são alternativas para indivíduos alérgicos a penicilina com alto risco de anafilaxia e cujos isolados de EGB são susceptíveis a estes antibacterianos [1]. Embora não seja totalmente eficaz na erradicação das doenças por EGB, a API

levou a uma redução significativa na incidência de infecções neonatais precoce de EGB em muitos países desenvolvidos [1]. No entanto, esta estratégia de prevenção ainda não foi adotada na maioria dos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento [2,5], e não teve impacto nas gestantes e infecções de início tardio [1, 6]. Além disso, a antibioticoterapia profilática e terapêutica em seres humanos e animais pode contribuir para a seleção e disseminação de resistência antimicrobiana [14]. De fato, a API aumentou significativamente o uso de antimicrobianos, o qual pode selecionar isolados resistentes de EGB e espécies não-EGB, resultando em doenças difíceis de tratar [1]. Além disso, a maioria dos antimicrobianos atualmente utilizados são pouco eficazes contra biofilme, contribuindo para a persistência do microorganismo no hospedeiro [15].

Nas últimas décadas, o interesse em produtos naturais como fonte de agentes antimicrobianos contra diversos agentes patogênicos vem sendo renovado. Devido à sua grande diversidade química, as plantas constituem uma fonte importante para a descoberta de novos produtos bioativos [16, 17]. Neste contexto, várias espécies de plantas foram utilizadas para fins medicinais em muitos países, principalmente como alternativa para o tratamento de doenças infecciosas [16-18]. As espécies de *Copaifera* L. (Leguminosae Juss) são originárias das regiões tropicais da América Latina e África Ocidental. Várias espécies de *Copaifera* são encontradas no Brasil e a *Copaifera multijuga* Hayne é uma das espécies mais abundante, que é distribuída principalmente no bioma da Amazônia e Cerrado. As árvores de *Copaifera* são popularmente conhecidas como "pau de óleo", "árvore milagrosa" e "árvore do óleo diesel", porque produzem um oleoresina rico em terpenos exsudados diretamente de seus troncos, conhecido como óleo de copaíba [18, 19]. O oleoresina é amplamente utilizado na medicina tradicional por causa de suas atividades anti-inflamatórias, analgésicas, anti-sépticas e cicatrizante de feridas. Também é usado para tratar secreção do muco vaginal, bronquite, pneumonia, sífilis e doenças da pele [18, 20]. Estudos farmacológicos realizados *in vitro* e *in vivo* mostraram que o óleo de copaíba ou seus constituintes têm atividade antimicrobiana contra vários microrganismos [21-28]. No entanto, a atividade antibacteriana do óleo de copaíba contra EGB não foi descrita.

Outra estratégia promissora para superar a resistência antimicrobiana é o efeito inibitório combinatório de vários compostos em comparação com uma única

substância. Nesse contexto, as nanopartículas de prata (AgNP) atraíram consideráveis interesses principalmente devido à sua notável atividade antimicrobiana isolada ou em combinação com outros compostos [29-37].

Neste estudo, o efeito antibacteriano do oleoresina coletado de *C. multijuga* Hayne (regionalmente conhecido como "copaíba branca") localizado em Manaus, Amazonas, Brasil, foi avaliado *in vitro* pela primeira vez contra células planctônicas e sésseis de EGB obtidas de mulheres colonizadas, incluindo isolados resistentes a clindamicina e eritromicina. O efeito combinatório do óleo de copaíba e da nanopartícula de prata produzida por síntese verde usando *Fusarium oxysporum* também foi analisado.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolados bacterianos e condições de crescimento

Dezessete isolados de EGB obtidos de swabs vaginal-retal (n = 3) e urina (n = 14) de mulheres sem evidência clínica de infecção foram obtidas da coleção bacteriana do Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil. As características fenotípicas e genotípicas desses isolados foram descritas anteriormente [38] e são mostradas na Tabela 1. A cepa de referência *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 foi gentilmente fornecida pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). As bactérias foram cultivadas em TSA (Tryptic Soy Agar, Oxoid, Brasil) contendo 5% de sangue de carneiro (TSA-sangue) a 37°C durante 24 h. Antes dos experimentos, três unidades formadoras de colônia (UFC) de cada bactéria foram transferidas para o TSB (Tryptic Soy Broth, Oxoid) a fim de se obter uma turbidez equivalente a um padrão de 0,5 da escala de McFarland através do turbidímetro DensiCHECK™ PLUS (bioMérieux), que correspondeu a aproximadamente  $1.0$  a  $2.0 \times 10^8$  UFC / mL (suspensão bacteriana padrão). As bactérias foram armazenadas em TSB contendo 20% de glicerol e 5% de sangue de carneiro (Newprov, Brasil) a -80 °C. Os protocolos de estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da UEL (Documento 193/12-CEP / UEL). Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento por escrito para participar deste estudo, concordando com esta publicação.

## 2.2 Oleoresina de *Copaifera multijuga* e nanopartículas de prata biologicamente sintetizadas

O oleoresina (óleo de copaíba) de *C. multijuga* Hayne (INPA 82.418) foi coletado em Manaus, Amazonas, Brasil, através de batidas diretas em seu tronco usando um trado manual na estação chuvosa, quando há uma maior produção [20, 39]. Para preparar uma solução de reserva, 10 mg de oleoresina foi solubilizado em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co., EUA) e adicionado a 900 µL de TSB. A concentração final de DMSO nos ensaios não excedeu 1.0%. O Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente (MMA) do Brasil concedeu permissão para coletar o oleoresina de *C. multijuga* (documento número 30809-1 / 2014-SISBIO / ICMBio / MMA). Estudos de campo não envolveram espécies de plantas ameaçadas ou protegidas.

As nanopartículas de prata biológicas (AgNPbio) foram obtidas após a redução de AgNO<sub>3</sub> por metabolitos extracelulares de *F. oxysporum* como descrito anteriormente [40, 41]. Este método de produção foi patenteado (Patente, 2006, PI 0605681-4A2; <http://www.inpi.gov.br>). Resumidamente, *F. oxysporum* foi cultivado em caldo contendo 2.0% de extrato de malte e 0.5% de extrato de levedura a 28°C por 6 dias. A cultura foi filtrada usando o papel filtro qualitativo Whatman® grade 1 (Sigma-Aldrich, São Paulo), aproximadamente 10 g de biomassa fúngica foram ressuspensas em 100 mL de água destilada estéril e incubadas a 28°C por 72 h. Em seguida, uma solução livre de fungos foi obtida por filtração e incubada com AgNO<sub>3</sub> (1.0 mM) a 28°C durante 28 h, na ausência de luz. AgNPbio foi lavada (três vezes) com água deionizada estéril e centrifugada a 25.000 xg durante 30 min a 4°C. A morfologia e o tamanho foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia de correlação de fótons utilizando ZetaSizer NanoZS (Malvern) como descrito por Durán et al. [41]. AgNPbio foi mantida no escuro em temperatura ambiente para evitar a agregação e foi estável por vários meses. Uma solução mãe de 1.5 mg/mL de AgNPbio foi preparada em água destilada estéril e foi utilizada dentro de três meses após a produção. Foram utilizadas concentrações de 0.015 a 1.0 mg/mL para o óleo de copaíba e 0.036 a 75.0 µg/mL para AgNPbio em todos os ensaios, exceto quando especificado.

## **2.3 Teste de susceptibilidade antibacteriana em células planctônicas**

### **2.3.1 Determinação da concentração inibitória e bactericida mínima**

O efeito inibitório do óleo de copaíba e AgNPbio no crescimento de células planctônicas de EGB foi avaliado por ensaios de microdiluição em caldo de acordo com recomendações do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) [42]. As bactérias foram adicionadas em poços de placas de microtitulação de 96 poços com fundo em U (Techno Plastic Products, Suíça) contendo diluições seriadas 1:2 de cada composto em TSB. Poços contendo meio de cultura ou meio mais 1% de DMSO e poços sem células bacterianas serviram como controles de crescimento e esterilidade em cada placa, respectivamente. A concentração inibitória mínima (CIM) de cada composto foi determinada quando houve inibição total do crescimento visível após 24 h de incubação em comparação com células planctônicas não tratadas. O conteúdo dos poços (10 µL) que não apresentaram crescimento foi inoculado em ágar sangue e incubado a 37 °C durante 24 h para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos compostos, que foi definida quando observada ausência de crescimento de bactérias tratadas em comparação com células controles não tratadas.

### **2.3.2 Curva do tempo de morte**

A taxa de morte bacteriana na presença de óleo de copaíba foi analisada por meio do ensaio de tempo de morte [43]. Células planctônicas ( $5 \times 10^5$  UFC/mL) foram adicionadas em TSB contendo óleo de copaíba nos valores CIM e 2x CIM e incubadas estaticamente a 37 °C. Em tempos específicos (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h), 20 µL foram removidos de cada poço e diluições seriadas 1:10 foram feitas em solução salina tamponada com fosfato 0.15 M pH 7.2 (PBS). Uma alíquota de 10 µL de cada diluição foi inoculada em placas de ágar sangue e contagens da UFC foram realizadas após incubação a 37°C por 24 h [44]. As médias dos resultados foram calculados e plotados como  $\log_{10}$  UFC/mL versus tempo (h).

### **2.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As alterações ultraestruturais induzidas pelo óleo de copaíba (tratamento com CIM e 2x CIM por 6 h) em células planctônicas de EGB foram analisadas por MET.

As células foram fixadas por 2 h em temperatura ambiente com 2.5% de glutaraldeído em tampão de cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% ( $\text{OsO}_4$ ) em tampão de cacodilato contendo 0.8% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  à temperatura ambiente durante 1 h. As células foram desidratadas em acetona e incorporadas em resina Epon. Secções ultrafinas foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinadas em microscópio eletrônico Zeiss EM900.

As alterações morfológicas provocadas pelo óleo de copaíba e AgNPbio, sozinho ou em combinação sinérgica, em células planctônicas de EGB foram analisadas por MEV. As células foram aderidas em lâminas de vidro revestidas com poli-L-lisina, fixadas durante 20 h com glutaraldeído a 2%, paraformaldeído a 2% em tampão de cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2 e pós-fixado em  $\text{OsO}_4$  a 1% durante 2 h. As células foram desidratadas com séries de lavagens em gradiente de etanol (70, 80, 90 e 100 °GL), secas em ponto crítico com  $\text{CO}_2$  (BALCTED CPD 030 Critical Point Dryer), revestidas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e observadas sob microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200.

#### **2.3.4 Análise da integridade da membrana celular**

O efeito do óleo de copaíba na integridade da membrana celular de EGB foi avaliado usando o kit de coloração LIVE / DEAD® BacLight™ (Molecular Probes, Invitrogen, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. Bactérias tratadas (CIM e 2x CIM por 24 h) e não tratadas foram incubadas com SYTO 9 e iodeto de propídio, colocadas em uma lâmina de vidro e analisadas por microscopia de fluorescência (LEICA DM2000) utilizando a excitação / emissão de 480/635 nm. As bactérias vivas e mortas foram marcadas com fluorescência verde SYTO® 9, enquanto as bactérias com membranas permeáveis (danificadas) foram marcadas seletivamente pelo iodeto de propídio fluorescente vermelho.

### **2.4 Teste de suscetibilidade a antibióticos**

#### **2.4.1 Formação de Biofilme**

A capacidade de produção de biofilme de todos os isolados de EGB foi avaliada em placas de microtitulação em poliestireno de 96 poços com fundo plano (Techno Plastic Products, Suíça) utilizando o procedimento descrito por Borges *et al.*

[45] com pequenas modificações. Resumidamente, uma alíquota de 20 mL de suspensão bacteriana padrão foi colocada em cada poço contendo 180 mL de TSB e as placas incubadas estaticamente a 37 °C durante 24 h. Após incubação, o meio foi aspirado e as células não aderidas foram removidas através de três lavagens com PBS. A biomassa de biofilme foi fixada com 200 µL de metanol durante 15 min, seca à temperatura ambiente e corada com cristal de violeta a 2% (v / v) durante 5 min. O cristal violeta aderido ao biofilme foi removido pela adição de 160 µL de ácido acético (Merck, Brasil) e transferido para outra placa. A densidade óptica (OD) foi medida a 570 nm com leitor de placa de microtitulação (Synergy <sup>TM</sup> HT, BioTek). Os valores de OD dos poços sem células (controles negativos) foram subtraídos dos valores dos poços testes para minimizar a interferência de fundo. Os ensaios foram realizados em quintuplicata e realizados em duas diferentes ocasiões.

#### **2.4.2 Efeito do óleo de copaíba em biofilmes de EGB**

Três isolados de EGB susceptíveis a eritromicina / clindamicina (cepa referência, EGB 32 e 37) e três resistentes (isolados EGB 15, 65 e 115) foram selecionados aleatoriamente para a análise da atividade antibiofilme. O efeito do óleo de copaíba foi avaliado em biofilme em crescimento e biofilme estabelecido (após 24 h de incubação). Para ambos, o biofilme foi formado na superfície de poliestireno como descrito acima com pequenas modificações. a) no crescimento do biofilme, foram adicionados 20 µL da suspensão bacteriana padrão em cada poço contendo 180 µL de TSB com diferentes concentrações de compostos e as placas foram incubadas estaticamente a 37 °C durante 24 h. b) no biofilme estabelecido, após a formação do biofilme, o meio foi aspirado, as células sésseis lavadas suavemente com PBS estéril, adicionou-se TSB fresco (200 µL) contendo diferentes concentrações dos compostos e as placas foram incubadas durante mais 24 h.

Para todos os ensaios, poços livres de óleo de copaíba, poços livres de AgNPbio e poços livres de biofilme foram incluídos como controles. As atividades metabólicas das células sésseis tratadas foram comparadas com células não tratadas usando o método de redução 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-5-(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide(XTT) [46]. Uma alíquota de 200 µl de XTT-menadiona [0,5 mg/mL XTT, 1 mM de menadiona (Sigma Chemical Co, EUA)] foi adicionada a cada poço e as placas foram incubadas no escuro a 37 °C

durante 90 min. Os sobrenadantes foram transferidos para uma nova placa de microtitulação e a DO foi medida a 490 nm em leitor de placa de microtitulação. Os experimentos foram realizados em quintuplicata em duas diferentes ocasiões.

## 2.5 Análise da combinação do óleo de copaíba e AgNPbio

Os efeitos da combinação do óleo de copaíba e AgNPbio em células planctônicas e biofilme de EGB foram avaliados pelo método de *checkboard*[47]. Diluições seriadas 1:2 do óleo de copaíba e AgNPbio foram adicionadas em filas e colunas, respectivamente, em placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços. Para células planctônicas, o ensaio de microdiluição em caldo foi preparado de acordo com CLSI [42] e as placas foram incubadas durante 24 h a 37°C. A atividade antibiofilme da combinação do óleo de copaíba e AgNPbio foram avaliadas contra biofilme em crescimento e biofilme estabelecido como descrito acima. Para todos os ensaios, a natureza das interações de ambos os compostos foi analisada pelo índice da concentração inibitória fracionada (FICI), que foi definido como a soma do FIC do óleo de copaíba e FIC da AgNPbio. O FIC de cada composto é a concentração que apresenta o efeito inibitório quando usado em combinação com outro composto dividido pela concentração que tem o mesmo efeito quando usado individualmente. Os valores de FICI foram interpretados da seguinte forma: sinergismo  $FICI \leq 0.5$ , sem interação  $0.5 < FICI < 4.0$ , antagonismo  $FICI > 4.0$  [48]. O ensaio da curva de morte foi realizado para confirmar o efeito sinérgico do óleo de copaíba e AgNPbio contra células planctônicas, como descrito acima. A interação sinérgica foi definida como uma diminuição maior do que  $2\text{-log}_{10}$  na contagem de UFC em comparação com a contagem de UFC de cada agente sozinho após 24 h de incubação [43]. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três diferentes ocasiões.

## 2.6 Ensaio de citotoxicidade

A toxicidade do óleo de copaíba (0.03 – 1.0 mg/mL) ou AgNPbio (0.29 – 18.75 µg/mL) e suas combinações sinérgicas nos valores da CIM foram avaliadas em células HEP-2 (carcinoma humano, ATCC, CCL-23) e eritrócitos humanos. As células HEP-2 foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco [DMEM (Invitrogen-Gibco, EUA)] suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado

por calor, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2.5 µg/mL de anfotericina B. As células foram cultivadas em placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano com uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço durante 24 h em 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C . Na confluência, as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS estéril. O meio (200 µL), contendo diferentes concentrações dos compostos, foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas durante 24 h. A viabilidade celular foi determinada pelo método de redução do *brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio* (MTT, Sigma Chemical Co., EUA) de acordo com recomendações do fabricante. A concentração dos compostos necessária para inibir as células viáveis acima de 50% e 100% analisada por regressão correspondeu à concentração citotóxica de 50% e 100% (CC<sub>50/24h</sub> - CC<sub>100/24h</sub>).

O sangue de doadores saudáveis foi coletado, de acordo com os princípios expressos na Declaração de Helsinque, e sangue desfibrinado a 3% foi preparado em solução salina glicosilada a 5%. Os eritrócitos (100 µL) foram incubados com os compostos em diferentes concentrações por 3 h a 37 °C. Os poços sem compostos e contendo 1% de Triton X-100 foram incluídos como controles negativos e positivos, respectivamente. A placa foi centrifugada a 1000 x g durante 10 min e o sobrenadante transferido para nova microplaca. A DO foi medido a 550 nm e a porcentagem de hemólise foi comparada com os poços de controle positivo, utilizando a seguinte equação:  $(DO_{550} \text{ do sobrenadante tratado com composto} - DO_{550} \text{ do controle negativo}) / (DO_{550} \text{ do controle positivo} - DO_{550} \text{ do controle negativo}) \times 100\%$  [25].

Os valores CC<sub>100</sub> foram utilizados para calcular o índice de seletividade (IS) de ambos os compostos, aplicando a seguinte equação:  $IS = CC_{100} / CIM_{100}$ . Os ensaios foram realizados em triplicata e em duas ocasiões distintas.

## 2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GRAPHPAD PRISM versão 6.0 (software GRAPHPAD, San Diego, CA). Os valores de CIM e os dados da curva de morte foram analisadas usando o Kruskal-Wallis e teste *post hoc* comparação múltipla de Dunn. Para estudos de redução de biofilmes, os valores médios foram testados quanto à significância por one-way ANOVA e teste *post hoc*

de comparação múltipla de Dunnett. Os valores de P inferiores a 0.05 foram considerados significativos em todos os casos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 O óleo de copaíba exhibe atividade bactericida contra células planctônicas de EGB

Os valores de CIM e CBM do óleo de copaíba e AgNPbio foram determinados para todos os isolados de EGB e são mostrados na Tabela 1. Todos os isolados de EGB obtidos de mulheres colonizadas e a cepa de referência foram susceptíveis à penicilina. Quatorze isolados foram resistentes à eritromicina e entre eles, nove também resistentes à clindamicina. Os isolados resistentes apenas a eritromicina exibem uma bomba de efluxo codificada pelo gene *mefA/E*, enquanto que os resistentes a ambos os antibacterianos exibem os genes *ermA* ou *ermB* que codificam metilases que realizam modificação pós-transcricional do alvo 23S RNA ribossômico [38, 49].

**Tabela 1: Atividade antibacteriana do óleo de copaíba e AgNPbio, características fenotípicas e genotípicas da susceptibilidade à eritromicina / clindamicina de *Streptococcus agalactiae*.**

EGB Isolado	Resistência genes <sup>a</sup>	Susceptibilidade		Óleo de Copaiba		AgNPbio	
		DA <sup>a</sup>	E <sup>a</sup>	CIM <sup>b</sup> (mg/mL)	CBM <sup>c</sup> (mg/mL)	CIM <sup>b</sup> (µg/mL)	CBM <sup>c</sup> (µg/mL)
ATCC 13813	-	S	S	0.50	1.00	37.50	37.50
32	-	S	S	0.50	1.00	18.75	18.75
37	-	S	S	0.50	1.00	37.50	75.00
80	-	S	S	0.25	> 1.00	37.50	75.00
15	<i>mefA/E</i>	S	R	0.50	1.00	37.50	37.50
22	<i>mefA/E</i>	S	R	0.50	> 1.00	37.50	37.50
46	<i>mefA/E</i>	S	R	0.25	0.50	37.50	37.50
65	<i>ermA</i>	R	R	0.25	> 1.00	37.50	37.50
66	<i>ermB</i>	R	R	0.50	> 1.00	37.50	37.50
105	<i>ermA</i>	R	R	0.50	1.00	37.50	37.50
108	<i>ermA</i>	R	R	0.12	0.25	37.50	75.00
109	<i>ermA</i>	R	R	0.25	0.50	37.50	37.50
112	<i>ermA</i>	R	R	0.12	0.25	37.50	37.50

114	<i>ermA</i>	R	R	0.25	0.50	37.50	37.50
115	<i>ermB</i>	R	R	0.50	> 1.00	37.50	37.50
117	<i>ermA</i>	R	R	0.25	1.00	37.50	37.50
120	<i>mefA/E</i>	S	R	0.25	0.50	37.50	37.50
121	<i>mefA/E</i>	S	R	0.25	0.50	37.50	37.50

<sup>a</sup> A caracterização fenotípica e genotípica do perfil de susceptibilidade a eritromicina (E) e clindamicina (DA) foi previamente avaliada [38]. Os genes *erm* codificam metilases que promovem a metilação pós-transcricional dos resíduos de adenina do RNA ribossômico 23S, e os genes *mef* codificam proteínas ligadas à membrana que promovem o efluxo do antibiótico. <sup>b</sup>A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de copaíba e AgNPbio foi determinada pelo método de microdiluição de caldo de acordo com CLSI [42]. <sup>c</sup> A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada pela contagem direta de UFC. CIM e CBM foram definidos como inibição total do crescimento visível de células planctônicas e contagens de UFC, respectivamente. (S) Susceptível, (R) Resistente.

Os valores da CIM do óleo de copaíba para todos os isolados de EGB variaram de 0.12 a 0.5 mg/mL (média  $0.35 \pm 0,15$ ). Os valores de CBM para a maioria dos isolados de EGB foram 2x CIM (variou de 0.5 a 1.0 mg/mL), indicando um efeito bactericida do óleo de copaíba contra EGB. Para cinco isolados de EGB, os CBMs foram superiores a 1.0 mg/mL. Não houve diferença significativa nos valores de CIM e CBM entre isolados sensíveis e resistentes a eritromicina / clindamicina ( $P > 0.05$ ). Para avaliar a cinética de morte, as células planctônicas da cepa referência e EGB 15 foram cultivadas na presença de óleo de copaíba nos valores da CIM (0.5 mg / mL) e 2x CIM (1.0 mg/mL) e as contagens de UFC foram determinadas em intervalos de tempo durante 24 h (Fig. 1A e B). Por 24 h, observou-se uma diminuição de  $2 \log_{10}$  ( $P < 0.01$ ) e  $1 \log_{10}$  ( $P > 0.05$ ) nas contagens de UFC para a cepa referência e EGB 15 na CIM, respectivamente, em comparação com o inóculo inicial. Na concentração 2x CIM, observou-se uma diminuição gradual das contagens de UFC ao longo do tempo e não foram detectadas células viáveis após 24 h de tratamento para ambos os isolados ( $P < 0.01$ ).

**(Artigo publicado, figura suprimida)**

Fig. (1). Atividade bactericida do óleo de copaíba de *C. multijuga* contra EGB susceptível e resistente à eritromicina. Curva do tempo de morte da cepa referência (A) e EGB 15 (B) resistente à eritromicina na presença de óleo de copaíba de *C. multijuga*: as bactérias foram incubadas com óleo de copaíba na CIM (0.5 mg / mL) e CBM (1.0 mg / mL) durante 24 h a 37 °C e as contagens de UFC foram determinadas em tempos específicos. A atividade metabólica das células determinadas com o kit de coloração LIVE / DEAD® BacLight™: a cepa de referência não tratada (C) e EGB tratado com óleo de copaíba na CIM (D) apresentaram cor verde fluorescente, indicando a presença de células metabolicamente ativas com integridade da membrana intacta, enquanto que na CBM (E) apresentaram fluorescência vermelha, indicando bactérias mortas com membranas danificadas. Barras: (C, D, E) = 5 µm. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células não tratadas (F) apresentaram morfologia esférica típica mostrando uma parede celular compacta com densidade eletrônica regular. O efeito do óleo de copaíba na cepa referência após o tratamento com concentrações CIM (G) e CBM (H) após 6 h de tratamento revelou alterações na morfologia bacteriana (seta branca) e liberação de conteúdo citoplasmático no espaço extracelular (seta preta) (G e H). Barras: (F, G, H) = 200 nm.

O efeito do óleo de copaíba sobre a integridade da membrana celular de EGB também foi avaliado por microscopia após coloração diferencial de células por dois corantes fluorescentes de ácido nucleico. EGB não tratado com óleo de copaíba apresentou coloração verde fluorescente, indicando a presença de células metabolicamente ativas com integridade da membrana intacta após 24 h (Fig. 1C). Nos valores da CIM, as células planctônicas de referência também foram verdes fluorescentes (Fig. 1D), corroborando com os dados da curva de morte. Em contraste, o isolado de EGB tratado com óleo de copaíba 2x CIM foram fluorescentes vermelhas, refletindo bactérias mortas com membranas danificadas (Fig. 1E).

As alterações morfológicas e ultraestruturais das células planctônicas induzidas pelo óleo de copaíba foram observadas por MET (Fig. 1) e MEV (Fig. 5). As células controle apresentaram morfologia esférica típica com parede celular compacta e densidade eletrônica regular (Fig. 1F). O isolado de EGB apresentou alterações ultraestruturais notáveis, exibindo ruptura da parede celular e diminuição da densidade eletrônica devido ao extravasamento do conteúdo citoplasmático (Fig. 1G e H).

### 3.2 Biofilmes de EGB são inibidos pelo óleo de copaíba

Para avaliar a atividade antibiofilme do óleo de copaíba, foi primeiro analisada a capacidade de todos os isolados de EGB de formar biofilme na superfície de poliestireno. A biomassa de biofilme de 24 h foi avaliada após coloração com cristal de violeta e a média da  $DO_{570nm}$  (densidade óptica a 570 nm)  $\pm$  desvio padrão foi de  $0.296 \pm 0.108$ , variando de  $0.103 \pm 0.029$  a  $0.570 \pm 0.036$ . EGB

105 e EGB 65, ambos resistentes à eritromicina e à clindamicina, foram os isolados menos e mais produtores de biofilmes, respectivamente (Fig. 2A).

A adição de óleo de copaíba no início da formação de biofilme diminuiu a atividade metabólica de células sésseis de todos os isolados de EGB, e esse efeito pareceu ser dose-dependente (Fig. 2B e C). Somente para o isolado EGB 37, observou-se uma redução significativa das células sésseis metabolicamente ativas em todas as concentrações de óleo de copaíba ( $P < 0.05$  para 0.03 e 0.06 mg / mL e  $P < 0.001$  para as demais concentrações) testadas neste estudo em comparação com o controle (crescimento de biofilme na ausência de composto). Com a concentração de 0.25 mg / mL de óleo de copaíba, a maior porcentagem de redução na atividade metabólica foi detectada para EGB 37 (95.8%,  $P < 0.001$ ), seguido de EGB 115 (91.6%,  $P < 0.001$ ), EGB 32 (87.5% ,  $P < 0.001$ ), EGB 15 (55.0%,  $P < 0.001$ ), EGB 65 (51.8%,  $P < 0.01$ ) e cepa referência (19.3%,  $P > 0.05$ ). Com 0.5 e 1.0 mg/mL de óleo de copaíba, houve redução média de mais de 70% e 85% da atividade metabólica de células sésseis, respectivamente, após 24 h para todos os isolados de EGB, independentemente do perfil de susceptibilidade a antibióticos ( $P < 0.001$ ).

**(Artigo publicado, figura suprimida)**

Fig(2). Atividade antibiofilme do óleo de copaíba de *C. multijuga* em biofilmes de *Streptococcus agalactiae*. (A) Biomassa total do biofilme formado em superfície de poliestireno após 24 h de incubação a 37 °C e quantificada pelo método de cristal violeta. Atividade inibitória do óleo de copaíba, avaliada pelo ensaio de redução de XTT, na formação de biofilme (B, C) e biofilme maduro (D, E) de isolados de EGB susceptíveis a eritromicina e clindamicina (B, D) e resistentes (C, E). Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos. Os asteriscos indicam redução significativa das células sésseis metabolicamente ativas tratadas com óleo de copaíba em comparação com células não tratadas (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

Embora menos pronunciado, o óleo de copaíba também apresentou um efeito inibitório dose-dependente em biofilmes maduros na maioria dos isolados de EGB (Fig. 2D e E). A diminuição da atividade metabólica de células sésseis em biofilmes maduros foi estatisticamente significativa ( $P < 0.001$ ) para a cepa referência de EGB em todas as concentrações de óleo de copaíba testadas (variando de

40.04%  $\pm$  2.90 a 60.60%  $\pm$  0.05). Por outro lado, com exceção dos isolados de EGB 32 e EGB 65, cujos biofilmes maduros não foram significativamente ( $P > 0.05$ ) inibidos em nenhuma concentração de óleo de copaíba testada, apenas em 0.5 e 1.0 mg/mL houve uma diminuição significativa na viabilidade do biofilme para EGB 15, EGB 37 e EGB 115. A maior porcentagem de média de redução (0.5 e 1.0 mg/mL, respectivamente) foi detectada para a cepa de referência (54.19%  $\pm$  11.37 e 60.60%  $\pm$  0.05,  $P < 0.001$ ), seguida de EGB 15 (44.05%  $\pm$  0.91,  $P < 0.05$  e 49.50%  $\pm$  10.18,  $P < 0.01$ ), EGB 115 (22.66%  $\pm$  6.56,  $P < 0.01$  e 32.73%  $\pm$  4.82,  $P < 0.001$ ) e EGB 37 (19.40  $\pm$  5.02 e 23.66  $\pm$  7.30,  $P < 0.05$ ).

### 3.3 Óleo de copaíba exibe uma interação sinérgica com AgNPbio em EGB.

A redução de  $\text{Ag}^+$  pela nitrato redutase dependente de NADH extracelular e antraquinona derivada de *F. oxysporum* [40, 41] produziu uma biomassa de nanopartículas de prata de cor marrom-amarelada. As nanopartículas com densidade eletrônica esférica foram observadas por análise em MET (Fig. 3A), a maioria exibindo cerca de 95 nm de tamanho que foi ainda confirmada pela análise no ZETA sizer (Fig. 3B). Além disso, AgNPbio apresentou um potencial Zeta, que variou de -14.3 a -34.6 mV (Fig. 3C) ao longo de 28 h, indicando que as nanopartículas encontravam-se carregadas negativamente com uma boa estabilidade elétrica e nenhuma tendência à floculação [50]. Essas nanopartículas são estabilizadas por proteínas secretadas por fungos [40, 41], que podem impedir sua agregação e aumentar sua solubilidade [51]. Além disso, estas proteínas não parecem interferir no efeito antibacteriano da nanopartícula, uma vez que o sobrenadante livre de células sem adição de nitrato de prata não mostrou atividade inibitória contra EGB. Os dados EDS confirmaram a presença da prata nas nanopartículas biogênicas (dados não mostrados).

#### (Artigo publicado, figura suprimida)

Fig. (3). Caracterização biológica das nanopartículas de prata (AgNPbio). Microscopia eletrônica de transmissão da AgNPbio (A) exibindo morfologia esférica típica (150.000 x). Distribuição de tamanho (B) por intensidade (%) obtida por espectroscopia de correlação de fótons e distribuição do potencial zeta da AgNPbio

(C) fornecida por Zeta sizer NanoZS (Malvern). O diâmetro da AgNPbio foi de 95 nm e o potencial zeta variou do valor inicial de -14.3 a -34.6 mV.

Primeiramente, os valores de CIM e CBM da AgNPbio para todas os isolados de EGB foram determinados e os resultados mostrados na Tabela 1. Exceto para EGB 32, cuja CIM e CBM foram de 18.75 µg/mL, todos os isolados de EGB apresentaram valores de CIM de 37.5 µg/mL e valores de CBM de 37.5 ou 75.0 µg/mL. A cepa referência e EGB 15 foram utilizadas para avaliar o efeito do óleo de copaíba e sua combinação com AgNPbio em células planctônicas e sésseis pelo método de *checkboxboard* e os valores de FICI foram calculados para determinar a natureza da combinação antibacteriana. As células planctônicas de ambos os isolados apresentaram os mesmos valores de CIM e CBM de 0.5 e 1.0 mg/mL, e 37.5 e 37.5 µg/mL para o óleo de copaíba e AgNPbio, respectivamente. A adição simultânea do óleo de copaíba e AgNPbio durante o crescimento planctônico reduziu (oito vezes) a CIM de ambos os compostos para os isolados testados. O FICI calculado de 0.25 e 0.37 indicou uma interação sinérgica para a combinação de 0.06 mg/mL de óleo de copaíba e 4.69 µg/mL de AgNPbio e 0.12 mg/mL de óleo de copaíba e 4.69 µg/mL de AgNPbio, respectivamente (Tabela 2).

**Tabela 2. Efeito combinatório do óleo de copaíba e nanopartícula de prata biológica em células planctônicas de EGB pelo método de *checkboxboard*.**

Isolado EGB	Óleo <sup>a</sup> (mg/mL)	Óleo+AgNPbio <sup>b</sup> (mg/mL)	AgNPbio <sup>a</sup> (µg/mL)	AgNPbio + Óleo <sup>b</sup> (µg/mL)	FICI <sup>c</sup>	Tipo de Interação
ATCC 13813	0.50	0.06	37.50	4.69	0.25	Sinergismo
15	0.50	0.12	37.50	4.69	0.37	Sinergismo

<sup>a</sup> Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo de copaíba e AgNPbio testados isoladamente. <sup>b</sup> Óleo de Copaíba e AgNPbio testados em combinação. O índice da concentração inibitória fracionada (FICI) foi interpretado de acordo com Odds [48] e classificado como: sinergismo FICI ≤ 0.5, sem interação 0.5 < FICI < 4.0, antagonismo FICI > 4.0.

Os resultados obtidos na curva de morte confirmaram essa interação e seu efeito bactericida dose-dependente (Fig. 4A e B). A presença de 4.99 µg/mL de AgNPbio não interferiu no crescimento bacteriano de nenhum isolado ( $P > 0.05$ ). Em

0.12 mg/mL de óleo de copaíba, observou-se uma redução no crescimento de EGB ao longo do tempo e, após 24 h de incubação, apesar de não significativo ( $P > 0.05$ ), houve uma diminuição de UFC/mL de  $2 \log_{10}$  em comparação com células não tratadas. Na combinação sinérgica (0.06 mg/mL de óleo de copaíba com 4.99  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPbio), observou-se um efeito bacteriostático, enquanto que 0.12 mg/mL de composto da planta com 4.99  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPbio provocou um efeito sinérgico bactericida em ambos os isolados. Curiosamente, 100% das células da cepa referência foram mortas por essa combinação após 8 h de incubação (Fig. 4A). Por outro lado, a contagem de UFC de EGB 15 resistente à eritromicina foi igual a zero apenas após 24 h (Fig. 4B).

**(Artigo publicado, figura suprimida)**

Fig. (4). Efeito sinérgico *in vitro* do óleo de copaíba e AgNPbio no crescimento de *Streptococcus agalactiae*. Curvas do tempo de morte da cepa *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 (A) e EGB 15 (B) após o tratamento com óleo de *C. multijuga* e nanopartícula de prata: as bactérias foram incubadas com o óleo de copaíba sozinho ou em combinação com AgNPbio durante 24 h a 37 °C, e as contagens de UFC foram realizadas em pontos de tempos específicos.

A análise por MEV revelou que as células de EGB não tratadas possuíam uma superfície regular e lisa com morfologia típica (Fig. 5A). A cepa referência e EGB 15 tratadas com CBM de ambos os compostos sozinhos ou em combinação sinérgica durante 6 h pareciam estar lisadas devido à presença de material amorfo na superfície celular (Fig. 5 B-D).

**(Artigo publicado, figura suprimida)**

Fig.(5). Efeito do óleo de copaíba e AgNPbio em células planctônicas de *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 após 6 horas de tratamento, conforme observado por microscopia eletrônica de varredura. (A) As células não tratadas tinham uma superfície regular e lisa com morfologia típica e células tratadas com (B) 1 mg/mL de óleo de copaíba, (C) 37.5  $\mu\text{g/mL}$  de

AgNPbio e (D) 0.12 mg/mL de óleo de copaíba em combinação com 4.69 µg/mL de AgNPbio pareciam estar lisadas devido à presença de material amorfo na superfície celular (seta). Barra: (A, B, C e D) = 2 µm.

Em geral, a combinação do óleo de copaíba com AgNPbio também foi capaz de reduzir a atividade metabólica de células sésseis de isolados de EGB. No entanto, o efeito variou de acordo com a fase de desenvolvimento do biofilme. Quando a combinação se encontrava presente no início da formação do biofilme, observou-se diminuição de oito vezes na CIM do óleo de copaíba para ambos os isolados de EGB. Para AgNPbio houve diminuição de 16 vezes e 4 vezes nos valores da CIM para a cepa referência e EGB 15, respectivamente. Os valores calculados de FICI de 0.18 e 0.37 foram obtidos para cepa de referência e EGB 15, respectivamente, indicando uma interação sinérgica entre ambos os compostos (Tabela 3). Não foi observada interação sinérgica entre os dois compostos testados em diferentes concentrações nos biofilmes maduros de EGB (dados não mostrados).

**Tabela 3. Efeito sinérgico *in vitro* do óleo de copaíba e nanopartículas de prata biológicas contra biofilme em crescimento de EGB.**

EGB Isolado	Óleo <sup>a</sup> (mg/mL)	Óleo+AgNPbio <sup>b</sup> (mg/mL)	AgNPbio <sup>a</sup> (µg/mL)	AgNPbio + Óleo <sup>b</sup> (µg/mL)	FICI <sup>c</sup>	Tipo de interação
ATCC 13813	0.25	0.03	37.50	2.34	0.18	Sinergismo
15	0.25	0.03	75.00	18.75	0.37	Sinergismo

<sup>a</sup>Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo de copaíba e AgNPbio testados isoladamente. <sup>b</sup>Óleo de copaíba e AgNPbio testados em combinação. O índice da concentração inibitória fracionada (FICI) foi interpretado de acordo com Odds [48] e classificado como segue: sinergismo FICI ≤ 0.5, sem interação 0.5 < FICI < 4.0, antagonismo FICI > 4.0.

### 3.4 Citotoxicidade do óleo de copaíba e AgNPbio em células de mamíferos

Para analisar a segurança do óleo de copaíba e AgNPbio em células de mamíferos, a viabilidade das células HEp-2 foi avaliada após incubação com ambos os compostos, isoladamente ou em concentrações antibacterianas sinérgicas. Ambos os compostos isoladamente exibiram uma toxicidade dose-dependente em células HEp-2 (Fig. 6A e B). Os valores CC50 e CC100 de 0.06 mg/mL e 0.25

mg/mL para o óleo de copaíba e de 14.06  $\mu\text{g/mL}$  e 24.76  $\mu\text{g/mL}$  para AgNPbio, respectivamente, foram determinados após 24 h de incubação. Valores de IS de 0.50 e 0.66 foram obtidos para óleo de copaíba e AgNPbio, respectivamente, indicando que ambos os compostos quando testados isoladamente eram mais tóxicos para células de mamífero. No entanto, nas combinações de 0.06 mg/mL de óleo de copaíba mais 4.99  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPbio (bactericida em ambas as células planctônicas de EGB) e 0.03 mg/mL de óleo de copaíba mais 2.34  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPbio (inibição da formação de biofilme da cepa referência) em torno de 80 - 90% das células de mamífero encontravam-se viáveis de acordo com o ensaio de redução de MTT. Entretanto, a interação sinérgica de 0.03 mg/mL de óleo de copaíba e 18.75  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPbio durante a formação de biofilme do isolado EGB15 resultou em uma redução significativa na porcentagem de células HEp-2 viáveis após 24 h de incubação em comparação com ambos os tratamentos sozinhos (Fig. 6C).

**(Artigo publicado, figura suprimida)**

Fig. (6). Efeito do óleo de copaíba e AgNPbio na viabilidade das células HEp-2. As células HEp-2 foram tratadas durante 24 h com diferentes concentrações de óleo de copaíba (A), AgNPbio (B) e com a combinação de óleo de copaíba e AgNPbio (C). A viabilidade celular foi determinada pelo método de redução MTT de acordo com as recomendações do fabricante. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos.

Por outro lado, após 3 horas de incubação, o óleo de copaíba e AgNPbio não causaram lise em eritrócitos humanos em nenhuma concentração testada neste estudo, inclusive na combinação sinérgica de ambos os compostos contra células de EGB.

#### **4. DISCUSSÃO**

A resistência antimicrobiana é um dos principais desafios da medicina humana e animal. Esta leva à terapia profilática inapropriada e falhas terapêuticas,

uso de drogas mais tóxicas, mais caras e aumento do tempo de internação dos pacientes.

Em geral, os isolados de EGB permanecem susceptíveis aos beta-lactâmicos [38, 52, 53] no entanto isolados com susceptibilidade reduzida e resistentes a esses antibacterianos foram relatados [4]. Em contraste, as taxas de resistência à eritromicina e clindamicina entre os isolados de EGB aumentaram significativamente em diferentes regiões do mundo [4, 38, 52-54]. Além disso, os isolados de EGB apresentaram formação de biofilmes em superfícies abióticas, e o pH ácido parece desencadear este modo de crescimento celular [55]. Não surpreendentemente, os biofilmes de EGB foram resistentes a vários antimicrobianos, embora as células planctônicas apresentassem sensibilidade [56].

Os produtos derivados de plantas têm uma contribuição importante para a saúde em todo o mundo desde a antiguidade. Além do efeito antibacteriano sobre células planctônicas, vários produtos derivados de plantas mostraram atividade inibitória contra biofilmes microbianos [16, 17, 26, 35]. O oleoresina das espécies de *Copaifera* é um dos principais produtos florestais não madeireiros explorados de forma sustentável no Brasil, sendo utilizados tanto na indústria de cosméticos como na medicina popular [18, 20]. Vários estudos *in vitro* mostraram o efeito inibitório do óleo de copaíba de diferentes espécies de *Copaifera* no crescimento de vários Gram positivos e Gram negativos, incluindo aquelas bactérias multi-resistentes [20-22, 26-28]. Embora a *C. multijuga* Hayne esteja entre as espécies com maior potencial de produção de oleoresina na região amazônica, poucos estudos relatam a atividade antibacteriana desta espécie vegetal. Mendonça e Onofre [22] mostraram usando um método de disco de difusão em que o oleoresina de *C. multijuga* (localizada em Mato Grosso, Brasil) conseguiu inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando valores de CIM de 3.12, 1.56 e 12.5%, respectivamente. Santos et al. [21] mostraram que o oleoresina de *C. multijuga* (localizada no Amazonas, Brasil) teve um efeito inibidor de crescimento apenas em bactérias Gram-positivas com CIM, determinadas pelo ensaio de microdiluição de caldo, variando de 0.12 a mais de 1 mg / mL.

Neste estudo, a atividade antibacteriana dose e tempo-dependente do oleoresina de *C. multijuga* contra células planctônicas e biofilme de *S. agalactiae*, incluindo aqueles que exibem diferentes mecanismos de resistência à eritromicina e

/ ou clindamicina foi relatada pela primeira vez. Foi mais eficaz na inibição da formação do biofilme do que em biofilmes maduros, indicando que este composto da planta também pode interferir nas propriedades de aderência de EGB. Da mesma forma, Silva Moraes *et al.* [28] mostraram que o oleoresina da *Copaifera oblongifolia* (localizada em Minas Gerais, Brasil) exibiu um efeito inibitório contra os biofilmes maduros de bactérias que causam cáries dentárias e infecções endodônticas. Ao usar a leitura espectrofotométrica das células sésseis coradas com cristal de violeta e contagem de UFC, esses autores relataram CIMB<sub>50</sub> (CIM que inibe 50% da biomassa do biofilme) de 0.4 mg/mL para *Lactobacillus casei* e *Peptostreptococcus micros*; 0.2 mg/mL para *Streptococcus mutans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e 0.1 mg/mL para *Streptococcus mitis* e *Porphyromonas gingivalis*.

O mecanismo pelo qual o óleo de copaiba induz a morte bacteriana não é totalmente compreendido. A composição do oleoresina pode variar entre diferentes espécies de *Copaifera* e árvores da mesma espécie de diferentes regiões [57]. No entanto, os sesquiterpenos e os diterpenos, representados principalmente por  $\beta$ -cariofileno e ácido copálico, respectivamente, estão presentes na maioria dos oleoresinas obtidos de *C. multijuga*, independentemente da sazonalidade e do diâmetro da altura do peito da árvore [19, 20, 39, 58] e pode ser responsável pela atividade antimicrobiana. Corroborando com estes dados, verificou-se que o ácido copálico diterpeno do oleoresina de *Copaifera langsdorfi* foi o composto mais ativo contra bactérias Gram-positivas, incluindo *S. agalactiae* ATCC 27591 [26] e outras espécies de *Streptococcus* associadas à cárie dentária [24]. Além disso, o oleoresina de *C. oblongifolia* contém os ácidos diterpênicos hardwíckiico, copálico e caurenóico, que apresentaram efeito antibacteriano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que causam infecções bucais [28]. Por outro lado, o oleoresina de *Copaifera martii*, *Copaifera reticulata* e *Copaifera officinalis* que contém diferentes sesquiterpenos e diterpenos como constituintes principais [20, 39], também mostrou atividade bactericida em bactérias Gram-positivas [21]. Além disso, o oleoresina de *C. martii* provocou alterações morfológicas e ultraestruturais semelhantes em *S. aureus* [21] em comparação com as exibidas por células de EGB tratadas com oleoresina de *C. multijuga* neste estudo. Estes dados indicam que o efeito bactericida do óleo de copaíba pode ser devido a interações entre seus vários

componentes químicos. De fato, os terpenos compreendem uma grande família de compostos encontrados em várias espécies de plantas, os quais uma atividade inibitória do crescimento de bactérias e microrganismos eucarióticos foi descrita anteriormente [16, 17, 20, 21, 23-26].

Embora o modo de ação do óleo de copaíba não tenha sido completamente esclarecido neste estudo, o efeito bactericida parece ser causado por extravasamento dos componentes intracelulares devido às alterações da membrana celular de EGB e da parede celular. Conforme afirmado anteriormente, esse efeito depende da concentração do óleo de copaíba e do tempo de exposição, uma vez que após 24 h de incubação com 0.5 mg/mL (CIM), não foi detectada alteração na permeabilidade da membrana conforme avaliado pela coloração celular diferencial com dois corantes de ácido nucleico. São necessários mais estudos para obter novos conhecimentos sobre os mecanismos de ação do óleo de copaíba.

O uso da combinação de terapias para tratamento de infecções causadas por microrganismos multi-resistentes a medicamentos é cada vez mais comum [29, 31, 35]. Os efeitos sinérgicos podem ser alcançados quando dois ou mais compostos afetam diferentes alvos ou interagem uns com os outros para melhorar a biodisponibilidade de um ou mais compostos [29]. Na verdade, a combinação de nanopartículas de prata com diferentes tipos de antimicrobianos tem sido amplamente investigada [29, 31, 35-37]. As nanopartículas de prata podem ser produzidas por métodos químicos, físicos ou biológicos. No entanto, as desvantagens de métodos químicos ou físicos residem principalmente no uso de solventes ou radiações e na geração de subprodutos tóxicos, que apresentam riscos potenciais para a saúde humana e meio ambiente. Essas características nocivas não foram observadas em processos biológicos que geralmente são simples, baratos e ecológicos [41].

Neste estudo, a nanopartícula apresentou um tamanho médio de 95 nm, foi carregada negativamente e exibiu um efeito antibacteriano dose-dependente contra células planctônicas e séssis de EGB, sozinho e em combinação com o óleo de copaíba. Os mecanismos de interação e modo de ação das nanopartículas de prata são complexos e multifatoriais em diferentes células procarióticas e eucarióticas [59]. O contato direto entre AgNPs e células alvo é crucial para aumentar a biodisponibilidade intracelular e a toxicidade de íons de prata [34, 36]. No entanto,

não está claro se primeiro as AgNPs entram na célula e liberam íons de prata, ou se estes se dissociam extracelularmente na proximidade da superfície da célula alvo e, em seguida, os íons de prata tornam-se biodisponíveis. No entanto, os dados da literatura indicam que o efeito antibacteriano das AgNPs depende de características diferentes, como tamanho, carga superficial e concentração [60], sendo Gram-positivos mais resistentes do que bactérias Gram-negativas [37]. Além disso, as nanopartículas positivamente carregadas são mais ativas nas bactérias Gram-positivas [30] e Gram-negativas [60]. A atividade bactericida dessas nanopartículas pode ser associada com danos diretos à parede celular e à membrana celular, afetando sua permeabilidade; reagindo com proteínas contendo enxofre, inibindo enzimas da cadeia respiratória; reagindo com ácidos nucleicos, prejudicando a replicação do DNA e gerando radicais altamente reativos [36].

Ivask et al. [33, 34] mostraram que a toxicidade de AgNPs (tamanho com variação de 10 a 80 nm) para *E. coli* é dependente da biodisponibilidade intracelular de íons de prata liberados pela dissolução de nanopartículas, que por sua vez é dependente do tamanho das nanopartículas. Por outro lado, a maior toxicidade de AgNPs menores que 10 nm, apresentou contato células-partículas mais eficiente, podendo também penetrar nas bactérias, resultando em maior biodisponibilidade de prata intracelular.

O uso combinado do óleo de copaíba com AgNPbio resultou em atividade antibacteriana sinérgica contra células planctônicas e crescimento de biofilme dos isolados de EGB. Fayaz et al. [29] relataram que o efeito antibacteriano da ampicilina aumenta quando combinada com AgNPs (tamanho variando de 5 a 40 nm) produzida através de metabolitos extracelulares do fungo *Trichoderma viride* contra bactérias Gram-positivas, efeito que pode ser explicado pela ruptura da parede celular mediada pelo antibiótico  $\beta$ -lactâmico, o que por sua vez, facilitaria a penetração das nanopartículas. Neste estudo, as imagens MEV de células de EGB planctônicas sugerem que ambos os compostos interferem com a permeabilidade da parede celular e da membrana bacteriana, causando um extravazamento pronunciado do conteúdo citoplasmático. Outra possibilidade é que o óleo de copaíba interfere com a permeabilidade da membrana, o que pode facilitar a entrada de íons de prata liberados pela dissolução de nanopartículas acumuladas nas superfícies bacterianas. Os íons intracelulares podem interagir com DNA e proteína,

interferindo nas funções celulares vitais. Em ambos, a combinação do óleo de copaíba e AgNPbio resulta em danos mais graves em EGB em um curto período de tempo. São necessários mais estudos para esclarecer o mecanismo de ação antibacteriano sinérgico de ambos os compostos.

Neste estudo, ambos os compostos foram citotóxicos para células epiteliais derivadas de carcinoma humano (HEp-2) em baixas concentrações comparadas com as concentrações bactericidas dos compostos isolados. Em contraste, as combinações sinérgicas de ambos os compostos reduziram o dano da linhagem celular de mamífero. De fato, além da atividade antimicrobiana, o óleo de copaíba e as nanopartículas de prata possuem atividade citotóxica seletiva em diferentes linhagens celulares cancerosas quando comparadas com células normais não cancerosas [26, 37, 39, 51, 58, 59]. Corroborando com estes dados, nenhuma hemólise de eritrócitos humanos foi observada nas concentrações testadas de ambos os compostos, incluindo as concentrações das interações sinérgicas.

O óleo de copaíba é usado na medicina popular para o tratamento de diferentes doenças e possui várias propriedades terapêuticas confirmadas por estudos farmacológicos e microbiológicos. De fato, vários dados descritos na literatura corroboram com a aplicação do óleo de copaíba de diferentes espécies de *Copaifera* em cuidados de saúde humana, tais como: tradicionalmente é usado para o tratamento da secreção de muco vaginal [18]; o óleo de copaíba inibiu seletivamente a proliferação de células estromais do endométrio em comparação com células normais endometriais *in vitro* [61]; o tratamento oral de camundongos com óleo de copaíba aumentou a sobrevivência de animais que exibiram sepse após a ligação e punção cecal [62] e reduziu significativamente o tamanho médio da lesão causado por *Leishmania amazonensis* [23]; estudos preliminares *in vivo* mostraram a segurança do creme vaginal tópico contendo óleo de copaíba em ratas grávidas [63]; e o óleo de copaíba não provocou toxicidade aguda após o tratamento oral, nem genotoxicidade ou mutagenicidade em camundongos [23, 39, 58].

Os resultados aqui apresentados mostraram que o óleo de copaíba pode ter um efeito benéfico no controle de infecções causadas por *S. agalactiae*. Da mesma forma, a ação sinérgica do óleo de copaíba com AgNPbio tanto no crescimento planctônico quanto sésil indica que esta combinação pode ser usada para desenvolver um promissor creme vaginal tópico para gestantes colonizadas e assim

prevenir a transmissão da bactéria para o recém-nascido. Os benefícios deste sinergismo também são importantes principalmente porque a efetiva concentração bactericida de óleo de copaíba e AgNPbio pode ser mais facilmente alcançada clinicamente, além de minimizar sua toxicidade. No entanto, apesar dos resultados deste estudo e da potente propriedade antimicrobiana das nanopartículas de prata descritas por outros autores, outros estudos adicionais são necessários para avaliar a segurança e a eficácia em formulações médicas.

## REFERENCES

- [1] Verani, J.R.; McGee, L.; Schrag, S.J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC. *MMWR. Recomm. Rep.*, **2010**, *59* (RR-10), 1-36.
- [2] Dagnew, A.F.; Cunnington, M.C.; Dube, Q.; Edwards, M.S.; French, N.; Heyderman, R.S.; Madhi, S.A.; Slobod, K.; Clemens, S.A. Variation in reported neonatal group B streptococcal disease incidence in developing countries. *Clin. Infect. Dis.*, **2012**, *55*(1), 91-102.
- [3] Berardi, A.; Rossi, C.; Lugli, L.; Creti, R.; Bacchi Reggiani, M.L.; Lanari, M.; Memo, L.; Pedna, M.F.; Venturelli, C.; Perrone, E.; Ciccina, M.; Tridapalli, E.; Piepoli, M.; Contiero, R.; Ferrari, F.; GBS Prevention Working Group, Emilia-Romagna. Groups B *Streptococcus* late-onset disease: 2003-2010. *Pediatrics*, **2013**, *131*(2), e361-368.
- [4] Crespo-Ortiz, Mdel. P.; Castañeda-Ramirez, C.R.; Recalde-Bolaños, M.; Vélez-Londoño, J.D. Emerging trends in invasive and noninvasive isolates of *Streptococcus agalactiae* in a Latin American hospital: a 17-year study. *BMC Infect. Dis.*, **2014**, *14*, 428.
- [5] Evangelista, M.L.; Freitas, F.T. Group B *Streptococcus* neonatal infection in an intensive care unit in Brazil: high fatality and missed opportunities for antibiotic prophylaxis. *Braz. J. Infect. Dis.*, **2015**, *19*(1), 98-99.
- [6] Joubrel, C.; Tazi, A.; Six, A.; Dmytruk, N.; Touak, G.; Bidet, P.; Raymond, J.; Trieu Cuot, P.; Fouet, A.; Kernéis, S.; Poyart, C. Group B *Streptococcus* neonatal invasive infections, France 2007-2012. *Clin. Microbiol. Infect.*, **2015**, *21*(10), 910-916.
- [7] Tibussek, D.; Sinclair, A.; Yau, I.; Teatero, S.; Fittipaldi, N.; Richardson, S.E.; Mayatepek, E.; Jahn, P.; Askalan, R. Late-onset group B streptococcal meningitis has cerebrovascular complications. *J. Pediatr.*, **2015**, *166*(5), 1187-1192.
- [8] MacFarquhar, J.K.; Jones, T.F.; Woron, A.M.; Kainer, M.A.; Whitney, C.G.; Beall, B.; Schrag, S.J.; Schaffner, W. Outbreak of late-onset group B *Streptococcus* in a neonatal intensive care unit. *Am. J. Infect. Control*, **2010**, *38*(4), 283-288.

- [9] Ivanova Georgieva, R.; García López, M.V.; Ruiz-Morales, J.; Martínez-Marcos, F.J.; Lomas, J.M.; Plata, A.; Nouredine, M.; Hidalgo-Tenorio, C.; Reguera, J.M.; De la Torre Lima, J.; Gálvez Aceval, J.; Márquez, M.; de Alarcón A.; Andalusian Group for the Study of Cardiovascular Infections of the Andalusian Society of Infectious Diseases SAEI. *Streptococcus agalactiae* left-sided infective endocarditis. Analysis of 27 cases from a multicentric cohort. *J. Infect.*, **2010**, *61*(1), 54-59.
- [10] Ikebe, T.; Chiba, K.; Shima, T.; Masuda, C.; Okuno, R.; Ohya, H.; Ogata, K.; Katsukawa, C.; Kawahara, R.; Tominaga, K.; Yabata, J.; Tada, Y.; Okabe, N.; Watanabe, H.; Chang, B.; Ogawa, M. Ohnishi, M.; Working group for beta-hemolytic streptococci in Japan. Evaluation of streptococcal toxic shock-like syndrome caused by group B *Streptococcus* in adults in Japan between 2009 and 2013. *J. Infect. Chemother.*, **2015**, *21*(3), 207-211.
- [11] Pimentel, B.A.; Martins, C.A.; Mendonça, J.C.; Miranda, P.S.; Sanches, G.F., Mattos-Guaraldi, A.L.; Nagao, P.E. *Streptococcus agalactiae* infection in cancer patients: a five-year study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **2016**, *35*(6), 927-933.
- [12] Seng, P.; Vernier, M. Gay, A.; Pinelli, P.O.; Legré, R. Stein, A. Clinical features and outcome of bone and joint infections with streptococcal involvement: 5-year experience of interregional reference centres in the south of France. *New microbes New Infect.*, **2016**, *12*, 8-17.
- [13] Heath, P.T. Status of vaccine research and development of vaccines for GBS. *Vaccine*, **2016**, *34*(26), 2876-2879.
- [14] Cheng, G.; Dai, M.; Ahmed, S.; Hao, H.; Wang, X.; Yuan, Z. Antimicrobial drugs in fighting against antimicrobial resistance. *Front. Microbiol.*, **2016**, *7*, 470.
- [15] Otter, J.A.; Vickery, K.; Walker, J.T.; deLancey Pulcini, E.; Stoodley, P.; Goldenberg, S.D.; Salkeld, J.A.; Chewins, J.; Yezli, S.; Edgeworth, J.D. Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. *J. Hosp. Infect.*, **2015**, *89*(1), 16-27.
- [16] Khan, M.S.; Lee, J. Novel strategies for combating pathogenic biofilms using plant products and microbial antibiois. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2015**, *17*(2), 126-140.
- [17] Abachi, S.; Lee, S.; Rupasinghe, H.P. Molecular mechanisms of inhibition of *Streptococcus* species by phytochemicals. *Molecules*, **2016**, *21*(2), pii: E215.
- [18] Veiga Junior VF, Pinto AC. O gênero *Copaifera* L. *Quim. Nova*, **2002**, *25*(2), 273-286.
- [19] Souza Barbosa, P.C.; Moreira Wiedemann, L.S.; da Silva Medeiros, R.; de Tarso Barbosa Sampaio, P.; Vieira, G., Florêncio da Veiga-Junior, V. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. *Chem. Biodivers.*, **2013**, *10*(7), 1350-1360.

- [20] Leandro, L.M.; Vargas, Fde.S.; Barbosa, P.C.; Neves, J.K.; da Silva, J.A.; da Veiga-Junior, V.F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. *Molecules*, **2012**, *17*(4), 3866-3889.
- [21] Santos, A.O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Veiga Junior, V.F.; Pinto, A.C.; Nakamura, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2008**, *103*(3), 277-281.
- [22] Mendonça, D.E.; Onofre, S.B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). *Braz. J. Pharmacogn.*, **2009**, *19*(2B), 577-581.
- [23] Santos, A.O.; Costa, M.A.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B.P.; da Veiga-Junior, V.F.; de Souza Lima, M.M.; Nakamura, C.V. *Leishmania amazonensis*: effects of oral treatment with copaiba oil in mice. *Exp. Parasitol.*, **2011**, *129*(2), 145-151.
- [24] Souza, A.B.; Martins, C.H.; Souza, M.G.; Furtado, N.A.; Heleno, V.C.; de Sousa, J.P.; Rocha, E.M.; Bastos, J.K.; Cunha, W.R.; Veneziani, R.C.; Ambrósio, S.R. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytother. Res.*, **2011**, *25*(2), 215-220.
- [25] Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Veiga, V.F.Jr., Pinto, A.C.; Nakamura, C.V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*(7), 2994-3001.
- [26] Abrão, F.; de Araújo Costa, L.D.; Alves, J.M.; Senedese, J.M.; de Castro, P.T.; Ambrósio, S.R.; Veneziani, R.C.; Bastos, J.K.; Tavares, D.C.; Martins, C.H. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. *BMC Complement. Altern. Med.*, **2015**, *15*, 443.
- [27] Guimarães A.L.; Cunha E.A.; Matias, F.O.; Garcia, P.G.; Danopoulos, P.; Swikidisa, R.; Pinheiro, V.A.; Nogueira, R.J. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera officinalis*) and pracaxi (*Pentaclethra macrobola*) oils against *Staphylococcus aureus*: importance in compounding for wound care. *Int. J. Pharm. Compd.*, **2016**, *20*(1), 58-62.
- [28] da Silva Moraes, T.; Leandro, L.F.; de Oliveira Silva L.; Santiago, M.B.; Souza A.B.; Furtado, R.A.; Tavares D.C.; Veneziani, R.C.; Ambrósio, S.R.; Bastos, J.K.; Martins, C.H. *In vitro* evaluation of *Copaifera oblongifolia* oleoresin against bacteria causing oral infections and assessment of its cytotoxic potential. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2016**, *17*(10):894-904.
- [29] Fayaz, A.M.; Balaji, K.; Girilal, M.; Yadav, R.; Kalaichelvan, P.T.; Venketesan, R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Nanomedicine*, **2010**, *6*(1), 103-109.

- [30] El Badawy, A.M.; Silva, R.G.; Morris, B.; Scheckel, K.G.; Suidan, M.T.; Tolaymat, T.M. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.*, **2011**, *45*(1), 283-287.
- [31] Cardozo, V.F.; Oliveira, A.G.; Nishio, E.K.; Perugini, M.R.; Andrade, C.G.; Silveira, W.D.; Durán, N.; Andrade, G.; Kobayashi, R.K.; Nakazato, G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **2013**, *12*, 12.
- [32] Ishida, K.; Cipriano, T.F.; Rocha, G.M.; Weissmüller, G.; Gomes, F.; Miranda, K.; Rozental, S. Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2014**, *109*(2), 220-228.
- [33] Ivask, A.; Kurvet, I.; Kasemets, K.; Blinova, I.; Aruoja, V.; Suppi, S.; Vija, H.; Kakinen, A.; Titma, T.; Heinlaan, M.; Visnapuu, M.; Koller, D.; Kisand, V.; Kahru, A. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells *in vitro*. *PLoS One*, **2014**, *9*(7), e102108.
- [34] Ivask, A.; Elbadawy, A.; Kaweeteerawat, C.; Boren, D.; Fischer, H.; Ji, Z.; Chang, C.H.; Liu, R.; Tolaymat, T.; Telesca, D.; Zink, L.I.; Cohen, Y.; Holden, P.A.; Godwin, H.A. Toxicity mechanisms in *Escherichia coli* vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver. *ACS Nano.*, **2014**, *8*(1), 374-386.
- [35] Perugini Biasi-Garbin, R.; Otaguiri, E.S.; Morey, A.T.; Fernandes da Silva, M.; Belotto Morguette, A.E.; Armando Contreras Lancheros, C.; Kian, D.; Perugini, M.R.; Nakazato, G.; Durán, N.; Nakamura, C.V.; Yamauchi, L.M.; Yamada-Ogatta, S.F. Effect of eugenol against *Streptococcus agalactiae* and synergistic interaction with biologically produced silver nanoparticles. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2015**, *2015*, 861497.
- [36] Durán, N.; Durán, M.; de Jesus, M.B.; Seabra, A.B.; Fávaro, W.J.; Nakazato, G. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine*, **2016**, *12*(3), 789-799.
- [37] Scandorieiro, S.; Camargo, L.C.; Lancheros, C.A.C.; Yamada-Ogatta, S.F.; Nakamura, C.V.; Oliveira, A.G.; Andrade, C. G. T. J.; Duran, N.; Nakazato, G.; Kobayashi, R.K.T. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains, *Front. Microbiol.*, **2016**, *7*, 760.
- [38] Otaguiri, E.S.; Morguette, A.E.; Tavares, E.R.; dos Santos, P.M.; Morey, A.T.; Cardoso, J.D.; Perugini, M.R.; Yamauchi, L.M.; Yamada-Ogatta, S.F. Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. *BMC Microbiol.*, **2013**, *13*, 297.
- [39] Veiga Junior, V.F.; Rosas, E.C.; Carvalho, M.V.; Henriques, M.G.; Pinto, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera*

*cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - a comparative study. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, 112(2), 248-254.

[40] Ahmad, A.; Mukherjee, P.; Senapati, S.; Mandal D.; Khan, M.I.; Kumar, R.; Sastry, M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2003**, 28(4), 313-318.

[41] Durán, N.; Marcato, P.D.; Alves, O.L.; Souza, G.I.; Esposito, E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J. Nanobiotechnology*, **2005**, 3, 8.

[42] Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fourth Informational Supplement. Document M100-S24, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA: CLSI, **2014**.

[43] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved Guideline. Document M26-A, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, **1999**.

[44] Miles, A.A.; Misra, S.S.; Irwin, J.O. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg. (Lond)*, **1938**, 38(6), 732-749.

[45] 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**, 101(3), 677-682.

[46] Shafreen, R.M.; Srinivasan, S.; Manisankar, P.; Pandian, S.K. Biofilm formation by *Streptococcus pyogenes*: modulation of exopolysaccharide by fluoroquinolone derivatives. *J. Biosci. Bioeng.*, **2011**, 112(4), 345-350.

[47] Moody, J. A. Synergism testing. Broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*; H.D. Isenberg, Ed.; American Society for Microbiology, Washington, DC, **1991**; Vol. 1, pp. 5.18.1–5.18.28.

[48] Odds, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2003**, 52(1), 1.

[49] Varaldo, P.E.; Montanari, M.P.; Giovanetti, E. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in *streptococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2009**, 53(2), 343-353

[50] Kirby, B.J.; Hasselbrink, E.F.Jr. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis*, **2004**, 25(2), 187-202.

[51] Lima, R.; Seabra, A.B.; Durán, N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.*, **2012**, 32(11), 867-879

- [52] Dutra, V.G.; Alves, V.M.; Olendzki, A.N.; Dias, C.A.; de Bastos, A.F.; Santos, G.O.; de Amorim E.L.; Sousa M.Â.; Santos, R.; Ribeiro, P.C.; Fontes, C.F.; Andrey, M.; Magalhães, K.; Araujo, A.A.; Paffadore, L.F.; Marconi, C.; Murta, E.F.; Fernandes, P.C. Jr; Raddi, M.S.; Marinho, P.S.; Bornaia, R.B.; Palmeiro, J.K., Dalla-Costa, L.M.; Pinto, T.C.; Botelho, A.C.; Teixeira, L.M.; Fracalanza, S.E. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *BMC Infect. Dis.*, **2014**, *14*, 323.
- [53] Bolukaoto, J.Y.; Monyama, C.M.; Chukwu, M.O.; Lekala, S.M.; Nchabeleng, M.; Maloba, M.R.; Mavenyengwa, R.T.; Lebelo, S.L., Monokoane, S.T. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa. *BMC Res. Notes*, **2015**, *8*, 364.
- [54] Barros, R.R.; de Souza A.F.; Luiz F.B. Polyclonal spread of *Streptococcus agalactiae* resistant to clindamycin among pregnant women in Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2016**, *71*(7), 2054-2056.
- [55] D'Urzo, N.; Martinelli, M.; Pezzicoli, A.; De Cesare, V.; Pinto, V.; Margarit, I.; Telford, J.L.; Maione, D.; Members of the DEVANI Study Group. Acidic pH strongly enhances in vitro biofilm formation by a subset of hypervirulent ST-17 *Streptococcus agalactiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2014**, *80*(7), 2176-2185.
- [56] Olson, M.E.; Ceri, H.; Morck, D.W.; Buret, A.G.; Read, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotic. *Can. J. Vet. Res.*, **2002**, *66*(2), 86-92.
- [57] Cascon, V.; Gilbert, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry*, **2000**, *55*(7), 773-778.
- [58] Lima, S.R.; Junior, V.F.; Christo, H.B.; Pinto, A.C.; Fernandes, P.D. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother. Res.*, **2003**, *17*(9), 1048-1053.
- [59] Zhang, X.F.; Shen, W.; Gurunathan, S. Silver nanoparticle-mediated cellular responses in various cell lines: an *in vitro* model. *Int. J. Mol. Sci.*, **2016**, *17*(10), pii: E1603.
- [60] Silva, T.; Pokhrel, L.R.; Dubey, B.; Tolaymat, T.M.; Maier, K.J.; Liu, X. Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: comparison between general linear model-predicted and observed toxicity. *Sci. Total Environ.*, **2014**, *468-469*, 968-976.
- [61] Henriques da Silva, J.; Borges, V.R.; Pereira Lda. C.; Ferrari, R.; de Mattos, R.M.; Barros, E.G.; Palmero, C.Y.; Fernandes, P.D.; de Carvalho, P.R.; Pereira de Sousa, V.; Cabral, L.M.; Nasciutti, L.E. The oil-resin of the tropical rainforest tree *Copaifera langsdorffii* reduces cell viability, changes cell morphology and induces cell death in human endometriotic stromal cultures. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2015**, *67*(12), 1744-1755.

[62] Botelho, N.M.; Silveira, E.L.; Lopes, L.N.; Santos, F.A.; Teixeira, R.K.; da Silva, T.T. Copaiba oil effect under different pathways in mice subjected to sepsis. *Acta Cir. Bras.*, **2014**, 29(8), 528-531.

[63] Lima, C.S.; de Medeiros, B.J.; Favacho H.A.; dos santos K.C.; de Oliveira B.R.; Taglialegna J.C.; da Costa E.V.; de Campos K.J.; Carvalho J.C. Pre-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). *Phytomedicine*, **2011**, 18(12), 1013-1023.

## 7. CONCLUSÃO

Na padronização do multiplex PCR em tempo real as condições de amplificação para a detecção simultânea de genes de identificação e resistência a antimicrobianos apresentaram uma temperatura ideal de anelamento de 67 °C.

Foram obtidos sinais de amplificação para todos os isolados de EGB, incluindo cinco sorotipos capsulares diferentes, sem apresentar reação cruzada entre microrganismos não-EGB.

O desempenho do teste de PCR em multiplex em tempo real foi analisado em esfregaços vaginais e retais obtidos de 68 mulheres grávidas, no qual a prevalência de colonização de EGB entre a população estudada foi de 15.7% (16/102) com base em uma cultura positiva e os resultados de PCR em tempo real multiplex.

Baseado nos resultados da cultura como referência a sensibilidade e especificidade da reação de PCR multiplex em tempo real obtida foi de 91.7% (11/12, CI 59.7-99.6%) e 95.5% (86/90, CI 89.8-98.7%), respectivamente. Quatro amostras positivas por PCR multiplex em tempo real foram negativas pelo método de cultura, e uma amostra negativa por PCR multiplex em tempo real foi positiva pelo método de cultura.

O PCR multiplex em tempo real é um ensaio rápido, acessível e sensível adequado para a detecção direta da colonização de EGB e seus marcadores de resistência à eritromicina/clindamicina. O presente teste molecular tem potencial de uso durante o período pré-parto, principalmente para gestantes sem resultado de triagem pré-natal.

Quanto aos valores da CIM do óleo de copaíba para todos os isolados de EGB variaram de 0,12 a 0,5 mg/mL, sendo os valores de CBM para a maioria dos isolados de 2x a CIM, indicando um efeito bactericida do óleo de copaiba em EGB, compatível com a análise das curvas de morte, nos quais não foram detectadas células viáveis após 24 h de tratamento na concentração 2xCIM.

Na avaliação por microscopia observou-se alterações morfológicas e ultraestruturais nos isolados de EGB tratados com óleo de copaíba exibindo ruptura da parede celular e a diminuição da densidade de elétrons devido ao vazamento de conteúdo citoplasmático.

A adição do óleo de copaíba no início da formação de biofilme diminuiu a atividade metabólica das células sésseis de todas os isolados de EGB, e esse efeito pareceu ser dose dependente.

Além disso, a combinação do óleo de copaíba com AgNPbio reduziu a atividade metabólica de células planctônicas e inibiu a formação do biofilme de isolados de EGB, mantendo nas concentrações sinérgicas avaliadas viabilidade de células de mamífero aproximada de 80 – 90%. Deste modo, os resultados aqui apresentados reforçam que a ação sinérgica do óleo de copaíba com AgNPbio possuem efeito promissor para desenvolvimento de um creme vaginal tópico para gestantes colonizadas, a fim de se prevenir a transmissão da bactéria para o recém-nascido.

## ANEXO

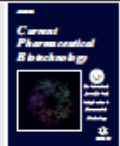
**ARTIGO 2** - OTAGUIRI, E. S. et al. Antibacterial combination of oleoresin from *Copaifera multijuga* Hayne and biogenic silver nanoparticles towards *Streptococcus agalactiae*. *Current pharmaceutical biotechnology*, v.18, p. 177-190, 2017.

*Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2017, 18, 177-190

## RESEARCH ARTICLE



### Antibacterial Combination of Oleoresin from *Copaifera multijuga* Hayne and Biogenic Silver Nanoparticles Towards *Streptococcus agalactiae*



Eliane S. Otaguiri<sup>1</sup>, Ana E.B. Morguette<sup>1</sup>, Renata P. Biasi-Garbin<sup>1</sup>, Alexandre T. Morey<sup>1</sup>, César A.C. Lancheros<sup>1</sup>, Danielle Kian<sup>1</sup>, Admilton G. de Oliveira Jr<sup>1</sup>, Gilselena Kerbauy<sup>2</sup>, Marcia R.E. Perugini<sup>3</sup>, Nelson Durán<sup>4</sup>, Celso V. Nakamura<sup>5</sup>, Valdir F. da Veiga Junior<sup>6</sup>, Gerson Nakazato<sup>7</sup>, Phileo Pinge-Filho<sup>7</sup>, Lucy M. Yamauchi<sup>1</sup> and Sueli F. Yamada-Ogatta<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil; <sup>2</sup>Departamento de Enfermagem, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil; <sup>3</sup>Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil; <sup>4</sup>Departamento de Físico-Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil; <sup>5</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil; <sup>6</sup>Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil; <sup>7</sup>Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

**Abstract: Background:** *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus* - GBS) remains a leading cause of neonatal infections and an important cause of invasive infections in adults with underlying conditions.

**Methods:** This study evaluated for the first time the effect of an oleoresin collected from *Copaifera multijuga* Hayne (copaiba oil) alone or in combination with silver nanoparticles produced by green synthesis using *Fusarium oxysporum* (AgNPbio) against planktonic and sessile cells of GBS isolated from colonized women.

**Results:** Copaiba oil showed a dose-dependent bactericidal activity against planktonic GBS strains, including those resistant to erythromycin and/or clindamycin. Scanning and transmission electron microscopy of GBS treated with copaiba oil revealed morphological and ultrastructural alterations, displaying disruption of the cell wall and decreased electron density due to leakage of cytoplasmic content. Copaiba oil also exhibited antibacterial activity against biofilms of GBS strains, inhibiting their formation as well as the viability of mature biofilms. In addition, the combination of copaiba oil with AgNPbio resulted in a synergistic effect against planktonic cells and biofilm formation, reducing the minimal inhibitory concentration values of both compounds. No hemolytic activity was detected for both compounds.

**Conclusion:** These results indicate the potential of copaiba oil, alone or in combination with AgNPbio, for the development of new alternative strategies for controlling GBS infections.

## ARTICLE HISTORY

Received: September 04, 2016  
Revised: November 11, 2016  
Accepted: November 28, 2016

DOI:  
10.2174/1389201017666161213151919

**Keywords:** Group B *Streptococcus*, clindamycin and erythromycin resistance, copaiba oil, biological silver nanoparticles, *Fusarium oxysporum*, antimicrobial synergism, biofilm.