



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ELIANE SAORI OTAGUIRI

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE  
*STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* ISOLADOS DE PACIENTES  
ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE  
LONDRINA, PARANÁ**

ELIANE SAORI OTAGUIRI

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE  
*STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* ISOLADOS DE PACIENTES  
ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE  
LONDRINA, PARANÁ**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, tendo como objetivo a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sueli Fumie Yamada Ogatta  
Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Regina Eches Perugini

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca  
Central da Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

O87c Otaguiri, Eliane Saori.

Caracterização fenotípica e molecular de *Streptococcus agalactiae* isolados de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Londrina, Paraná / Eliane Saori Otaguiri. – Londrina, 2013.  
58 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Coorientador: Marcia Regina Eches Perugini.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Estreptococo – Teses. 2. Bactérias gram-positivas – Teses. 3. Genética bacteriana – Teses. 4. Virulência (Microbiologia) – Teses. 5. Drogas – Resistência em microorganismos – Teses. I. Ogatta, Sueli Fumie Yamada. II. Perugini, Marcia Regina Eches. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579.862

ELIANE SAORI OTAGUIRI

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE  
*STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* ISOLADOS DE PACIENTES  
ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE  
LONDRINA, PARANÁ**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, tendo como objetivo a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Gerson Nakazato  
UNIFESP – São Paulo – SP

---

Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 21 de Maio de 2013.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço 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, 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, por todo o incentivo e companhia desde a minha graduação.

Aos professores Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> Gerson Nakazato e Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> Sérgio Paulo Dejato da Rocha pelo auxílio, participação do meu pré-projeto, qualificação, defesa e pelos momentos de descontração.

À professora Lucy Megumi Yamauchi Lioni pelos conselhos e sugestões que contribuíram muito para o desenvolvimento do meu projeto.

Às professoras Marsileni Pelisson, Eliana Carolina Vespero e Floristher Elaine Carrara-Marroni, pela companhia e por toda a ajuda no projeto. Agradeço também à todos os funcionários do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário, pelo auxílio e companhia.

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

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

À todos do NIP3, pelo empréstimo de reagentes e pela companhia. Ao Juan Josue Puño Sarmiento, pela companhia e ajuda no meu projeto.

Ao Laboratório de Virologia pela ajuda no desenvolvimento do projeto.

Aos meus queridos pais, meu irmão e meu namorado, pelo infinito apoio, meu eterno agradecimento.

OTAGUIRI, Eliane Saori. **Caracterização fenotípica e molecular de *Streptococcus agalactiae* isolados de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Londrina**. 2013. 58f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

*Streptococcus agalactiae*, pertencente ao grupo B de Lancefield (EGB - estreptococo do grupo B), normalmente reside como um microrganismo comensal no trato gastrointestinal e geniturinário do homem. Entretanto, esta bactéria possui a capacidade de acessar vários nichos, como o compartimento intra-uterino ou de outros órgãos, o que mostra sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes durante o curso da infecção. Esta adaptação ocorre devido a expressão de fatores de virulência que estão envolvidos com a sobrevivência, invasão e persistência bacteriana no hospedeiro. No Brasil, a descrição de fatores de virulência de EGBs isolados de humanos ainda é limitada. Assim este trabalho teve como objetivo caracterizar EGB isolados de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Londrina de Março à Setembro de 2012, quanto ao tipo de antígeno capsular, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e investigar a ocorrência de determinantes de virulência. Os tipos capsulares Ia, II, III e V foram identificados na maioria dos EGBs. Somente um isolado foi classificado como tipo IX e não foi possível classificar um isolado de acordo com a metodologia utilizada. Todos isolados foram sensíveis a penicilina, ampicilina, cefepime, cefotaxima, cloranfenicol, levifloxacino e vancomicina. Resistência a eritromicina e clindamicina foi observado em 19,3% e 13,3% dos isolados, respectivamente. Todos isolados resistentes a clindamicina (n=11) foram concomitantemente resistentes a eritromicina e estavam distribuídos nos tipos capsulares III e V. Somente um isolado apresentou fenótipo cMLSB e concentração inibitória mínima de 8 µg/ml para eritromicina e clindamicina. O gene *ermA* sozinho ou em combinação com o gene *ermB* foi o mecanismo de resistência a eritromicina mais prevalente entre esses isolados. Os isolados resistentes somente a eritromicina (n=5) pertenciam ao tipo Ia, apresentaram o fenótipo M e mecanismo de resistência ao antibacteriano era mediado pelo gene *mefA*. Todos isolados apresentaram os genes *cylE* e *hylB*. Entretanto 4,8% dos isolados foram classificados como gama-hemolíticos em meio contendo sangue desfibrinado de carneiro e não produtores do pigmento carotenóide no meio bifásico Granada, assim como 18,1% não foram capazes de produzir hialuronidase *in vitro*. Pelo menos uma variante de *pilus*, PI-1, PI-2a ou PI-2b, foi detectado entre os isolados. Todos isolados foram capazes de aderir em células HeLa e formar biofilme em superfície de poliestireno. Nossos resultados mostraram o potencial de virulência de isolados de EGB e a caracterização de antígenos de superfície, como o *pilus* e antígenos capsulares, o que pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para prevenção e tratamento de infecções por EGB.

**Palavras chave:** *Streptococcus* do grupo B. Antígeno capsular. Eritromicina. Clindamicina. Fatores de virulência.

OTAGUIRI, Eliane Saori. **Phenotypic and molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates from patients treated at the University Hospital of Londrina**. 2013. 58f. Dissertation (Masters in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2013.

## ABSTRACT

*Streptococcus agalactiae*, belonging to Lancefield group B (GBS - Group B *Streptococcus*) is a commensal microorganism in the human gastrointestinal and genitourinary tracts. However, this bacterium has the ability to access various niches, such as the intrauterine compartment or other organs, which reflects its adaptability to different environments during the course of infection. This adaptation is due to expression of virulence factors that are involved with survival, invasion and bacterial persistence in the host. In Brazil, the knowledge of virulence factors among EGBs isolated from humans is still limited. Thus, this study aimed to characterize GBS isolates from patients attended at the University Hospital of Londrina from March to September 2012, regarding the capsular typing, antimicrobial susceptibility profile and to investigate the occurrence of virulence determinants. The capsular types Ia, II, III and V have been identified in most EGBs. Only one isolate was classified as type IX and it was not possible to classify an isolate according to the methodology used in this study. All isolates were susceptible to penicillin, ampicillin, cefepime, cefotaxime, chloramphenicol, levofloxacin and vancomycin. Resistance to erythromycin and clindamycin was observed in 19.3% and 13.3% of isolates, respectively. All isolates resistant to clindamycin (n = 11) were simultaneously resistant to erythromycin and were distributed in the capsular types III and V. Only one isolate showed cMLS<sub>B</sub> phenotype and minimum inhibitory concentration of 8 µg/ml for erythromycin and clindamycin. The mechanism of resistance to erythromycin more prevalent among these isolates was mediated by gene *ermA* alone or in combination with the gene *ermB*. The isolates displaying resistance only to erythromycin (n = 5) belonged to capsular type Ia, and presented the M phenotype, which was mediated by *mefA* gene. All isolates harbored the genes and *cylE* and *hylB*. However 4.8% of the isolates were classified as gamma-hemolytic and carotenoid pigment non-producer in medium containing defibrinated sheep blood or biphasic medium Granada, respectively, and 18.1% were unable to produce hyaluronidase *in vitro*. At least one *pilus* variant, PI-1, PI-2a or PI-2b was detected between isolates. All strains were able to adhere to HeLa cells and to form biofilms on polystyrene surface. Our results indicate the potential virulence of GBS isolates and the distribution of surface antigens such as capsular antigens and *pili*, which may contribute to the development of new strategies for prevention and treatment of GBS infection.

**Keywords:** Group B *Streptococcus*. Capsular antigen. Erythromycin. Clindamycin. Virulence determinants.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

**Table 1** – Description of primers used in PCR for the detection of virulence markers and erythromycin-resistance genes of *Streptococcus agalactiae* ..... 34

**Table 2** – Distribution of capsular type, erythromycin resistance profiles and virulence traits among GBS recovered from women of reproductive age attended at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil ..... 36

### ARTIGO 2

**Tabela 1** – Sequência de oligonucleotídeos para detecção de genes que codificam variantes de *pili* de EGB ..... 46

**Tabela 2** – Distribuição dos tipos capsulares e ilha de *pilus* de 92 isolados de *Streptococcus agalactiae* de pacientes do Hospital Universitário de Londrina..... 49



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	9
1.1	<i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> .....	9
1.2	<i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> EM GESTANTE .....	9
1.3	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS .....	12
1.3.1	Penicilina .....	12
1.3.2	Macrolídeos, Lincosamidas, Streptogramina B .....	12
1.3.3	Tetraciclina .....	13
1.4	FATORES DE VIRULÊNCIA .....	13
1.4.1	Fatores que Contribuem para Injúria do Tecido do Hospedeiro .....	14
1.4.1.1	Gene <i>cylE</i> e expressão de $\beta$ -hemolisina/citolisina .....	14
1.4.1.2	Gene <i>cfb</i> e expressão do fator CAMP .....	15
1.4.1.3	Gene <i>hylB</i> e atividade da hialuronato liase .....	15
1.4.2	Fatores que Contribuem para Evasão das Defesas do Hospedeiro .....	16
1.4.2.1	Gene <i>cylE</i> e pigmento carotenóide avermelhado .....	16
1.4.2.2	Cápsula polissacarídica e tipagem molecular .....	17
1.4.3	Pili Tipo PI-1, PI-2a, PI-2b, Adesão e Formação de Biofilme .....	17
1.5	ESTUDOS EM BIOLOGIA MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE EGB .....	19
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	21
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	22
<b>4</b>	<b>ARTIGO 1</b> .....	29
	<b>Characterization of <i>Streptococcus agalactiae</i> Isolated from Patients Attended at University Hospital of Londrina, Paraná</b> .....	29
	<b>Abstract</b> .....	29
	<b>Introduction</b> .....	30
	<b>Materials and Methods</b> .....	31
	<b>Results</b> .....	34
	<b>Discussion</b> .....	37

	<b>Acknowledgements</b> .....	39
	<b>Reference</b> .....	39
<b>5</b>	<b>ARTIGO 2</b> .....	43
	<b>Distribuição de <i>Pili</i> e Associação entre Adesão em Células HeLa e Formação de Biofilme em <i>Streptococcus agalactiae</i> Isolados de Microbiota Humana</b> .....	43
	<b>Materiais e Métodos</b> .....	44
	<b>Resultados</b> .....	48
	<b>Discussão</b> .....	50
	<b>Referência Bibliográfica</b> .....	52
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	55
	<b>ANEXO</b> .....	56

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

*Streptococcus agalactiae*, pertencente ao grupo B de Lancefield (EGB - estreptococo do grupo B), é um coco Gram-positivo, beta-hemolítico, embora uma pequena porcentagem não produza hemólise. Possui uma cápsula formada por um polissacarídeo muito rico em ácido siálico, sendo que o tipo de molécula permite sua classificação em 10 diferentes tipos capsulares [Ia, Ib, II-IX (SLOTVED et al., 2007)]. Pode ser encontrado na microbiota humana, colonizando principalmente o trato gastrointestinal e geniturinário (MCCORD et al., 2001), porém, é um patógeno importante que pode causar meningite, septicemia e infecções invasivas, principalmente em recém-nascidos, além de morte fetal (RADTKE et al., 2010).

### 1.2 *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM GESTANTES

Além dos recém-nascidos, EGB pode causar doenças em gestantes, adultos não-gestantes, idosos e pacientes imunocomprometidos (SCHRAG et al., 2000; SCHUCHAT, 1999; SKOFF et al., 2009). Em mulheres durante a gravidez ou no período pós-parto, a colonização do trato genital com EGB geralmente é assintomática, mas é estimado que 7% das gestantes têm títulos significantes na urina (MULLER et al., 2006), podendo haver manifestações clínicas que incluem infecções do trato urinário, corioamnionite, infecções associadas à cesariana ou episiotomia, sepsis puerperal e, ocasionalmente, meningite, tromboflebite séptica, ou outras complicações (SCHRAG et al., 2000).

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 com duração superior a 18 horas e antecedente de neonato acometido por EGB, aumenta significativamente a incidência de infecção neonatal por essa bactéria (BOYER et al., 1983; WOOD; DILLON, 1981).

A infecção em recém-nascidos pode ser classificada como doença neonatal de início precoce (EOD - *early-onset disease*) ou de início tardio (LOD - *late-onset disease*). No primeiro caso, a colonização vaginal materna está fortemente associada ao desenvolvimento da doença, cuja evolução ocorre nas primeiras 24 horas até o 7º dia pós-nascimento. As principais manifestações clínicas são sepse e pneumonia graves, e em menor

frequência, meningite (SCHUCHAT, 1999). A doença de início tardio ocorre após o 7º dia até 3 meses e caracteriza-se pela presença de bacteremia com alto risco de evolução para meningite (POYART et al., 2008). Ao contrário da doença de início precoce, a aquisição de EGB nem sempre ocorre por transmissão vertical, podendo ser adquirida a partir de fontes ambientais contaminadas (MACFARQUHAR et al., 2010; MULLANEY, 2001) ou leite materno (GODAMBE; SHAH; SHAH, 2005). Na ausência de medidas de prevenção da transmissão de EGB, 1 a 2% dos recém-nascidos colonizados durante o parto podem desenvolver infecção precoce (BOYER; GOTOFF, 1985; VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010) associado a alta taxa de mortalidade. Aqueles que sobrevivem à infecção podem desenvolver sequelas neurológicas graves (EMBLETON; WARIYAR; HEY, 1999; LUKACS; SCHOENDORF; SCHUCHAT, 2004; MIURA; MARTIN, 2001; SAMESHIMA et al., 2008).

Durante as últimas duas décadas, têm sido propostas iniciativas importantes para se prevenir doenças neonatais ocasionadas pela colonização da gestante por EGB. Estas foram primeiramente promovidas nos EUA e posteriormente adaptadas e traduzidas para diretrizes nacionais em alguns países europeus. No final de 1980, ensaios clínicos mostraram que a doença precoce por EGB poderia ser evitada pela administração de profilaxia antibacteriana durante o trabalho de parto em mulheres colonizadas (BOYER; GOTOFF, 1986; SCHUCHAT, 1999). Em 2002, após um amplo estudo mostrando a eficácia da cultura para triagem de *Streptococcus agalactiae* entre a 35ª e 37ª semana de gestação, o *Center for Disease Control and Infection* (CDC) recomendou este procedimento para todas as gestantes com o objetivo de estabelecer a antibioticoterapia profilática intraparto para as mulheres colonizadas com EGB. Com a implementação dessas orientações houve uma diminuição de 27% na ocorrência de infecção precoce em recém-nascidos, de 0,47 para 0,34 casos por 1.000 nascidos vivos (VERANI et al., 2010; VERANI; SCHRAG, 2010).

Atualmente, a estratégia pré-natal para detecção da colonização por EGB é baseada em cultura. Um dos problemas associado a esta ferramenta de diagnóstico é a indisponibilidade de resultados para gestantes em parto prematuro ou que não tiveram cuidado pré-natal (SCHRAG, 2004). Além disso, a cultura direta de *swabs* produz falso-negativo (CDC, 1996). Deste modo na triagem por cultura é necessária, para a detecção de EGB, incubação em caldo seletivo de enriquecimento LIM por 24 horas (JONES et al., 1983; LIM et al., 1986), seguido por subcultura em ágar sangue (SCHRAG et al., 2002), exigindo até 72 horas para a liberação do resultado.

Baseado em estudos de fatores de riscos, algumas gestantes recebem antibióticos de forma profilática pelo alto risco de transmissão vertical, entretanto o uso generalizado de antibióticos pode estar associado com anafilaxia materna (WEISS; ADKINSON, 1988) e seleção de cepas resistentes de *Escherichia coli* (EDWARDS et al., 2003; MORALES et al., 1999; TOWERS et al., 1998), sem mencionar os custos econômicos. Como a colonização vaginal por EGB pode ser intermitente, os cultivos realizados antes do parto não são absolutamente confiáveis para predizer o estado da portadora no momento do parto (LIN et al., 2011), deste modo outra desvantagem relatada é a possibilidade de mulheres negativas para EGB no pré-natal se tornarem positivas durante o parto (PUOPOLO; MADOFF; EICHENWALD, 2005). Estas gestantes não recebem profilaxia intraparto, deste modo, nestes casos, os recém-nascidos estão propensos a contrair o EGB (VAN DYKE et al., 2009).

Estudos regionais epidemiológicos realizados no Brasil mostram que a taxa de colonização de gestantes por EGB varia entre 5 a 30% (COSTA et al., 2008; LINHARES et al., 2011; NOMURA et al., 2009; SIMOES et al., 2007). Entretanto estudos sobre a incidência de infecção neonatal por EGB nos hospitais brasileiros são raros. Um trabalho realizado em um hospital de São Paulo (abril de 1991 a março de 2000), em gestantes que não foram monitoradas em relação a colonização por EGB, mostrou que a incidência da doença de início precoce foi de 0,39/1.000 nascidos vivos e taxa de mortalidade de 60% (VACIOTO et al., 2002). Costa et al. (2010) avaliaram os resultados de infecção neonatal por EGB após implantação das diretrizes preconizadas pelo CDC (2002) em um hospital do Rio de Janeiro (janeiro de 2003 a dezembro de 2006). A colonização por EGB foi detectada em 4,7% das gestantes, sendo que 38,4% receberam conduta correta quanto a realização de antibioticoterapia profilática intraparto (API); 4,8% não receberam API pois foram submetidas a cesárea; 36% receberam API de forma incorreta e 20,8% não apresentaram prescrição de API em seus prontuários. Infecção precoce por EGB foi observada em 7,3% e 16,7% dos recém-nascidos de gestantes que receberam conduta correta e incorreta em relação à API, respectivamente.

Embora seja uma preocupação crescente entre os diferentes profissionais de saúde ligados a esse tema, no Brasil não há um consenso a respeito de medidas profiláticas para redução da incidência de infecção neonatal por EGB. O Controle de Infecção em Serviços de Saúde da ANVISA em seu documento sobre Definições dos Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à Saúde (IRAS) em Neonatologia dentre vários critérios, também, define a colonização materna por EGB, sem profifaxia intraparto quando indicada, como fator

de risco para infecção neonatal precoce (ANVISA, 2008). Cabe à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) de cada instituição promover e monitorar ações sistemáticas que visem à redução máxima possível da incidência e gravidade das IRAS (Portaria n.º. 2616/MS/GM – 12/05/1998). Portanto, para a implantação de uma estratégia de prevenção de infecção neonatal, é primordial o estudo clínico randomizado dos indicadores de resultados (neste caso, taxa de infecção neonatal por EGB) antes e após o uso das medidas profiláticas.

### 1.3 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

#### 1.3.1 Penicilina

A penicilina e ampicilina são fármacos de escolha para o tratamento de infecções causadas por estreptococos  $\beta$ -hemolíticos. Testes de sensibilidade para as penicilinas e outros  $\beta$ -lactâmicos, aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de infecções causadas por estreptococos  $\beta$ -hemolíticos, não precisam ser realizados rotineiramente, pois isolados com sensibilidade reduzida a esses antibióticos apresentam CIM para penicilina  $> 0,12$  e/ ou CIM para ampicilina  $> 0,25$  mg / mL são extremamente raros (CLSI, 2012). No entanto, estudos indicam redução da sensibilidade à penicilina, desde 1994, sendo que o acúmulo de mutações nas proteínas de ligação à penicilina PBP1, PBP2b e PBP2x, que participam da biossíntese da parede celular, são as mais descritas (BETRIU et al., 1994; DE AZAVEDO et al., 2001; GAUDREAU et al., 2010; KIMURA et al., 2008; NAGANO et al., 2009; NAGANO et al., 2008).

#### 1.3.2 Macrolídeos, Lincosamidas e Streptogramina B

Devido à crescente taxa de resistência a eritromicina em muitos países (ACIKGOZ et al., 2004; BORCHARDT et al., 2006; GHERARDI et al., 2007), a eritromicina anteriormente recomendada para profilaxia intraparto deixou de ser uma alternativa aceitável, sendo utilizada apenas a clindamicina para a profilaxia intraparto em gestantes alérgicas à penicilina e com alto risco para anafilaxia (VERANI et al., 2010). Os mecanismos de resistência à macrolídeos mais comuns em *Streptococcus* spp. são: a) metilação pós-transcricional dos resíduos de adenina presentes no RNA ribossomal 23S (WEISBLUM, 1985) por uma metilase codificada pelo gene *erm*, tais como *ermB*, *ermA* (subclasse *ermTR*) ou *ermC*. A expressão desse gene é descrita como fenótipo  $MLS_B$ , responsável por gerar

resistência cruzada a macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B, podendo ser constitutiva (cMLS<sub>B</sub>), bem como indutiva (iMLS<sub>B</sub>) (FINES et al., 2001; GIOVANETTI et al., 1999; LECLERCQ, 2002). b) por efluxo do antimicrobiano mediado por uma proteína ligada à membrana codificado pelo gene *mef*, de variantes *mefA* e *mefE*, que quando expresso confere resistência apenas aos membros 14- e 15- dos macrolídeos (eritromicina e azitromicina), enquanto que as lincosaminas, estreptograminas e membros 16- dos macrolídeos permanecem ativos (CLANCY et al., 1996; KLAASSEN; MOUTON, 2005).

### 1.3.3 Tetraciclina

A resistência à tetraciclina é comum em EGB e geralmente ocorre devido à proteção ribossomal codificada por *tetM* ou *tetO* ou menos comumente por uma bomba de efluxo codificado por *tetK* ou *tetL* (CULEBRAS et al., 2002).

Embora a tetraciclina não seja mais utilizada para o tratamento de infecções estreptocócicas, estudos epidemiológicos continuam sendo necessários para elucidar se a alta frequência de isolados resistentes à tetraciclina constitui um fator de risco potencial para a aquisição de genes que codificam resistência a outros antimicrobianos, uma vez que os elementos que transferem os genes de resistência à tetraciclina também podem carrear genes que codificam resistência aos macrolídeos, lincosamidas, e cloranfenicol (CULEBRAS et al., 2002). Entretanto esta afirmação ainda é controversa, Martins et al. acredita que a resistência à eritromicina não está necessariamente ligada à resistência a tetraciclina já que nem todos os isolados resistentes à eritromicina se encontram simultaneamente resistentes à tetraciclina, incluindo aqueles que possuem o gene *ermB* (MARTINS; MELO-CRISTINO; RAMIREZ, 2012).

## 1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

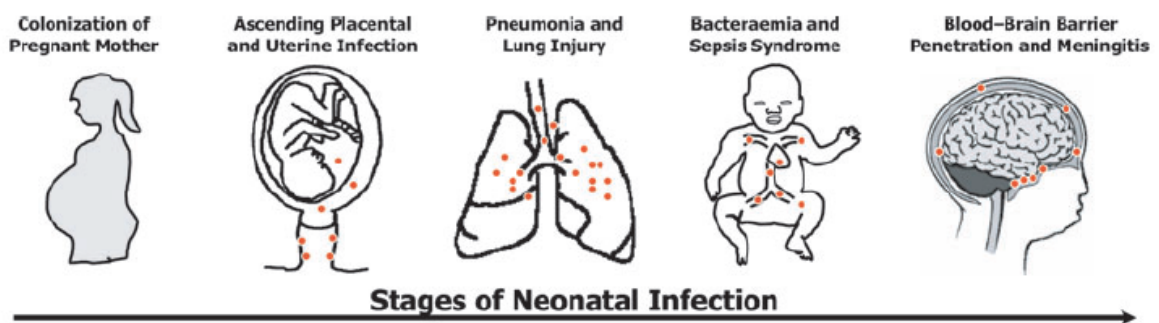
Embora EGB normalmente resida como um microrganismo comensal no trato gastrointestinal e genital, este microrganismo possui a capacidade de acessar vários outros nichos, como o compartimento intra-uterino. Isso indica que EGB possui uma vantagem na sobrevivência por ser eficiente capaz de se adaptar a ambientes diferentes durante o curso da infecção (RAJAGOPAL, 2009). Esta adaptação ocorre devido a presença de fatores de virulência que estão envolvidos com a sobrevivência, invasão e persistência

bacteriana no hospedeiro, sendo responsáveis pelo dano, degradação do tecido, resistência à fagocitose, além da promoção da aderência e colonização (NIZET; RUBENS, 2000).

#### 1.4.1 Fatores que Contribuem para Injúria do Tecido do Hospedeiro

A invasão e sobrevivência do EGB em diferentes tipos de células no hospedeiro são fatores importantes para o sucesso dessa bactéria em causar doença. Assim, sua transposição através da membrana placentária, alvéolo pulmonar e barreira hematoencefálica, podem ter como consequência a amnionite, bacteremia, sepse e meningite no hospedeiro (Figura 1). A proliferação bacteriana associada com o dano no tecido, ocasionado por toxinas e outros produtos, é evidente em espécies patogênicas de EGB (NIZET; RUBENS, 2000).

**Figura 1** – Estágios e manifestações clínicas observadas na infecção neonatal por EGB.



Fonte: Adaptado de Doran; Nizet, (2004).

##### 1.4.1.1 Gene *cylE* e expressão de $\beta$ -hemolisina/citolisina

A pneumonia observada na doença neonatal de início precoce é caracterizada por prejuízo da integridade do epitélio e endotélio do pulmão, que parece estar relacionado com a ação da  $\beta$ -hemolisina/citolisina ( $\beta$ -HC) (DORAN et al., 2002). Além disso, estudos mostram que a perda da capacidade de produção de  $\beta$ -HC pelo EGB diminui a virulência em modelos animais de sepse e meningite (DORAN; LIU; NIZET, 2003; RING et al., 2002) e que sua citotoxicidade é inibida pela presença do surfactante fosfolipídico dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), o que explica a maior susceptibilidade dos recém-nascidos à infecção a esta bactéria (NIZET et al., 1996).

O gene *cylE*, do operon *cyl*, codifica a  $\beta$ -HC em EGB (PRITZLAFF et al., 2001), responsável pela característica  $\beta$ -hemolítica observada em ágar sangue utilizada para



sua identificação (FACKLAM et al., 1974). A expressão desse mesmo gene permite a produção de um pigmento carotenóide avermelhado (TAPSALL, 1986).

#### 1.4.1.2 Gene *cfb* e expressão do fator CAMP

Outra molécula que pode contribuir para invasão é o fator CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen), que tem sido utilizado no diagnóstico microbiológico para identificação de EGB, desde a sua descoberta em 1944 por Christie e colaboradores. O teste de CAMP baseia-se na produção de hemólise por EGB quando co-cultivado com *Staphylococcus aureus* em ágar sangue. Assim, hemáceas de carneiro pré-tratadas com esfingomielinase, produzida por *S.aureus*, tornam-se sensíveis a ação do fator CAMP, conduzindo à hemólise (CHRISTIE; ATKINS; PETERSON, 1944). Várias atividades biológicas têm sido atribuídas ao fator CAMP, tais como: provocar a morte quando administrado em coelhos e ratos (SKALKA; SMOLA, 1981), inativar imunoglobulinas por sua ligação na porção Fc (JURGENS; STERZIK; FEHRENBACH, 1987), formar poros discretos em tamanhos heterogêneos na membrana de células susceptíveis, provavelmente envolvendo oligomerização (LANG; PALMER, 2003). Entretanto, Hensler et al. (2008) sugerem que o fator CAMP não satisfaz o postulado de Koch como um fator de virulência essencial, já que em comparação com o tipo selvagem, o mutante isogênico em *cfb*, que perdeu a capacidade de produzir o fator CAMP, demonstrou resistência equivalente à fagócitos e invasão de células endoteliais.

Em EGB, a expressão do fator CAMP e da  $\beta$ -HC é regulada pelo sistema de dois componentes CovR/S e Stk 1 (LAMY et al., 2004). Deste modo, devido a habilidade, tanto do fator CAMP quanto da  $\beta$ -HC de formar poros em membranas, acredita-se que em locais como o pulmão humano que possui alta concentração de DPPC seria essencial a expressão do fator CAMP (LIU et al., 2004), sugerindo que as proteínas quinases sensoras CovS e Stk1 são preferencialmente utilizadas pelo EGB para reconhecer diferentes ambientes no hospedeiro (LIN et al., 2009).

#### 1.4.1.3 Gene *hylB* e atividade da hialuronato liase

A atividade da hialuronidase, codificada pelo gene *hylB*, é um importante fator de virulência já que sua secreção possibilita a degradação do ácido hialurônico. Este componente importante da matriz extracelular dos tecidos do hospedeiro atua como cimento

intercelular e permite a comunicação entre células devido as interações intra e intermoleculares. Esta substância é encontrada em altas concentrações na placenta, líquido amniótico e pulmão (LI; JEDRZEJAS, 2001). Deste modo, a enzima hialuronidase possui grande importância na disseminação do EGB a partir do sítio inicial de infecção.

A regulação da transcrição do *hylB* ainda é desconhecida (RAJAGOPAL, 2009). Entretanto acredita-se que o elemento de inserção IS1548 quando inserido no gene *hylB* resulta na inativação da secreção da enzima hialuronidase (GRANLUND et al., 1998), sendo um elemento potencialmente regulador de genes envolvidos com fatores de virulência (FLECHARD et al., 2013).

#### 1.4.2 Fatores que Contribuem para Evasão das Defesas do Hospedeiro

Após a penetração do EGB nos tecidos do pulmão e corrente sanguínea em neonatos ocorre o recrutamento de células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos. No entanto, para que a fagocitose ocorra a opsonização deve acontecer anteriormente, deste modo, a presença de fatores de virulência que interferem na opsonização possui importância na evasão da resposta imune (NIZET; RUBENS, 2000).

##### 1.4.2.1 Gene *cylE* e pigmento carotenóide avermelhado

O pigmento carotenóide avermelhado é importante por possuir a capacidade de neutralizar radicais livres como peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete, fornecendo proteção à elementos importantes responsáveis pelo *burst* oxidativo em neutrófilos. Deste modo, o gene *cylE* contribui para a sobrevivência do EGB no hospedeiro não só pela produção de  $\beta$ -HC, mas também pela função de proteção exercida pelo pigmento carotenóide avermelhado (LIU et al., 2004).

Baseado na produção do pigmento carotenóide avermelhado foi desenvolvido um meio de cultura cromogênico para a detecção de EGB conhecido como caldo Granada. Atualmente o uso do caldo Granada é recomendado pelo CDC para a detecção laboratorial de EGB (NICKMANS et al., 2012). Te Witt et al. (2012) observaram que este caldo possui maior sensibilidade que o método convencional que utiliza o meio de transporte Amies, principalmente quando existe um baixo inóculo ou após tempos prolongados de transporte. No entanto o caldo Granada não exclui a presença de EGB, aproximadamente 5 a 8% de todos os isolados de EGB não produzem este pigmento, característica estreitamente

ligada à ausência de hemólise. Deste modo, isolados não hemolíticos de EGB não podem ser identificadas por este método de detecção (NICKMANS et al., 2012), devendo ser incubado a 37<sup>o</sup>C e subcultivado em meio solidificado (TE WITT et al., 2012).

#### 1.4.2.2 Cápsula polissacarídica e tipagem molecular

A cápsula é um fator de virulência que possui função antifagocítica por ser composta por ácido siálico, um açúcar encontrado comumente em células de vertebrados, dificultando deste modo, seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (MARQUES et al., 1992).

A cápsula de EGB permite sua classificação em 10 diferentes tipos capsulares [Ia, Ib, II-IX (SLOTVED et al., 2007)]. Nos Estados Unidos e Europa cerca de 80 à 90% dos sorotipos encontrados são Ia, II, III e V (BRZYCHCZY-WLOCH et al., 2012; HICKMAN et al., 1999; MANNING et al., 2008). Gestantes do Sul Africano possuem isolados de EGB de tipo Ia, III e V com maior frequência (MAVENYENGWA; MAELAND; MOYO, 2010). No Japão o sorotipo V é o mais encontrado (UENO et al., 2012). No Brasil existem poucos estudos sobre os sorotipos mais prevalentes de EGB (FIOLO et al., 2012). Estudos mais recentes indicam que o sorotipo Ib é mais frequente entre gestantes em Jundiaí (SP), seguido pelos sorotipos Ia e II (SIMOES et al., 2007). Em Curitiba (PR) os sorotipos Ia e Ib são mais frequentes em recém nascidos (RNs) com doença de início precoce, e o IV em infecção tardia (PALMEIRO et al., 2010). Em Campinas (SP) os tipos de amostras de RNs revelaram com maior participação os sorotipos Ia, III e V (FIOLO et al., 2012).

Sabe-se que a regulação da cápsula é mediada por através do CovR/S e Rog B. No entanto ainda não são conhecidos os fatores ambientais externos que controlam esse sistema e estão presentes durante o estado comensal, onde provavelmente ocorre uma diminuição da expressão da cápsula, e no estado da invasão onde existe um provável aumento da expressão dessa estrutura (RAJAGOPAL, 2009).

#### 1.4.3 *Pili* Tipo PI-1, PI-2a, PI-2b, Adesão e Formação de Biofilme

*Pilus* ou fimbria é conhecida por exercer um papel importante na adesão e colonização no tecido humano (TELFORD et al., 2006). A aderência em células epiteliais está envolvida na patogênese da sepse neonatal por ser um fator importante na colonização vaginal

e retal, além de ser um evento preliminar à invasão de células epiteliais respiratórias (TAMURA et al., 1994).

Após o primeiro relato do *pilus* de isolados de EGB (LAUER et al., 2005) novos estudos quanto ao seu potencial envolvimento na ligação e adesão à célula hospedeira, bem como sua associação com a habilidade de colonização e invasão, interação com componentes da matriz extracelular e formação de biofilmes, vêm sendo realizados (DRAMSI et al., 2006; MAISEY et al., 2007; HO et al., 2012; KONTO-GHIORGHI et al., 2009; RINAUDO et al., 2010). Cada isolado de EGB possui um ou dois tipos dos três *pili* identificados como PI-1, PI-2a e PI-2b (MARGARIT et al., 2009).

Estudos recentes envolvendo a importância do *pilus* na adesão celular *in vitro* e formação de biofilme mostram que o *pilus* PI-1 parece não mediar a adesão em células epiteliais e que apenas a presença do *pilus* PI-2a contribui para formação do biofilme (JIANG et al., 2012; RINAUDO et al., 2010).

A identificação de antígenos de superfície, como o *pilus* que se encontra conservado na maioria dos isolados de EGB pode permitir o desenvolvimento de uma vacina com ou sem o complemento de proteínas polissacarídicas (MARGARIT et al., 2009). Atualmente vacinas vêm sendo estudadas nos Estados Unidos e Europa, entretanto estas vacinas podem não ser tão efetivas em outras regiões, já que a prevalência de tipos capsulares e antígenos de superfície são diferentes entre EGBs de países distintos, havendo deste modo, uma necessidade cada vez maior de estudos para assegurar o desenvolvimento de uma vacina global para o EGB (JOHRI et al., 2006).

## 1.5 ESTUDOS EM BIOLOGIA MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE EGB

Um teste de triagem ideal é aquele que pode identificar com precisão gestantes colonizadas por EGB (mesmo em presença de contagem baixa de bactérias) em um curto período. Muitas técnicas têm sido testadas para validar um método rápido e eficiente de rastreio de EGB para substituir o método de cultura (CARROLL et al., 1996).

Os esforços para minimizar o tempo de obtenção do resultado levaram ao desenvolvimento das metodologias baseadas em técnicas moleculares, tais como PCR em tempo real (EDWARDS et al., 2008) e hibridação *in situ* (FISH PNA) (MONTAGUE et al., 2008). Porém a técnica de FISH PNA para EGB geralmente é usada apenas após a cultura de enriquecimento por pelo menos 18 horas para assegurar um número suficiente de bactérias em

crescimento na fase exponencial, bem como a concentração de alvos de rRNA por célula (MONTAGUE et al., 2008).

A PCR tem revolucionado a área de diagnóstico de doenças infecciosas (SIBLEY; PEIRANO; CHURCH, 2012). Esta reação apresenta alta sensibilidade, permitindo a detecção de quantidades mínimas de ácidos nucleicos de forma rápida (MULLIS; FALOONA, 1987). A PCR em tempo real possibilita a detecção dos fragmentos amplificados de forma simultânea à reação de amplificação, eliminando a etapa de análise do produto gerado após a reação. Assim, associado à alta sensibilidade, é possível observar um menor tempo para obtenção dos resultados e redução da possibilidade de contaminação cruzada. Permite ainda a análise quantitativa de uma sequência nucleotídica particular, bem como a expressão gênica (HEID et al., 1996).

Conforme diretrizes do CDC (2010) testes baseados em amplificação de ácidos nucleicos (NAAT – *Nucleic Acid Amplification Tests*) podem ser utilizados para detecção de EGB, desde que sua *performance* seja equivalente ou superior à metodologia baseada em cultura. 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 Smart GBS-GeneXpert (Cepheid) baseiam-se na amplificação em tempo real do gene *cfb*. São testes rápidos que podem ser aplicados diretamente na amostra de *swab* vaginal-retal, embora o teste BD GeneOhm™ StrepB mostrou-se mais sensível após uma etapa de enriquecimento do material coletado em meio de cultura específico (SCICCHITANO; BOURBEAU, 2009). Contudo, estes testes não detectam marcadores de resistência a clindamicina, que é o fármaco de escolha para API em gestantes alérgicas a penicilina com alto risco a anafilaxia.

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. Deste modo, uma melhoria esperada destes testes é a detecção combinada de EGB com a detecção de marcadores de resistência a clindamicina, para orientação apropriada na profilaxia intraparto em gestantes alérgicas à penicilina com alto risco de anafilaxia (MELIN, 2011).

## **2 OBJETIVO**

Caracterizar *Streptococcus agalactiae* isolados de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Londrina quanto ao tipo capsular, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e potencial de virulência por métodos fenotípicos e moleculares.

### 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Confirmar a identificação de EGB por métodos fenotípicos padrões.
2. Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método disco-difusão e de Concentração Inibitória Mínima (CIM) por diluição em ágar.
3. Desenhar oligonucleotídeos iniciadores específicos e detectar a presença de genes que codificam resistência a macrolídeos e lincosamidas, assim como de diferentes determinantes de virulência:  $\beta$ -hemolisina/citolisina (*cylE*), hialuronidase (*hylB*), fator CAMP (*cfb*), *pili* (PI-1, PI-2a, PI-2b) por PCR.
4. Determinar os tipos capsulares por multiplex-PCR.
5. Determinar a atividade enzimática da hialuronidase pelo método em placa.
6. Determinar a produção de pigmento poliênico vermelho em caldo Granada.
7. Analisar a formação de biofilme em placa de poliestireno.
8. Analisar a adesão em células epiteliais *in vitro*.
9. Correlacionar a presença ou ausência do gene com métodos fenotípicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIKGOZ, Z. C. et al. Macrolide resistance determinants of invasive and noninvasive group B streptococci in a Turkish hospital. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 4, p. 1410-1412, 2004.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Neonatologia: Critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde**. 2008.
- 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.
- BORCHARDT, S. M. et al. Frequency of antimicrobial resistance among invasive and colonizing Group B streptococcal isolates. **BMC Infect Dis**, v. 6, p. 57, 2006.
- BOYER, K. M. et al. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. **J Infect Dis**, v. 148, n. 5, p. 802-809, 1983.
- BOYER, K. M.; GOTOFF, S. P. Strategies for chemoprophylaxis of GBS early-onset infections. **Antibiot Chemother**, v. 35, p. 267-280, 1985.
- \_\_\_\_\_. 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.
- BRZYCHCZY-WLOCH, M. et al. Molecular characterization of capsular polysaccharides and surface protein genes in relation to genetic similarity of group B streptococci isolated from Polish pregnant women. **Epidemiol Infect**, v. 140, n. 2, p. 329-336, 2012.
- CARROLL, K. C. et al. Rapid detection of group B streptococcal colonization of the genital tract by a commercial optical immunoassay. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 15, n. 3, p. 206-210, 1996.
- 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.
- CHRISTIE, R.; ATKINS, N. E.; PETERSON, E. A. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. **Exp. Biol. Med. Sci**, v. 22, p. 197-200, 1944.
- 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.
- COSTA, A. L. et al. Prevalence of colonization by group B *Streptococcus* in pregnant women from a public maternity of Northwest region of Brazil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 30, n. 6, p. 274-280, 2008.
- CULEBRAS, E. et al. Macrolide and tetracycline resistance and molecular relationships of clinical strains of *Streptococcus agalactiae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 5, p. 1574-1576, 2002.



DE AZAVEDO, J. C. et al. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive group B *Streptococcus* isolates from Ontario, Canada. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 12, p. 3504-3508, 2001.

DORAN, K. S. et al. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. **J Infect Dis**, v. 185, n. 2, p. 196-203, 2002.

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

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

EDWARDS, R. K. et al. Intrapartum antibiotic prophylaxis and early-onset neonatal sepsis patterns. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 11, n. 4, p. 221-226, 2003.

\_\_\_\_\_. Rapid group B streptococci screening using a real-time polymerase chain reaction assay. **Obstet Gynecol**, v. 111, n. 6, p. 1335-1341, 2008.

EMBLETON, N.; WARIYAR, U.; HEY, E. Mortality from early onset group B streptococcal infection in the United Kingdom. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 80, n. 2, p. F139-141, 1999.

FACKLAM, R. R. et al. Presumptive identification of group A, B, and D streptococci. **Appl Microbiol**, v. 27, n. 1, p. 107-113, 1974.

FINES, M. et al. In vitro selection of resistance to clindamycin related to alterations in the attenuator of the *ermTR* gene of *Streptococcus pyogenes* UCN1 inducibly resistant to erythromycin. **J Antimicrob Chemother**, v. 48, n. 3, p. 411-416, 2001.

FIOLO, K. et al. Infection rate and *Streptococcus agalactiae* serotypes in samples of infected neonates in the city of Campinas (Sao Paulo), Brazil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 34, n. 12, p. 544-549, 2012.

FLECHARD, M. et al. Analysis and identification of IS1548 insertion targets in *Streptococcus agalactiae*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 340, n. 1, p. 65-72, 2013.

GAUDREAU, C. et al. Prosthetic hip joint infection with a *Streptococcus agalactiae* isolate not susceptible to penicillin G and ceftriaxone. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 3, p. 594-595, 2010.

GHERARDI, G. et al. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 9, p. 2909-2916, 2007.

GIOVANETTI, E. et al. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in Italy and heterogeneity of inducibly resistant strains. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 8, p. 1935-1940, 1999.

- 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.
- GRANLUND, M. et al. Identification of a novel insertion element, IS1548, in group B streptococci, predominantly in strains causing endocarditis. **J Infect Dis**, v. 177, n. 4, p. 967-976, 1998.
- HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Res**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.
- HENSLER, M. E. et al. CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B *Streptococcus*. **Microb Pathog**, v. 44, n. 1, p. 84-88, 2008.
- HICKMAN, M. E. et al. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. **Pediatrics**, v. 104, n. 2 Pt 1, p. 203-209, 1999.
- HO, Y. R. et al. The enhancement of biofilm formation in Group B streptococcal isolates at vaginal pH. **Med Microbiol Immunol**, 2012.
- JIANG, S. et al. Regulation and function of *pilus* island 1 in group B *streptococcus*. **J Bacteriol**, v. 194, n. 10, p. 2479-2490, 2012.
- JOHRI, A. K. et al. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 12, p. 932-942, 2006.
- JONES, D. E. et al. Rapid identification of pregnant women heavily colonized with group B streptococci. **J Clin Microbiol**, v. 18, n. 3, p. 558-560, 1983.
- JURGENS, D.; STERZIK, B.; FEHRENBACH, F. J. Unspecific binding of group B streptococcal cocytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. **J Exp Med**, v. 165, n. 3, p. 720-732, 1987.
- 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.
- KLAASSEN, C. H.; MOUTON, J. W. Molecular detection of the macrolide efflux gene: to discriminate or not to discriminate between *mefA* and *mefE*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 4, p. 1271-1278, 2005.
- KONTO-GHIORGHI, Y. et al. Dual role for *pilus* in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 5, p. e1000422, 2009.
- LAMY, M. C. et al. CovS/CovR of group B *streptococcus*: a two-component global regulatory system involved in virulence. **Mol Microbiol**, v. 54, n. 5, p. 1250-1268, 2004.
- LANG, S.; PALMER, M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. **J Biol Chem**, v. 278, n. 40, p. 38167-38173, 2003.
- LAUER, P. et al. Genome analysis reveals *pili* in Group B *Streptococcus*. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 105, 2005.

- 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.
- LI, S.; JEDRZEJAS, M. J. Hyaluronan binding and degradation by *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase. **J Biol Chem**, v. 276, n. 44, p. 41407-41416, 2001.
- LIM, D. V. et al. Reduction of morbidity and mortality rates for neonatal group B streptococcal disease through early diagnosis and chemoprophylaxis. **J Clin Microbiol**, v. 23, n. 3, p. 489-492, 1986.
- 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.
- LIN, W. J. et al. Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B *Streptococcus* response regulator CovR. **Mol Microbiol**, v. 71, n. 6, p. 1477-1495, 2009.
- LINHARES, J. J. et al. Prevalence of the colonization by *Streptococcus agalactiae* in pregnant women from a maternity in Ceara, Brazil, correlating with perinatal outcomes. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 33, n. 12, p. 395-400, 2011.
- LIU, G. Y. et al. Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 40, p. 14491-14496, 2004.
- LUKACS, S. L.; SCHOENDORF, K. C.; SCHUCHAT, A. Trends in sepsis-related neonatal mortality in the United States, 1985-1998. **Pediatr Infect Dis J**, v. 23, n. 7, p. 599-603, 2004.
- 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.
- MAISEY, H. C. et al. Group B streptococcal *pilus* proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. **J Bacteriol**, v. 189, n. 4, p. 1464-1467, 2007.
- MANNING, S. D. et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance in group B *streptococcus* colonizing young, nonpregnant women. **Clin Infect Dis**, v. 47, n. 3, p. 388-390, 2008.
- MARGARIT, I. et al. Preventing bacterial infections with *pilus*-based vaccines: the group B *streptococcus* paradigm. **J Infect Dis**, v. 199, n. 1, p. 108-115, 2009.
- MARQUES, M. B. et al. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. **Infect Immun**, v. 60, n. 10, p. 3986-3993, 1992.
- MARTINS, E. R.; MELO-CRISTINO, J.; RAMIREZ, M. Dominance of serotype Ia among group B Streptococci causing invasive infections in nonpregnant adults in Portugal. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 1219-1227, 2012.

- MAVENYENGWA, R. T.; MAELAND, J. A.; MOYO, S. R. Serotype markers in a *Streptococcus agalactiae* strain collection from Zimbabwe. **Indian J Med Microbiol**, v. 28, n. 4, p. 313-319, 2010.
- 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.
- MIURA, E.; MARTIN, M. C. Group B streptococcal neonatal infections in Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 43, n. 5, p. 243-246, 2001.
- MONTAGUE, N. S. et al. Detection of group B streptococci in Lim broth by use of group B *streptococcus* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization and selective and nonselective agars. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 10, p. 3470-3472, 2008.
- MORALES, W. J. et al. Change in antibiotic resistance of group B *streptococcus*: impact on intrapartum management. **Am J Obstet Gynecol**, v. 181, n. 2, p. 310-314, 1999.
- MULLANEY, D. M. Group B streptococcal infections in newborns. **J Obstet Gynecol Neonatal Nurs**, v. 30, n. 6, p. 649-658, 2001.
- MULLER, A. E. et al. Morbidity related to maternal group B streptococcal infections. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 85, n. 9, p. 1027-1037, 2006.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**, v. 155, p. 335-350, 1987.
- 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.
- \_\_\_\_\_. Genetic heterogeneity in *pbp* genes among clinically isolated group B Streptococci with reduced penicillin susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 12, p. 4258-4267, 2008.
- NICKMANS, S. et al. Possible solution to the problem of nonhemolytic group B *streptococcus* on granada medium. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 3, p. 1132-1133, 2012.
- NIZET, V. et al. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. **Infect Immun**, v. 64, n. 9, p. 3818-3826, 1996.
- NIZET, V.; RUBENS, C. E. Pathogenic mechanisms and virulence factors of group B streptococci. In: **The Gram-Positive Pathogens**. Washington, D.C: ASM Press, 2000.
- NOMURA, M. L. et al. Group B *streptococcus* maternal and neonatal colonization in preterm rupture of membranes and preterm labor. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 31, n. 8, p. 397-403, 2009.
- PALMEIRO, J. K. et al. Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in southern Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 12, p. 4397-4403, 2010.

- POYART, C. et al. Invasive group B streptococcal infections in infants, France. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 10, p. 1647-1649, 2008.
- PRITZLAFF, C. A. et al. Genetic basis for the beta-haemolytic/cytolytic activity of group B *Streptococcus*. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 2, p. 236-247, 2001.
- 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.
- RAJAGOPAL, L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. **Future Microbiol**, v. 4, n. 2, p. 201-221, 2009.
- RINAUDO, C. D. et al. Specific involvement of *pilus* type 2a in biofilm formation in group B *Streptococcus*. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9216, 2010.
- RING, A. et al. Group B streptococcal beta-hemolysin induces mortality and liver injury in experimental sepsis. **J Infect Dis**, v. 185, n. 12, p. 1745-1753, 2002.
- SAMESHIMA, H. et al. Deaths of early-onset, invasive sepsis in full-term infants in Miyazaki: nine cases from a regional population-based analysis from 1998-2006. **Jpn J Infect Dis**, v. 61, n. 5, p. 400-401, 2008.
- 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.
- 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.
- 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.
- SIBLEY, C. D.; PEIRANO, G.; CHURCH, D. L. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 3, p. 505-521, 2012.
- SIMOES, J. A. et al. Phenotypical characteristics of group B *streptococcus* in parturients. **Braz J Infect Dis**, v. 11, n. 2, p. 261-266, 2007.
- SKALKA, B.; SMOLA, J. Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor--a new finding about diffusible exosubstances of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*. **Zentralbl Bakteriol A**, v. 249, n. 2, p. 190-194, 1981.

- SKOFF, T. H. et al. Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 1, p. 85-92, 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.
- TAMURA, G. S. et al. Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. **Infect Immun**, v. 62, n. 6, p. 2450-2458, 1994.
- TAPSALL, J. W. Pigment production by Lancefield-group-B streptococci (*Streptococcus agalactiae*). **J Med Microbiol**, v. 21, n. 1, p. 75-81, 1986.
- TE WITT, R. et al. In vitro evaluation of the performance of Granada selective enrichment broth for the detection of group B streptococcal colonization. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 3, p. 357-363, 2012.
- TELFORD, J. L. et al. *Pili* in gram-positive pathogens. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 7, p. 509-519, 2006.
- TOWERS, C. V. et al. Potential consequences of widespread antepartal use of ampicillin. **Am J Obstet Gynecol**, v. 179, n. 4, p. 879-883, 1998.
- UENO, H. et al. Characterization of group B *streptococcus* isolated from women in Saitama city, Japan. **Jpn J Infect Dis**, v. 65, n. 6, p. 516-521, 2012.
- VACIOTO, E. et al. A survey of the incidence of neonatal sepsis by group B *Streptococcus* during a decade in a Brazilian maternity hospital. **Braz J Infect Dis**, v. 6, n. 2, p. 55-62, 2002.
- 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.
- 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.
- 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 Suppl A, 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 JR, H. C. A prospective study of group B streptococcal bacteriuria in pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 140, n. 5, p. 515-520, 1981.

## 4 ARTIGO 1

**Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolated from Patients Attended at  
University Hospital of Londrina, Paraná**

Eliane Saori Otaguiri<sup>1</sup>, Ana Elisa Belotto Morguette<sup>1</sup>, Eliandro Reis Tavares<sup>1</sup>, Pollyanna Myrella Capela dos Santos<sup>1</sup>, Alexandre Tadachi Morey<sup>1</sup>, Márcia Regina Eches Perugini<sup>2</sup>, Lucy Megumi Yamauchi<sup>1</sup>, Sueli Fumie Yamada-Ogatta<sup>1\*</sup>

**Abstract:** *Streptococcus agalactiae* or GBS (Group B *Streptococcus*) is a commensal microorganism of the human gastrointestinal and genitourinary tracts. However, this bacterium has the ability to access various host sites, which reflects its adaptability to different environments during the course of infection. This adaptation is due to expression of virulence factors that are involved with survival, invasion and bacterial persistence in the host. This study aimed to characterize GBS isolates from women of reproductive age attended at the University Hospital of Londrina. Studying eighty three GBS isolates we determined the following: the capsular typing, antimicrobial susceptibility profile and the occurrence of *cylE* and *hylB* genes, hemolytic and hyaluronate lyase activities, and capacity to produce the orange carotenoid pigment. The capsular types Ia, II, III and V have been identified in most EGBs and the prevalence was 42.2%, 10.8%, 14.5% and 30.1%, respectively. Only one isolate each was classified as type IX and non-typeable. All isolates were susceptible to penicillin, ampicillin, cefepime, cefotaxime, chloramphenicol, levofloxacin and vancomycin. Resistance to erythromycin and clindamycin was observed in 19.3% and 13.3% of isolates, respectively. All isolates resistant to clindamycin (n = 11) were simultaneously resistant to erythromycin and were distributed in the capsular types III and V. Only one isolate showed cMLS<sub>B</sub> phenotype and minimum inhibitory concentration higher than 8 µg/ml for erythromycin and clindamycin. The mechanism of resistance to erythromycin more prevalent among these isolates was mediated by gene *ermA*, alone or in combination with the gene *ermB*. The isolates displaying resistance only to erythromycin (n = 5) belonged to capsular type Ia, and presented the M phenotype, which was mediated by *mefA/E* gene. All isolates harbored the genes and *cylE* and *hylB*. However 4.8% of the isolates were classified as gamma-hemolytic and carotenoid pigment non-producer, and 18.1% were unable to produce hyaluronate lyase *in vitro*. Our results indicate the potential virulence of commensal GBS isolates and the distribution of capsular antigens, which may contribute to the development of new strategies for prevention and treatment of GBS infection.

**Keywords:** Group B *Streptococcus*. Capsular antigen. Erythromycin. Clindamycin. Virulence traits.

---

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Microbiologia Clínica, 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

## Introduction

*Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococci – GBS) can colonize the gastrointestinal and genitourinary tracts of healthy individuals without any symptoms of disease [1]. Nevertheless, this bacterium can cause life-threatening invasive diseases in pregnant women, neonates or non-pregnant adults. Colonized women, during pregnancy or the postpartum period, is usually asymptomatic, but GBS may cause bacteremia, urinary tract infections, chorioamnionitis, endometritis, puerperal sepsis and, occasionally meningitis and septic thrombophlebitis [2, 3]. GBS colonization among pregnant women also increases the risk of premature delivery, and perinatal transmission of the microorganism to newborns that can cause potentially fatal sepsis and meningitis [4, 5]. A successful perinatal disease prevention strategy based on intrapartum chemoprophylaxis for pregnant women at risk [6] leads to a significant decrease in GBS infections in neonates [3, 5, 7]. However, at the last decades, GBS has been increasingly associated with invasive disease in non-pregnant adults, mainly in elderly, immunocompromised and those with diabetes mellitus and cancer [3, 8, 9, 10]. The mortality associated with these patients is frequently higher than for newborns [3, 9]. These data alert to the need of prevention strategies for GBS infections among adults.

Penicillin has been established as a first-line antibacterial for the prophylaxis and treatment of GBS infections. Moreover, clindamycin and erythromycin have been used as alternatives in penicillin-allergic individuals. However, resistance to these antibacterials among GBS isolated from pregnant and non-pregnant individuals has been described in several countries [3, 8, 11-20], raising concerns to their use for treatment of GBS infections. The resistance to penicillin is frequently associated with mutation on penicillin-binding proteins (PBP) 2X and 2B [18, 20]. Overall, the mechanisms which confer resistance to erythromycin include the post-transcriptional methylation of the adenine residues of 23S ribosomal RNA mediated by *erm* genes, and efflux of the antibiotic mediated by a membrane bound protein encoded by *mef* genes [21-23]. The expression of *erm* genes results in MLS<sub>B</sub> phenotype, responsible for generating cross-resistance to macrolides-lincosamide-streptogramin B [21]. On the other hand, the phenotype M, encoded by *mef* genes, confers resistance only to 14- and 15-membered ring macrolides (erythromycin and azithromycin) [24, 25].

According to the immunologic reactivity of the sialic acid-rich capsular polysaccharide, GBS are divided into ten serotypes [Ia, Ib, II-VIII [26] e IX [27]]. Different



surveys all over the world have shown the prevalence of serotypes Ia, Ib, II, III and V as major streptococcal disease-causing agents [3, 7-9, 16, 28, 29].

Like many bacterial pathogens, GBS may express virulence factors that contribute to the pathogenesis of infection. Besides defining GBS serotypes, the cell wall-anchored polysaccharide capsule has been recognized as an important virulence factor of this bacterium. It prevents the deposition of alternative complement pathway factor C3b on the bacterial surface, resulting in decreased phagocytosis by macrophages and neutrophils [30]. The extracellular  $\beta$ -hemolysin/cytolysin ( $\beta$ -H/C) is a pore-forming toxin encoded by the chromosomal *cylE* gene [31], which is toxic on a broad range of eukaryotic cells, resulting in cell invasion [32] and evasion of phagocytosis [33]. In addition,  $\beta$ -H/C has an important role in experimental sepsis [34] and meningitis [35]. The expression of *cylE* gene is also associated with the production of an orange carotenoid pigment that contributes to the protection of bacteria against toxic effects of reactive oxygen species generated by oxidative burst mechanism of phagocytic killing of macrophages [33]. The product of gene *hylB*, a secreted hyaluronate lyase, can hydrolyze hyaluronan polymers, which are components of extracellular matrices of human tissues, suggesting that this enzyme can facilitate the spread of bacteria during infection [36].

In Brazil, the knowledge on biological features of GBS isolates is still scarce. In the study described here, GBS isolated from women with no clinical evidence of streptococcal infection were characterized by phenotypic and molecular methods. All isolates were tested for capsular types, hemolysis, carotenoid pigment production and hyaluronate lyase activity. In addition, the *in vitro* susceptibility pattern of the isolates to antibacterial and the occurrence of two virulence determinant genes were also investigated.

## Materials and Methods

### *Microorganisms*

A total of 83 non-duplicate colonizing GBS isolates recovered from vaginal-rectal swab ( $n = 31$ ) and urine ( $n = 52$ ) of women attended at University Hospital of Londrina from March to September 2012 were randomly taken from the bacterial collection of the Laboratory of Clinical Microbiology of Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil. The isolates were classified according to CDC definitions of healthcare-associated infections [37]. All streptococci were identified to the species level by standard phenotypic methods on

the basis of colonial morphology, Gram staining, catalase and CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) tests, after growth on Muller-Hinton agar (MHA, HIMEDIA) containing 5% sheep blood at 37 °C for 24 h. Concomitantly, growth in 6.5% NaCl, bile-esculin or sodium hippurate hydrolysis, and susceptibility to bacitracin and sulfamethoxazole plus trimethoprim tests [38] were also performed. Bacteria were kept at -20 °C in Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) containing 20% glycerol and 5% sheep blood. *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 was used as control.

#### *DNA extraction*

Total DNA of all GBS isolates was extracted following the procedures described previously [39] with minor modifications. Briefly, a single bacterial colony was added to 3 ml TSB and incubated at 37 °C for 24 h. The cultures were centrifuged at 10,000 x g for 5 min, the bacterial pellets were washed twice with sterile phosphate-buffered saline (13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2), resuspended in 300 µl sterile solution containing 10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA and boiled (100 °C) for 20 min. Cellular debris was removed by centrifugation and a 2 µl aliquot of supernatant was used in all amplification reactions.

#### *Capsular typing*

The identification of capsular type (Ia, Ib, II-IX) of all GBS isolates was performed by multiplex PCR assay as described previously [40]. Non-typeable isolates were designated as NT.

#### *Antimicrobial susceptibility profile*

GBS isolates were tested for antimicrobial susceptibility to nine antimicrobials (ampicillin, cefepime, cefotaxime, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, levofloxacin, penicillin and vancomycin) using the disk-diffusion method according to Clinical Laboratory Standards Institute [41]. The susceptibility breakpoints used were those recommended by the CLSI [41]. The minimal inhibitory concentrations (MIC) for erythromycin and clindamycin were determined by the agar-dilution method according to the CLSI guidelines [41]. MIC was determined at 100% growth inhibition. The GBS resistance

phenotypes to erythromycin and clindamycin were determined by the double-disk diffusion method as described previously [42]. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 were used as controls.

*PCR primer design and detection of virulence determinants and, erythromycin and clindamycin resistance encoded genes*

The nucleotide sequences of virulence determinants (*cylE* and *hylB*) and erythromycin and clindamycin resistance (*ermA*, *ermB* and *mefA/E*) encoded genes from *S. agalactiae* deposited in the GenBank/EMBL databases were analyzed using the *BioEdit* v.7.2.0 software facilities [43]. The sequences were aligned using *ClustalW* and a consensus sequence for each gene was used for specific primer design. The primer sequences and expected size of amplicons for each PCR assay are shown in Table 1. PCR was performed in a final volume of 25  $\mu$ l containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M of each dNTP, 5  $\mu$ mol of each forward and reverse primer, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), and 2  $\mu$ 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 60 °C for 1 min and an extension step at 72 °C for 45 s. Negative control reactions without any template DNA were carried out simultaneously. After amplification, 5  $\mu$ l of each PCR product and a 100-bp DNA molecular weight ladder (Invitrogen) were separated in a 2.5% agarose gel (Invitrogen) in TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3) at 4.8 V/cm for 2 h, and the gel was stained with ethidium bromide. The identity of the amplicons was confirmed after determination of the nucleotide sequences with a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) using Big Dye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit. Search for homologies in the GenBank/EMBL databases was carried out with the Blast algorithm [44].

**Table 1** – Description of primers used in PCR for the detection of virulence markers and erythromycin-resistance genes of *Streptococcus agalactiae*.

Target gene <sup>a</sup>	Sequence of the primer (5'→3')	Amplicon size (bp)	Accession number <sup>b</sup>
<i>hylB</i>	F: TGTCTCCGAGGTGACACTTGA R: TTGTGTTGTGACGGGTTGTGGATG	124	U15050.1 / Y15903.1
<i>cylE</i>	F: TCGGAACAAGTAAAGAGGGTTCGG R: GGGTTTCCACAGTTGCTTGAATGT	130	AF093787.2/AF157015.2
<i>ermA</i>	F: CCGGCAAGGAGAAGGTTATAATGA R: GCATTCACCCGTTGACTCATTCC	190	EU492925.1/ EU492926.1
<i>mefA/E</i>	F: GCGATGGTCTTGTCTATGGCTTCA R: AGCTGTTCCAATGCTACGGAT	225	DQ445273.1/DQ445269.1
<i>ermB</i>	F: GCTCTTGCACACTCAAGTCTCGAT R: ACATCTGTGGTATGGCGGGTAAGT	117	EF422365.1/DQ250996.1

<sup>a</sup> *hylB*, hyaluronate lyase; *cylE*, hemolysin/cytolysin ( $\beta$ -H/C); *ermA*, *ermB* cross-resistance to macrolides-lincosamide-streptogramin B; *mefA/E* resistance only to 14- and 15-membered ring macrolides.

<sup>b</sup> The nucleotide sequences of *S. agalactiae* genes deposited in the GenBank/EMBL databases used for specific primer design.

#### *Detection of carotenoid pigment production and hyaluronate lyase activity*

The Granada™ Biphasic broth (Biomérieux) was used to observe the production of orange carotenoid pigment by GBS. Ten to fifteen bacterial colonies of each isolate were inoculated in broth medium and incubated at 37 °C for 24 h. Enzyme activity was assayed on agar plates according to Smith and Willet [45] with minor modifications. A 10  $\mu$ l suspension of 10<sup>6</sup> was placed on the surface of the agar medium containing 2 mg/ml sodium hyaluronate from *Streptococcus equi*. The cultures were incubated at 37 °C for 24 h.

## Results

#### *Patients and GBS capsular types*

A total of 83 isolates of GBS from women with no clinical evidence of streptococcal infection were enrolled in this study. The age of the patients ranged from 15 to 58 years (median 29.7 years old). GBS isolates were distributed in five capsular types and the type Ia (35/83, 42.2%) was the most frequent, followed by type V (25/83, 30.1%), type III

(12/83, 14.5%) and type II (9/83, 10.8%). One each type IX (1.2%) and NT (1.2%) was identified among isolates by using the multiplex-PCR method.

*Phenotypic and genotypic characterization of antibacterial susceptibilities*

All isolates were susceptible to penicillin, ampicillin, cefepime, cefotaxime, chloramphenicol, levofloxacin and vancomycin. Resistance to erythromycin and clindamycin was detected in 16 (19.3%) and 11 (13.3%) isolates, respectively (Table 2). All isolates resistant to clindamycin ( $n=11$ ) was also resistant to erythromycin, and among them only one had a cMLS<sub>B</sub> phenotype (MIC > 8.0  $\mu\text{g/ml}$  for both antibacterials) and harbored the *ermB* gene. Of the 10 isolates displaying the iMLS<sub>B</sub> phenotype, seven carried the *ermA* gene, whereas two isolates carried the *ermB* gene and two harbored both genes. All isolates ( $n=5$ ) resistant only to erythromycin presented the phenotype M and carried the *mefA/E* gene. Capsular types Ia, III and V were observed among the resistant isolates. Resistance for both erythromycin and clindamycin was detected among isolates belonging to types V ( $n=7$ ) and III ( $n=4$ ). All isolates resistant only to erythromycin belonged to type Ia.

**Table 2** – Distribution of capsular type, erythromycin resistance profiles and virulence traits among GBS recovered from women of reproductive age attended at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil.

Isolate	Source	Capsular type <sup>a</sup>	Erythromycin resistance phenotype <sup>b</sup>	Erythromycin resistance genes <sup>c</sup>					Virulence genes <sup>c</sup>	Hemolysis <sup>d</sup>	Carotenoid pigment <sup>e</sup>	Hyaluronate lyase activity <sup>f</sup>
				<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>mefA/E</i>	<i>cylE</i>	<i>hylB</i>				
15	Urine	Ia	M	-	+	+	+	+	β	+	+	
22	Urine	Ia	M	-	-	+	+	+	γ	-	+	
46	Urine	Ia	M	-	-	+	+	+	β	+	+	
120	Urine	Ia	M	-	-	+	+	+	β	+	+	
121	Vaginal-rectal swab	Ia	M	-	-	+	+	+	β	+	+	
66	Urine	III	iMLS <sub>B</sub>	-	+	-	+	+	β	+	-	
109	Urine	III	iMLS <sub>B</sub>	+	-	-	+	+	β	+	-	
113	Urine	III	iMLS <sub>B</sub>	+	+	-	+	+	β	+	-	
114	Urine	III	iMLS <sub>B</sub>	+	-	-	+	+	β	+	-	
65	Urine	V	iMLS <sub>B</sub>	+	-	-	+	+	β	+	+	
105	Urine	V	iMLS <sub>B</sub>	+	-	-	+	+	β	+	+	
108	Urine	V	iMLS <sub>B</sub>	+	-	-	+	+	β	+	+	
112	Urine	V	iMLS <sub>B</sub>	+	-	-	+	+	β	+	+	
115	Vaginal-rectal swab	V	cMLS <sub>B</sub>	-	+	-	+	+	β	+	+	
116	Vaginal-rectal swab	V	iMLS <sub>B</sub>	+	+	-	+	+	β	+	+	
117	Urine	V	iMLS <sub>B</sub>	+	-	-	+	+	β	+	+	

<sup>a</sup> The capsular type was identified by multiplex-PCR (Imperi et al., 2010). <sup>b</sup> Erythromycin resistance phenotype was determined by the double-disk diffusion method (Seppala et al., 1993). <sup>c</sup> The presence of specified gene was determined by PCR. <sup>d</sup> Hemolysis in agar plate containing 5% sheep blood. <sup>e</sup> Production in Granada™ Biphasic broth. <sup>f</sup> Activity was evaluated in agar plate containing sodium hyaluronate from *Streptococcus equi*. (+) Presence/ (-) Absence..

### *Detection of potential virulence traits of commensal GBS*

The presence of the nucleotide sequences corresponding to the *cylE* and *hylB* was detected by PCR, and all isolates harbored both genes. Four (4.8%) of 83 GBS isolates did not produce a hemolysis zone around the bacterial colonies. Concomitantly, these isolates were not able to produce the orange carotenoid pigment in Granada medium. Two isolates each presented the capsular type Ia and III. The activity of hyaluronate lyase *in vitro* was not detected in 15 (18.1%) GBS isolates, and among them, one presented capsular type IX, and seven isolates each presented the types III and V.

### **Discussion**

Although GBS live as commensals of the gastrointestinal and genitourinary tracts of healthy individuals, these bacteria poised to invade different array of host sites and cause serious diseases ranging from neonates to elderly persons. As mentioned before, the colonization of genitourinary tract of pregnant women raises two major concerns: maternal peripartum complications [2, 3] and early-onset disease as a consequence of vertical transmission to newborns [4, 6]. Consistent with their pathogenic status, several genes that encode virulence-associated determinants have been detected in genome of *S. agalactiae* [46]. These genes can be differentially expressed in conditions that mimic the host exposure to bacteria [47, 48].

In this study, five capsular types (Ia, II, III, V, IX) were identified and, except of type IX, all were frequently associated with GBS infections worldwide [3, 7-9, 16, 28, 29]. Few data on GBS serotypes distribution among pregnant and non-pregnant adults in Brazil are available in the literature and some variations can be observed. The serotypes identified in this study were also detected in different surveys that were performed with Brazilian isolates among pregnant and non-pregnant adults. In those studies, the serotypes Ib [11, 19, 49, 50], IV [11, 12], VI [19] and VIII [12] were also identified.

Except to erythromycin and clindamycin, all isolates were susceptible to others antibacterials evaluated in this study. The overall rate of erythromycin resistance was 19.3%, higher than those described previously for Brazilian GBS isolates that ranged from 4.7% to 14% [11-13, 19]. Different epidemiological studies showed the rate of erythromycin resistance up to 40% among GBS isolates from Europe [16, 17, 51], USA [3, 8] and Africa [14]. In this study, resistance to both erythromycin and clindamycin was observed in GBS

isolates of capsular types III and V, whereas the isolates displaying resistance only to erythromycin were exclusively found in Ia capsular type. Similar results were obtained previously by other authors [3, 15, 16, 19, 51], however resistant isolates for both antibacterials were also observed among Ib, II, IV, VI and VIII serotypes [3, 51, 52]. The mechanisms of macrolide resistance was mediated by the *ermA*, *ermB* and *mefA/E* and the distribution of these genes among GBS isolates from this study were in accordance with the macrolide-resistance phenotypes. The phenotype M associated with the presence of *mefA/E* gene was detected in all isolates displaying resistance only to erythromycin. These results were also observed by others [12-14]. The *ermA* alone or in combination with the *ermB* was the most frequent gene observed among GBS isolates expressing the MLS<sub>B</sub> phenotype, and except one, all presented an inducible phenotype. Several studies showed the heterogeneous distribution of *erm* genes among GBS isolates displaying either the constitutive and inducible MLS<sub>B</sub> phenotypes. Whereas some reports described the prevalence of *ermA* between iMLS<sub>B</sub> and cMLS<sub>B</sub> phenotypes [13, 14, 16, 19], others observed the *ermB* in most isolates with the cMLS<sub>B</sub> phenotype [11]. The co-occurrence of both genes was also previously observed in iMLS<sub>B</sub> and cMLS<sub>B</sub> phenotypes [11-13]. The increasing numbers of isolates presenting macrolide resistance together with the description of reduced susceptibility to penicillin emphasize the need for continued surveillance of the antibacterial susceptibility profile in order to identify the emergence of resistance among GBS isolates.

As occurs with the serotypes distribution, data of the potential virulence of GBS isolates from Brazil are limited. All GBS isolates analyzed here harbored the *cylE* and *hylB* genes that have an important role in the pathogenesis of GBS infection. The *cyl* locus of GBS consists of a cluster of twelve genes [31, 53] and some of them can modulate the *cylE* expression and secretion [54] which is crucial for the  $\beta$ -H/C activity. This toxin can promote invasion of epithelial or endothelial cells [32], facilitate their persistence and intracellular survival [33, 55] and, enable their dissemination in host sites. In this context, studies with GBS *cylE* mutants exhibited decreased in virulence in animal models of sepsis [34] and meningitis [35]. Besides the function as virulence factor, it is associated with the characteristic translucent halo around GBS colonies grown on blood agar plates and production of orange carotenoid pigment on specific chromogenic agar that are used for presumptive identification of *S. agalactiae*. In this study, four GBS isolates were non-hemolytic and simultaneously non-pigment producer. Indeed, approximately 3% of GBS isolates are non-hemolytic [56] emphasizing the need to develop new methods that combine identification and detection of antimicrobial resistance for these bacteria.



The role of hyaluronidase in the pathogenesis of GBS infections are still unclear, however it is postulated that this enzyme can facilitate the invasion and dissemination of GBS during infection. The expression of this enzyme has been associated with GBS isolated from invasive infections [57], however the hyaluronidase activity was also detected in commensal GBS isolates from women genital tract [58]. Although all GBS isolates presented the nucleotide sequence corresponding to the *hylB* gene in this study, 18% were not able to use sodium hyaluronate as substrate of hyaluronate lyase. Indeed, this enzyme also cleaves chondroitin sulfate, another component of extracellular matrices of human tissues [36], which may explained the absence of hyaluronidase activity. On the other hand, the lack of hyaluronidase activity may be associated with the presence of an insertion sequence named IS1548 into *hylB* gene [58].

In conclusion, we identified predominantly the occurrence of capsular types Ia, II, III and V among commensals GBS isolated from women at the reproductive age in Londrina, Paraná. Our findings are in agreement with a higher proportion of capsular types distribution among GBS isolated from different populations reported previously. We also detected resistance to erythromycin and clindamycin and the occurrence of virulence determinants between these isolates, indicating the need for continued monitoring the GBS to prevent the development of infections.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from Decit/SCTIE/MS/CNPq, Fundação Araucária e SESA-PR (Edital PPSUS: Gestão Compartilhada em Saúde – 2011). This work was part of the M.Sc. dissertation of E.S. Otaguiri, which received studentship from CAPES. We thank Dr. A. Leyva for English editing of the manuscript and Ediel Clementino da Costa for technical support.

### Reference

1. McCord N, Owen P, Powls A, Lunan B: **A complete audit cycle of intrapartum group B streptococcus prophylaxis.** *Health Bull (Edinb)* 2001, **59**(4):263-267.
2. Krohn MA, Hillier SL, Baker CJ: **Maternal peripartum complications associated with vaginal group B streptococci colonization.** *J Infect Dis* 1999, **179**(6):1410-1415.
3. Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K *et al*: **Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005.** *JAMA* 2008, **299**(17):2056-2065.

4. Schuchat A: **Group B streptococcal disease in newborns: a global perspective on prevention.** *Biomed Pharmacother* 1995, **49**(1):19-25.
5. Verani JR, Schrag SJ: **Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges.** *Clin Perinatol* 2010, **37**(2):375-392.
6. Verani JR, McGee L, Schrag SJ: **Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC, 2010.** *MMWR Recomm Rep* 2010, **59**(RR-10):1-36.
7. Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AK, Cousens S, Heath PT: **Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis.** *Lancet* 2012, **379**(9815):547-556.
8. Skoff TH, Farley MM, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Gershman K, Harrison LH, Lynfield R, Mohle-Boetani J, Zansky S *et al*: **Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007.** *Clin Infect Dis* 2009, **49**(1):85-92.
9. Edwards MS, Baker CJ: **Group B streptococcal infections in elderly adults.** *Clin Infect Dis* 2005, **41**(6):839-847.
10. Shelburne SA, 3rd, Tarrand J, Rolston KV: **Review of streptococcal bloodstream infections at a comprehensive cancer care center, 2000-2011.** *J Infect* 2013, **66**(2):136-146.
11. Palmeiro JK, Dalla-Costa LM, Fracalanza SE, Botelho AC, da Silva Nogueira K, Scheffer MC, de Almeida Torres RS, de Carvalho NS, Cogo LL, Madeira HM: **Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in southern Brazil.** *J Clin Microbiol* 2010, **48**(12):4397-4403.
12. Correa AB, Silva LG, Pinto Tde C, Oliveira IC, Fernandes FG, Costa NS, Mattos MC, Fracalanza SE, Benchetrit LC: **The genetic diversity and phenotypic characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, **106**(8):1002-1006.
13. Nakamura PA, Schuab RBB, Neves FP, Pereira CF, Paula GRd, Barros RR: **Antimicrobial resistance profiles and genetic characterisation of macrolide resistant isolates of *Streptococcus agalactiae*.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2011, **106**:119-122.
14. Hraoui M, Boutiba-Ben Boubaker I, Rachdi M, Slim A, Ben Redjeb S: **Macrolide and tetracycline resistance in clinical strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Tunisia.** *J Med Microbiol* 2012, **61**(Pt 8):1109-1113.
15. Ueno H, Yamamoto Y, Yamamichi A, Kikuchi K, Kobori S, Miyazaki M: **Characterization of group B *streptococcus* isolated from women in Saitama city, Japan.** *Jpn J Infect Dis* 2012, **65**(6):516-521.
16. Martins ER, Melo-Cristino J, Ramirez M: **Dominance of serotype Ia among group B *Streptococci* causing invasive infections in nonpregnant adults in Portugal.** *J Clin Microbiol* 2012, **50**(4):1219-1227.
17. Capanna F, Emonet SP, Cherkaoui A, Irion OP, Schrenzel J, Martinez de Tejada B: **Antibiotic resistance patterns among group B *Streptococcus* isolates: implications for antibiotic prophylaxis for early-onset neonatal sepsis.** *Swiss Med Wkly* 2013, **143**:0.
18. Nagano N, Nagano Y, Toyama M, Kimura K, Tamura T, Shibayama K, Arakawa Y: **Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1.** *J Antimicrob Chemother* 2012, **67**(4):849-856.
19. Duarte RS, Bellei BC, Miranda OP, Brito MA, Teixeira LM: **Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(1):97-103.
20. Kimura K, Nagano N, Nagano Y, Wachino J, Suzuki S, Shibayama K, Arakawa Y: **Predominance of sequence type 1 group with serotype VI among group B streptococci with reduced penicillin susceptibility identified in Japan.** *J Antimicrob Chemother* 2011, **66**(11):2460-2464.
21. Leclercq R: **Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications.** *Clin Infect Dis* 2002, **34**(4):482-492.
22. 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**(1):19-25.

23. 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 Suppl A**:63-90.
24. Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath AV, Bergeron J, Retsema JA: **Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*.** *Mol Microbiol* 1996, **22**(5):867-879.
25. Zeng X, Kong F, Wang H, Darbar A, Gilbert GL: **Simultaneous detection of nine antibiotic resistance-related genes in *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization assay.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**(1):204-209.
26. Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, Rodrigues S, Fahey J, Wessels MR, Rubens CE: **Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides.** *Infect Immun* 2005, **73**(5):3096-3103.
27. Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL: **Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**(9):2929-2936.
28. Murayama SY, Seki C, Sakata H, Sunaoshi K, Nakayama E, Iwata S, Sunakawa K, Ubukata K: **Capsular type and antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from newborns to the elderly, with invasive infections.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**(6):2650-2653.
29. Madzivhandila M, Adrian PV, Cutland CL, Kuwanda L, Madhi SA: **Distribution of *pilus* islands of group B streptococcus associated with maternal colonization and invasive disease in South Africa.** *J Med Microbiol* 2013, **62**(Pt 2):249-253.
30. Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK, Wessels MR: **Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci.** *Infect Immun* 1992, **60**(10):3986-3993.
31. Pritzlaff CA, Chang JC, Kuo SP, Tamura GS, Rubens CE, Nizet V: **Genetic basis for the beta-haemolytic/cytolytic activity of group B *Streptococcus*.** *Mol Microbiol* 2001, **39**(2):236-247.
32. Doran KS, Chang JC, Benoit VM, Eckmann L, Nizet V: **Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8.** *J Infect Dis* 2002, **185**(2):196-203.
33. Liu GY, Doran KS, Lawrence T, Turkson N, Puliti M, Tissi L, Nizet V: **Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(40):14491-14496.
34. Ring A, Braun JS, Pohl J, Nizet V, Stremmel W, Shenep JL: **Group B streptococcal beta-hemolysin induces mortality and liver injury in experimental sepsis.** *J Infect Dis* 2002, **185**(12):1745-1753.
35. Doran KS, Liu GY, Nizet V: **Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis.** *J Clin Invest* 2003, **112**(5):736-744.
36. Baker JR, Pritchard DG: **Action pattern and substrate specificity of the hyaluronan lyase from group B streptococci.** *Biochem J* 2000, **348 Pt 2**:465-471.
37. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA: **CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting.** *Am J Infect Control* 2008, **36**(5):309-332.
38. Facklam RR, Padula JF, Wortham EC, Cooksey RC, Rountree HA: **Presumptive identification of group A, B, and D streptococci on agar plate media.** *J Clin Microbiol* 1979, **9**(6):665-672.
39. de-Paris F, Machado AB, Gheno TC, Ascoli BM, Oliveira KR, Barth AL: **Group B *Streptococcus* detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women.** *Braz J Infect Dis* 2011, **15**(4):323-327.
40. Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G, Baldassarri L, Orefici G, Creti R: **A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*.** *J Microbiol Methods* 2010, **80**(2):212-214.

41. CLSI: **CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth informational supplement. Documento M100-S22.** CLSI. Wayne, PA. 2012.
42. Seppala H, Nissinen A, Yu Q, Huovinen P: **Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland.** *J Antimicrob Chemother* 1993, **32**(6):885-891.
43. HALL TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl Acids Symp Ser* 1999, **41**:95-98.
44. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(17):3389-3402.
45. Smith RF, Willett NP: **Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms.** *Appl Microbiol* 1968, **16**(9):1434-1436.
46. Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, Wessels MR, Paulsen IT, Nelson KE, Margarit I, Read TD *et al*: **Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(19):12391-12396.
47. Sitkiewicz I, Green NM, Guo N, Bongiovanni AM, Witkin SS, Musser JM: **Transcriptome adaptation of group B *Streptococcus* to growth in human amniotic fluid.** *PLoS ONE* 2009, **4**(7):e6114.
48. Yang Q, Zhang M, Harrington DJ, Black GW, Sutcliffe IC: **A proteomic investigation of *Streptococcus agalactiae* grown under conditions associated with neonatal exposure reveals the upregulation of the putative virulence factor C protein beta antigen.** *Int J Med Microbiol* 2010, **300**(5):331-337.
49. Benchetrit LC, Fracalanza SE, Peregrino H, Camelo AA, Sanches LA: **Carriage of *Streptococcus agalactiae* in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil.** *J Clin Microbiol* 1982, **15**(5):787-790.
50. Simoes JA, Alves VM, Fracalanza SE, de Camargo RP, Mathias L, Milanez HM, Brolazo EM: **Phenotypical characteristics of group B streptococcus in parturients.** *Braz J Infect Dis* 2007, **11**(2):261-266.
51. De Francesco MA, Caracciolo S, Gargiulo F, Manca N: **Phenotypes, genotypes, serotypes and molecular epidemiology of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* in Italy.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012, **31**(8):1741-1747.
52. Uh Y, Kim HY, Jang IH, Hwang GY, Yoon KJ: **Correlation of serotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus agalactiae*.** *Yonsei Med J* 2005, **46**(4):480-483.
53. Spellerberg B, Pohl B, Haase G, Martin S, Weber-Heynemann J, Luttkicken R: **Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of *Streptococcus agalactiae* by ISS1 transposition.** *J Bacteriol* 1999, **181**(10):3212-3219.
54. Forquin MP, Tazi A, Rosa-Fraile M, Poyart C, Trieu-Cuot P, Dramsi S: **The putative glycosyltransferase-encoding gene *cylJ* and the group B *Streptococcus* (GBS)-specific gene *cylK* modulate hemolysin production and virulence of GBS.** *Infect Immun* 2007, **75**(4):2063-2066.
55. Sagar A, Klemm C, Hartjes L, Mauerer S, van Zandbergen G, Spellerberg B: **The  $\beta$ -Hemolysin and Intracellular Survival of *Streptococcus agalactiae* in Human Macrophages.** *PLoS ONE* 2013, **8**(4):e60160.
56. Merritt K, Jacobs NJ: **Characterization and incidence of pigment production by human clinical group B streptococci.** *J Clin Microbiol* 1978, **8**(1):105-107.
57. Milligan TW, Baker CJ, Straus DC, Mattingly SJ: **Association of elevated levels of extracellular neuraminidase with clinical isolates of type III group B streptococci.** *Infect Immun* 1978, **21**(3):738-746.
58. Granlund M, Oberg L, Sellin M, Norgren M: **Identification of a novel insertion element, IS1548, in group B streptococci, predominantly in strains causing endocarditis.** *J Infect Dis* 1998, **177**(4):967-976.

## 5 ARTIGO 2

### **Distribuição de *Pili* e Associação entre Adesão em Células HeLa e Formação de Biofilme em *Streptococcus agalactiae* Isolados de Microbiota Humana**

*Streptococcus agalactiae*, pertencente ao grupo B de Lancefield (EGB - estreptococo do grupo B) pode ser encontrado na microbiota humana, colonizando principalmente o trato gastrintestinal e geniturinário (MCCORD et al., 2001). Em mulheres durante a gravidez ou no período pós-parto, a colonização do trato genital com EGB geralmente é assintomática, mas é estimado que 7% das gestantes apresentam densidades celulares significantes na urina (MULLER et al., 2006), podendo haver manifestações clínicas que incluem infecções do trato urinário, corioamnionite, infecções associadas à cesariana ou episiotomia, sepsis puerperal e, ocasionalmente, meningite, tromboflebite séptica ou outras complicações. Também é um patógeno importante que pode causar bacteremia, meningite e pneumonia, principalmente em recém-nascidos (SCHRAG et al., 2000).

A infecção em recém-nascidos pode ser classificada como doença neonatal de início precoce (EOD - *early-onset disease*) ou de início tardio (LOD - *late-onset disease*). No primeiro caso, a colonização vaginal materna está fortemente associada ao desenvolvimento da doença, cuja evolução ocorre nas primeiras 24 horas até o 7º dia pós-nascimento. As principais manifestações clínicas são sepse e pneumonia graves, e em menor frequência, meningite (SCHUCHAT, 1999). A doença de início tardio ocorre após o 7º dia até 3 meses e caracteriza-se pela presença de bacteremia com alto risco de evolução para meningite (POYART et al., 2003).

EGB é eficientemente capaz de se adaptar a ambientes diferentes durante o curso da infecção, garantindo sua sobrevivência nesses sítios (RAJAGOPAL, 2009). Esta adaptação ocorre devido a presença de fatores de virulência que estão envolvidos, além da sobrevivência intracelular, invasão e persistência bacteriana no hospedeiro, sendo responsáveis pelo dano, degradação do tecido, resistência à fagocitose, e promoção da aderência e colonização (NIZET; RUBENS, 2000).

A cápsula é um dos fatores de virulência mais bem caracterizado (KLINE et al., 2012). Em EGB, a cápsula é constituída por D-galactose, D-glicose e ácido siálico (JENNINGS; ROSELL; KASPER, 1980) e permite a sua classificação em 10 diferentes tipos capsulares [Ia, Ib, II-IX (SLOTVED et al., 2007)]. O ácido siálico é um componente comumente encontrado em células de vertebrados, dificultando seu reconhecimento pelo

sistema imune do hospedeiro. Desse modo, a cápsula interfere com a opsonização de C<sub>3</sub> sobre a superfície bacteriana impedindo a fagocitose por macrófagos e neutrófilos (MARQUES et al., 1992).

A aderência em células epiteliais é um evento importante na patogênese da sepse neonatal, uma vez que a colonização vaginal e retal, precede a invasão de células epiteliais respiratórias. Estudos com mutantes deficientes para cápsula sugerem que esta estrutura não é necessária para adesão em células epiteliais (TAMURA et al., 1994).

A estrutura *pilus* ou fimbria é conhecida por exercer um papel importante na adesão e colonização no tecido humano (TELFORD et al., 2006).

Após o primeiro relato do *pilus* de isolados de EGB em 2005 (LAUER et al., 2005) novos estudos quanto ao seu potencial envolvimento na ligação e adesão à célula hospedeira, bem como sua associação com a habilidade de colonização e invasão, interação com componentes da matriz extracelular e formação de biofilmes, vêm sendo realizados (DRAMSI et al., 2006; HO et al., 2012; KONTO-GHIORGHI et al., 2009; MAISEY et al., 2007; RINAUDO et al., 2010). Cada isolado de EGB possui um ou dois *pili*, dos três identificados como PI-1, PI-2a e PI-2b (MARGARIT et al., 2009). Estudos recentes envolvendo a importância do *pilus* na adesão celular *in vitro* e formação de biofilme mostram que o *pilus* PI-1 parece não mediar a adesão em células epiteliais e que apenas a presença do *pilus* PI-2a contribui para formação do biofilme (JIANG et al., 2012; RINAUDO et al., 2010).

Poucos trabalhos envolvendo a distribuição de *pili* e tipos capsulares de isolados de EGB no Brasil são encontrados na literatura. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi pesquisar as variantes de *pili* encontradas nos isolados de EGB obtidos no Hospital Universitário de Londrina-PR, Brasil, e avaliar a associação entre a presença de *pili* com a tipagem capsular, capacidade de adesão em células HeLa e formação de biofilme.

## **Materiais e Métodos**

### *Microrganismos*

Noventa e dois isolados de *Streptococcus agalactiae* provenientes de pacientes colonizados, na cidade de Londrina, Paraná, Brasil, entre Março a Setembro de 2012, no Hospital Universitário de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil, foram selecionados da coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia Clínica da UEL. Os isolados foram

classificados de acordo com as definições preconizadas pelo CDC para infecções relacionadas à assistência em saúde. (HORAN; ANDRUS; DUDECK, 2008).

As características clínicas e demográficas de pacientes que apresentaram cultura positiva para *Streptococcus agalactiae* foram extraídas das fichas de notificação de infecção da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e de dados das culturas realizadas pelo setor de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do HU computados pelo sistema informatizado Labhos.

Os isolados clínicos foram criopreservados à -20 °C em caldo de tripticaseína de soja (TSB, Oxoid) acrescido de 20% (v/v) de glicerina e 5% (v/v) de sangue desfibrinado de carneiro (Newprov).

#### *Identificação e tipagem capsular dos isolados de EGB*

Os isolados clínicos foram cultivados em Mueller Hinton Ágar (HIMEDIA) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro por 24 horas a 37 °C de EGB foram classificados em tipos de Ia a IX, mediante a utilização da reação de multiplex-PCR descrita por Imperi et al. (2010).

#### *Detecção por PCR dos genes que codificam os pili de EGB*

#### *Análise por bioinformática e desenho dos oligonucleotídeos iniciadores*

As sequências nucleotídicas dos genes de *Streptococcus agalactiae* foram obtidas no banco de dados *GenBank* disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> e alinhadas utilizando o programa *ClustalW* (HALL, 1999). Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados a partir das sequências-consenso obtidas para os genes dos *pili* PI-1, PI-2a, PI-2b de *Streptococcus agalactiae* (Tabela 1).

**Tabela1** – Sequência de oligonucleotídeos para detecção de genes que codificam variantes de *pili* de EGB.

Genes	Sequências (5' → 3')	Amplicons (pB)	GenBank Access
PI-1	F: AACCACTAGCAGGCGTTGTCTTTG R: TGAGCCCGGAAATTCTGATATGCC	147	EU929540.1 / EU92515.1 / EU929469.1
PI-2b	F: AAGTCTTGACCAAGGATACGACGC R: ATCGTGTTACTTGCCCTGCGTA	152	EU929426.1/EU92391.1
PI-2a	F: GCCGTTAGATGTTGTCTTCGTA R: TTTACTGCGGTCCCAAGAGCTTC	117	EU929374.1 / EU929330.1

*Extração de material genético*

A extração do DNA foi feita de acordo com de-Paris et al. (2011), com modificações. Os isolados clínicos foram inoculados em 3 mL de TSB e incubados a 37 °C por 24 horas. Após a centrifugação da cultura a 10,000 x g por 5 minutos o sedimento celular foi submetido à duas lavagens, sendo a primeira com 300 µL de uma solução de tampão fosfato contendo 13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 (PBS) e a segunda com 300 µL de uma solução contendo 10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,4 (TE), seguido de resuspensão em 50 µL de TE e incubação a 100 °C por 20 minutos. Após centrifugação a 10,000x g por 10 minutos, o sobrenadante foi utilizado para a PCR

As reações de amplificações foram efetuadas no termociclador Veriti® 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems) em um volume final de 25 µL, contendo 2,0 µL de DNA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de cada dNTP, 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 2.5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: 1 minuto a 95 °C para uma desnaturação inicial; seguida por 35 ciclos, com desnaturação a 95 °C por 30 segundos, hibridação a 60 °C por 1 minuto e polimerização a 72 °C por 45 segundos, e um ciclo final de extensão a 72 °C por 7 minutos.



### *Eletroforese em gel de agarose*

A migração do DNA em gel de agarose 2,5% foi realizada em sistema de gel submerso em tampão TBE (89 mM Tris base; 89 mM Ácido bórico; 2 mM EDTA; pH 8,3). Os amplicons e um padrão de massa molecular (100 pb Ladder - Invitrogen) foram misturados ao tampão de amostra para DNA (Ficoll 400 2,5%; Azul de bromofenol 0,025%; Xileno cianol FF 0,025%) e GelRed™ aplicados em gel de agarose. O sistema foi submetido a uma diferença de potencial (70 a 90 V) com amperagem constante. As moléculas de DNA foram observadas em comprimento de onda ultravioleta (260 nm) no aparelho LPIX Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia).

### *Sequenciamento dos produtos de PCR*

Para avaliar a identidade dos amplicons, as sequências nucleotídicas foram determinadas pelo método descrito por Sanger et al. (1977) modificado, utilizando o protocolo para Big Dye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram aplicadas no sequenciador automático 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). A identidade das sequências foi confirmada utilizando-se o algoritmo Blast (ALTSCHUL et al., 1997) da página do “National Center for Biotechnology Information – NCBI” vinculado ao “National Institute of Health – NIH” ([www.ncbi.nlm.nih.org](http://www.ncbi.nlm.nih.org)).

### *Detecção da formação de biofilme em placa de poliestireno*

O ensaio para formação de biofilme foi avaliado conforme a metodologia descrita por Borges et al. (2012) em TSB pH 6,5, e incubação a 37 °C por 24 horas. Os testes foram feitos em quintuplicata com duas repetições. A densidade óptica foi avaliada em comprimento de onda de 490nm em leitora de placa (EPSON Action Printer 2000) e o *cut-off* (DOc) definido de acordo com a metodologia descrita.

### *Determinação da adesão em células HeLa*

A adesão em células HeLa ATCC CCL-2 (adquiridas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil) foi avaliada pela metodologia descrita por Craviotto et al. (1979),

com modificações. Cada isolado bacteriano foi inoculado em placa de ágar sangue e incubado por 24 horas a 37 °C. As células HeLa foram cultivadas em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 mg/mL estreptomicina e 0,25 mg/mL de anfotericina B, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 horas. O meio foi removido e as células foram submetidas a três lavagens com PBS e posterior adição de 1 mL de DMEM contendo 2 mM glutamina e 0,25 mg/mL anfotericina B. A densidade celular de todos os isolados de EGB foi ajustada de acordo com a escala de 1,0 McFarland ( $3,0 \times 10^8$ ) em PBS. Em seguida, 100 µL de cada suspensão celular foram adicionados nos poços contendo as células HeLa. A placa foi incubada por 3 horas e meia para adesão e 4 horas para o período de multiplicação. Após inoculação bacteriana foram realizadas apenas duas lavagens com PBS em toda a metodologia. Os testes foram feitos em duplicata.

## Resultados

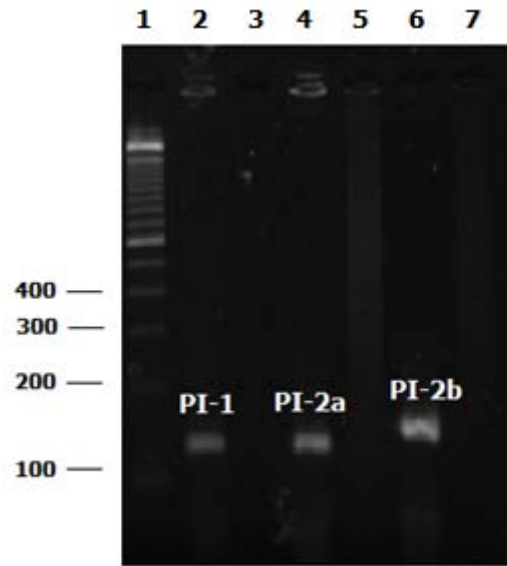
### *Detecção de pili PI-1 e PI-2*

Foram estudados um total de 92 isolados de colonização, sendo a maioria de tipo Ia (n=37), seguido do V (n=28), III (n=14), II (n=12) e IX (n=1). Todos os isolados carregaram pelo menos uma variante de *pilus*. No total, a maioria apresentou o *pilus* PI-2a (n=78/ 84,8%), seguido de PI-1 (n=54/ 58,7%) e PI-2b (n=14/ 15,2%). Não foram encontradas amostras contendo apenas o *pilus* PI-1 e a combinação PI-2a e PI-2b.

### *Sequenciamento*

A identidade dos amplicons foi verificada após sequenciamento do amplicon e análise utilizando-se o BLAST, onde obteve-se identidade acima de 90% para todas as sequências analisadas.

**Figura 1** – Eletroforese em gel de agarose 2,5%, com marcador de 100PB, para os genes PI-1a (147PB); PI-2a(117PB); PI-2b (152PB).



A presença de *pili* nos diferentes tipos capsulares se encontra na Tabela 2. Todos os tipos capsulares, com exceção do IX, apresentaram tanto PI-1 como PI-2a. Nove isolados do tipo Ia apresentaram apenas o *pilus* PI-2b. O *pilus* PI-2a isoladamente foi verificado principalmente no tipo Ia (n=26), seguido do V (n=2) e IX (n=1). A combinação PI-1 e PI-2b foi encontrada apenas no tipo III, já a combinação entre as fímbrias PI-1 + PI-2a foi observada em todos os tipos capsulares, com exceção do tipo IX.

**Tabela 2** – Distribuição dos tipos capsulares e ilha de *pilus* de 92 isolados de *Streptococcus agalactiae* de pacientes do Hospital Universitário de Londrina.

Tipo capsular	Isolados	PI-2a		PI-2b		PI-1 + PI-2a		PI-1 + PI-2b	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Ia	37	26	70,3	9	24,3	2	5,4		
II	12					12	100		
III	14					9	64,3	5	35,7
V	28	2	7,1			26	92,9		
IX	1	1	100						

### *Formação de biofilme e adesão de EGB em células HeLa entre os diferentes tipos capsulares*

Todos os isolados apresentaram capacidade de adesão em células HeLa e formação de biofilme em placa de poliestireno, com exceção de um isolado não formador de biofilme, independente do tipo capsular.

### **Discussão**

Nossos resultados mostraram que todos os isolados carregaram pelo menos uma variante de *pilus*, estando de acordo com estudos anteriores (HO et al., 2012; MADZIVHANDILA et al., 2013; MARGARIT et al., 2009). No total, o *pilus* PI-2a (n=78/ 84,8%) foi o mais encontrado, seguido de PI-1 (n=54/ 58,7%) e PI-2b (n=14/ 15,2%), o que foi compatível com os resultados obtidos por Martins et al. (2013). Esses autores detectaram 79% de *pilus* tipo PI-2a, seguido de 70% de PI-1 e 21% de PI-2b nos isolados de EGB analisados.

A combinação PI-1 e PI-2a (n=49 / 53,3%) foi a mais frequente, dentre os quais 36 pertenciam a mulheres em idade fértil, enquanto o *pilus* PI-2b (n=9/ 9,78%) tanto em combinação com o PI-1 (n=5 / 5,4%) quanto isoladamente foi o *pilus* menos frequente. Outros autores sugerem que a presença concomitante de PI-1 e PI-2a é mais comum em isolados provenientes de colonização, enquanto a combinação de PI-1 e PI-2b é mais encontrado em isolados de doenças invasivas (MADZIVHANDILA et al., 2013). Em uma pesquisa feita em Taiwan por Ho et al. (2012), que estudaram isolados de EGB de gestantes, foi verificada a presença da combinação de PI-1 e PI-2a (75%), PI-1 mais PI-2b (14%), e PI-2a (11%), entretanto, contrariamente ao que observamos, não foram encontrados isolados contendo apenas o *pilus* PI-2b, que representou em nosso estudo 9 isolados de tipo Ia.

Quanto à correlação entre tipos de *pili* e tipos capsulares, o *pilus* PI-2a isoladamente foi verificado principalmente no tipo Ia (n=26) enquanto o III, em sua maioria, esteve associado com a combinação de PI-1 e PI-2b (n=5), compatível com estudos anteriores (MADZIVHANDILA et al., 2013; MARGARIT et al., 2009). Entretanto, os isolados que carregaram unicamente o *pilus* PI-2b pertenceram ao tipo Ia, enquanto Margarit et al. (2009) encontrou apenas isolados de tipo IV com essa característica. De acordo com os resultados de outros trabalhos, a presença do PI-2a isoladamente é restrito ao complexo clonal CC23, na qual o tipo Ia é predominante em isolados humanos, enquanto a aquisição do PI-2b é menos frequente, sendo associado com o complexo clonal CC17 e ao tipo III (MARTINS et al.,

2013). Em nosso estudo os isolados de tipo III que continham PI-2b foram obtidos, em sua maioria (n=4, 80%) de mulheres colonizadas por EGB em idade reprodutiva. Este tipo capsular é importante por constituir uma linhagem hipervirulenta que possui associação com doenças tardias em recém-nascidos (MARTINS et al., 2013).

Todos os isolados estudados apresentaram capacidade de se aderir nas células HeLa, fator importante já que a adesão nas superfícies das células do hospedeiro permite a colonização da mucosa. Quanto à formação de biofilme sabe-se que em EGB o seu controle é multifatorial, sendo modulado geneticamente e por fatores ambientais como meio de crescimento e pH (HO et al., 2012). No entanto o pH ótimo ainda é controverso. Borges et al. (2012), observaram em seus isolados uma maior produção de biofilme em pH 6,5 comparado ao pH 4,2 e 5,5, assim como Kaur et al. (2009) concluíram que o aumento do pH favorece a formação de biofilme. Entretanto, Ho et al. (2012) através da correlação entre a capacidade de formação de biofilme e tipo capsular observaram que 96% de seus isolados que carreavam *pilus* PI-2a e todos com PI-2b formaram biofilme em pH 4,5, enquanto em pH 7,0 apenas 10 % das amostras com *pilus* PI-2a foram formadores de biofilme. Na metodologia utilizada para observação qualitativa da formação de biofilme não foi necessária a suplementação com glicose. Estudos indicam que a ausência de glicose em meio TSB favorece a formação de biofilme (KAUR et al., 2009), além disso, a formação é reduzida em meios de culturas mais ricos como o caldo Todd-Hewitt quando comparado com meios menos nutritivos como RPMI (KONTO-GHIORGHI et al., 2009).

Ainda não existe um consenso quanto aos diferentes tipos capsulares de EGB e capacidade de formação de biofilme. Enquanto em nosso estudo todos os isolados foram formadores de biofilme independente do tipo capsular, Ho et al. (2012) verificaram que os tipos III e V combinados, eram significativamente mais formadores de biofilme que os tipos Ia e Ib ( $p < 0,05$ ). No entanto, contrariamente, Kaur et al. (2009) verificaram que a maioria dos produtores de biofilme pertenceram ao tipo Ia (47%), seguido de Ib (29%), NT (15%), III (6%) e V (6%).

A formação de biofilme é um exemplo típico de como a bactéria utiliza vários componentes para um mesmo objetivo, neste caso para a colonização da superfície da mucosa do hospedeiro (RINAUDO et al., 2010). A colonização por EGB pode ser transitória, intermitente ou de longo prazo (GOODMAN et al., 1997; HANSEN et al., 2004), deste modo estudos envolvendo adesão e a formação de biofilme são necessários para que haja um maior entendimento sobre os fatores que influenciam na colonização materna. Rinaudo et al. (2010) através da deleção e complementação verificou que o gene que codifica PI-2a é o único *pilus*

envolvido na formação de biofilme, no entanto, em nosso estudo a maioria dos isolados foram formadores mesmo com a ausência do *pilus* PI-2a, sugerindo a participação de outros fatores neste processo e indicando a necessidade de novos estudos envolvendo formação de biofilme.

A administração de antibiótico intraparto em mães colonizadas por EGB diminui a incidência de infecção em recém-nascidos, entretanto para que uma prevenção efetiva dure por um longo período é necessário o desenvolvimento de uma vacina de ampla cobertura (KREIKEMEYER et al., 2011). A necessidade da identificação de antígenos de superfície, como o *pilus* que se encontra conservado na maioria dos isolados de EGB pode permitir o desenvolvimento de uma vacina com ou sem o complemento de antígenos polissacarídicos (MARGARIT et al., 2009). Entretanto, existe a necessidade de um estudo epidemiológico global para que a vacina desenvolvida seja eficaz não só no País de desenvolvimento. Nosso estudo mostrou que todos os tipos capsulares encontrados possuíram um ou dois tipos de *pili* similar ao observado em estudos anteriores (MADZIVHANDILA et al., 2013; MARGARIT et al., 2009), mostrando que o desenvolvimento de uma vacina contendo essas proteínas de superfície pode ser eficaz também para o Brasil.

### Referência Bibliográfica

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BORGES, S.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 677-682, 2012.

CRAVIOTTO, A. et al. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 3, p. 95-99, 1979.

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.

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

GOODMAN, J. R. et al. Longitudinal study of group B *streptococcus* carriage in pregnancy. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 5, n. 3, p. 237-243, 1997.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HANSEN, S. M. et al. Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 83-89, 2004.

- HO, Y. R. et al. The enhancement of biofilm formation in Group B streptococcal isolates at vaginal pH. **Med Microbiol Immunol**, 2012.
- HORAN, T. C.; ANDRUS, M.; DUDECK, M. A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **Am J Infect Control**, v. 36, n. 5, p. 309-332, 2008.
- IMPERI, M. et al. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. **J Microbiol Methods**, v. 80, n. 2, p. 212-214, 2010.
- JENNINGS, H. J.; ROSELL, K. G.; KASPER, D. L. Structure and serology of the native polysaccharide antigen of type Ia group B streptococcus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 77, n. 5, p. 2931-2935, 1980.
- JIANG, S. et al. Regulation and function of *pilus* island 1 in group B streptococcus. **J Bacteriol**, v. 194, n. 10, p. 2479-2490, 2012.
- KAUR, H. et al. Biofilm formation in clinical isolates of group B streptococci from north India. **Microb Pathog**, v. 46, n. 6, p. 321-327, 2009.
- KLINKE, K. A. et al. Immune modulation by group B *Streptococcus* influences host susceptibility to urinary tract infection by uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 80, n. 12, p. 4186-4194, 2012.
- KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- KONTO-GHIORGHI, Y. et al. Dual role for *pilus* in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 5, p. e1000422, 2009.
- KREIKEMEYER, B. et al. Genomic organization, structure, regulation and pathogenic role of *pilus* constituents in major pathogenic Streptococci and Enterococci. **Int J Med Microbiol**, v. 301, n. 3, p. 240-251, 2011.
- LAUER, P. et al. Genome analysis reveals *pili* in Group B *Streptococcus*. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 105, 2005.
- MADZIVHANDILA, M. et al. Distribution of *pilus* islands of group B streptococcus associated with maternal colonization and invasive disease in South Africa. **J Med Microbiol**, v. 62, n. Pt 2, p. 249-253, 2013.
- MAISEY, H. C. et al. Group B streptococcal *pilus* proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. **J Bacteriol**, v. 189, n. 4, p. 1464-1467, 2007.
- MARGARIT, I. et al. Preventing bacterial infections with *pilus*-based vaccines: the group B streptococcus paradigm. **J Infect Dis**, v. 199, n. 1, p. 108-115, 2009.
- MARQUES, M. B. et al. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. **Infect Immun**, v. 60, n. 10, p. 3986-3993, 1992.

- MARTINS, E. R. et al. Distribution of *Pilus* Islands in *Streptococcus agalactiae* That Cause Human Infections: Insights into Evolution and Implication for Vaccine Development. **Clin Vaccine Immunol**, v. 20, n. 2, p. 313-316, 2013.
- 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.
- MULLER, A. E. et al. Morbidity related to maternal group B streptococcal infections. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 85, n. 9, p. 1027-1037, 2006.
- NIZET, V.; RUBENS, C. E. Pathogenic mechanisms and virulence factors of group B streptococci. In: **The Gram-Positive Pathogens**. Washington, D.C: ASM Press, 2000.
- POYART, C. et al. Genetic basis of antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French hospital. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 2, p. 794-797, 2003.
- RAJAGOPAL, L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. **Future Microbiol**, v. 4, n. 2, p. 201-221, 2009.
- RINAUDO, C. D. et al. Specific involvement of *pilus* type 2a in biofilm formation in group B *Streptococcus*. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9216, 2010.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- 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.
- SCHUCHAT, A. Group B *streptococcus*. **Lancet**, v. 353, n. 9146, p. 51-56, 1999.
- SLOTVED, H. C. et al. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 9, p. 2929-2936, 2007.
- TAMURA, G. S. et al. Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. **Infect Immun**, v. 62, n. 6, p. 2450-2458, 1994.
- TELFORD, J. L. et al. *Pili* in gram-positive pathogens. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 7, p. 509-519, 2006.



## 6 CONCLUSÃO

1. Dentre os isolados estudados o tipo Ia foi o mais frequente, seguido pelos tipos V, II, III, IX e NT.
2. Os isolados de EGB foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos como: penicilina G, ampicilina, vancomicina, levofloxacina, cloranfenicol, cefepime e cefotaxima.
3. Observou-se uma correlação entre fenótipos de resistência iMLS<sub>B</sub>, cMLS<sub>B</sub> e M e presença de genes de resistência *ermA*, *ermB* e *mefA/E*.
4. Todos os isolados possuíram o gene *cfb* e foram produtores do fator CAMP em placa de ágar sangue
5. Os genes *hylB* e *cylE* estiveram presentes em todos os isolados de EGB, entretanto 4.8% e 18.1% não expressaram esses genes, respectivamente.
6. Todos os isolados carregaram pelo menos uma variante de *pilus*. Sendo que a maioria apresentou o *pili* PI-2a , seguido de PI-1 e PI-2b.
7. A combinação PI-1 e PI-2a foi a mais observada. O *pilus* PI-2b tanto em combinação com o PI-1 quanto isoladamente foi o *pilus* menos frequente.
8. Todos os isolados apresentaram adesão em células HeLa e formação de biofilme em placa de poliestireno, com exceção de um isolado não formador de biofilme, independente do tipo capsular.

**ANEXO**

**Tabela 1 –** Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de EGB (n=92) analisados pelo método de disco-difusão.

<b>Perfil de Susceptibilidade</b>			
<b>Agentes antimicrobianos</b>	<b>Sensível</b>	<b>Intermediário</b>	<b>Resistente</b>
Penicilina	92	0	0
Ampicilina	92	0	0
Cefepime	92	0	0
Cefotaxima	92	0	0
Levofloxacina	92	0	0
Cloranfenicol	92	0	0
Clindamicina	80	0	12
Eritromicina	75	0	17

**Tabela 2 –** Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de EGB (n=92) analisados pelo método de diluição em ágar.

<b>Antimicrobianos</b>	<b>CIM µg/mL</b>		<b>%</b>		<b>Pontos de corte</b>		
	<b>Concentrações testadas</b>	<b>CIM<sub>50</sub></b>	<b>CIM<sub>90</sub></b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>
Ampicilina	0,015 - 0,5	0,06	0,06	100	0	≤ 0,25	NA
Vancomicina	0,06 - 2,0	0,5	0,5	100	0	≤ 1	NA
Eritromicina	0,03 - 8,0	0,25	4,0	83	17	≤ 0,25	≥ 1,0
Clindamicina	0,03 - 8,0	0,03	0,06	98	2	≤ 0,25	≥ 1,0

CIM<sub>50</sub>: concentração do antimicrobiano em que 50% dos isolados foram inibidos. CIM<sub>90</sub>: concentração do antimicrobiano em que 90% dos isolados foram inibidos. NA - Não aplicável.

**Figura 1** – Eletroforese em gel de agarose 2,5 %, com marcador de 100 PB, para os genes *cylE* (130PB); *hylB* (124PB); *ermA* (190PB); *ermB* (117PB); *mefA/E* (225PB); *cfb* (139PB).

