



Evolução de genótipos de *Streptococcus agalactiae* associados a colonização na grávida

Inês Filipa Palão Silvestre

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica

Dezembro de 2013



Evolução de genótipos de *Streptococcus agalactiae* associados a colonização na grávida

Inês Filipa Palão Silvestre

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica

Orientadora: Professora Doutora Ilda Santos Sanches, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL).

Co-orientadoras: Doutora Maria José Borrego, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA); Professora Doutora Rita Castro, Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT/UNL).

A parte experimental deste trabalho foi realizada no Departamento de Doenças Infecciosas, Laboratório Nacional de Referência das Infecções Sexualmente Transmissíveis (DDI/URST) do INSA e no Departamento de Ciências da Vida, Centro de Recursos Microbiológicos (DCV/CREM) da FCT/UNL.

O texto da presente Dissertação não segue o novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa.

Dezembro de 2013

Elementos bibliográficos resultantes da dissertação

Artigo submetido para publicação na revista *Eurosurveillance* (<http://www.eurosurveillance.org/>):

Florindo, C., V. Damião, I. Silvestre, C. Farinha, F. Rodrigues, F. Nogueira, F. Martins-Pereira, R. Castro, M. J. Borrego, I. Santos-Sanches, and the Group for the Prevention of Neonatal GBS Infection. Recent trends in colonizing group B *Streptococcus* epidemiology in Portugal (2005-2012): emergence of a new epidemic type IV/CC17 clone.

Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio incondicional de diversas pessoas. Aqui expresso algumas palavras de agradecimento que seguramente serão insuficientes na representação de toda a minha gratidão e reconhecimento.

À minha orientadora, Professora Doutora Ilda Sanches, e co-orientadora, Doutora Maria José Borrego, por todo o acompanhamento, simpatia e disponibilidade demonstradas. À co-orientadora Professora Doutora Rita Castro pelas estirpes gentilmente cedidas.

Ao Departamento de Doenças Infecciosas do Laboratório Nacional de Referência das Infecções Sexualmente Transmissíveis (DDI/URST) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) e ao Departamento de Ciências da Vida do Centro de Recursos Microbiológicos (DCV/CREM) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL) pelas condições disponibilizadas para a realização do presente trabalho.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Ministério da Educação e Ciência, pelo financiamento do projecto de I&D ref. PTDC/SAU-MII/105114/2008 que inclui o tema da presente Dissertação e projecto estratégico ref. PEst-OE/BIA/UI0457/2011-CREM (Centro de Recursos Microbiológicos).

A todos os membros do Laboratório Nacional de Referência das Infecções Sexualmente Transmissíveis do INSA pelo acolhimento, simpatia e prestabilidade e, em particular, aos mestres Carlos Florindo e Vera Damião pela colaboração na minha integração e por toda a dedicação e disponibilidade demonstradas ao longo de todo este percurso, contribuindo de forma fulcral para a minha motivação e para o enriquecimento dos meus conhecimentos científicos.

Aos mestres Patrícia Guimarães, Filipe Rodrigues, Vera Damião e Catarina Farinha pela cedência dos dados referentes às estirpes anteriormente trabalhadas.

À minha família e aos meus amigos por estarem sempre presentes. Agradeço todo o carinho, compreensão e incentivo. Ao Alexandre Salvador, um agradecimento especial pelo apoio, paciência e transmissão de confiança. A todos agradeço que tenham sempre acreditado que seria possível.

“We must find time to stop and thank the people who make a difference in our lives.”

John F. Kennedy

Resumo

Streptococcus agalactiae, uma das causas mais comuns de infecção neonatal, pode causar quadros de pneumonia, sépsis e meningite em recém-nascidos, sendo responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade em adultos imunodeprimidos. No presente estudo foi feita uma análise da tendência de distribuição dos serótipos de *S. agalactiae* numa colecção de 953 estirpes de colonização isoladas de exsudados vaginais e/ou rectais de mulheres em idade fértil (15-49 anos de idade), entre 2005-2012, em sete instituições de saúde de Portugal continental. Observou-se um aumento notável na frequência do serótipo IV, de 1,4% em 2006 para 19,6% em 2012. A avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos definiu um novo cenário de resistências à eritromicina e à clindamicina, envolvendo sobretudo os serótipos Ib e IV, entre 2010-2012, não tendo sido detectada resistência ou susceptibilidade reduzida à vancomicina ou à penicilina G. O principal objectivo do presente estudo consistiu na caracterização das estirpes *S. agalactiae* do serótipo IV, nomeadamente pela avaliação das DNases, tendo-se verificado que todas as estirpes eram produtoras. Por *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) foi possível identificar dezasseis sequências tipo (ST) e cinco complexos clonais (CC) distintos: CC1, CC12, CC17, CC19 e CC23, sendo os mais frequentes o CC23 (35,2%) e o CC1 (33%), que incluíram 72,7% das estirpes resistentes à clindamicina e 69,2% das resistentes à eritromicina. Foram identificados nove clones hipervirulentos CC17, relacionados com o clone emergente IV/ST291, provavelmente originado por *switching* capsular. A análise molecular destas estirpes revelou a presença do gene *rib*, *IS861* e *GBSi1* na região intergénica *scpB-lmb*, reflexo de clonalidade e de uma hipotética origem comum.

A realização de estudos epidemiológicos com vista à vigilância de clones e linhagens genéticas, monitorização da distribuição de serótipos e dos padrões de resistência aos antibióticos, são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias mais precisas de prevenção das infecções por *S. agalactiae*.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*; colonização; serótipo IV; resistências aos antibióticos; linhagens genéticas; CC17

Abstract

Streptococcus agalactiae, one of the most common causes of neonatal infection, can cause symptoms of pneumonia, sepsis and meningitis in newborns. It is responsible for high rates of morbidity and mortality in pregnant women and other adults, especially among immunocompromized persons. This study aimed to analyze the trend of *S. agalactiae* serotype distribution among a collection of 953 colonization strains, isolated from vaginal and/or rectal swabs of childbearing age women (15-49 years), between 2005 and 2012, in seven health institutions of Portugal. There was a noticeable increase in the frequency of serotype IV, 1.4% in 2006 to 19.6% in 2012. Antimicrobial susceptibility data revealed a new scenario, consisting of changes in susceptibility to erythromycin and clindamycin among serotypes Ib and IV between 2010-2012; however, resistance or reduced susceptibility to vancomycin and to penicillin G were not detected. The main objective of the present study was to characterize *S. agalactiae* strains of serotype IV, namely through the evaluation of DNases production, which was detected among all the strains. By Multi Locus Sequence Typing (MLST) sixteen sequence type (ST) and five distinct genetic lineages were identified: CC1, CC12, CC17, CC19 and CC23, among which CC23 (35,2%) and CC1 (33%) were the most frequent ones, accounting for 72,7% of the clindamycin resistant strains and for 69,2% of the erythromycin resistant. Nine hypervirulent CC17 clones were identified, corresponding to the emerging clone IV/ST291, probably due to capsular switching. Molecular analysis of these strains revealed the presence of *rib*, *IS861* and *GBSi1* in the *scpB-lmb* intergenic region, reflecting clonality and a hypothetical common origin.

Careful monitoring of *S. agalactiae* clones and genetic lineages and continuous examining of serotype distribution and antimicrobial resistance through epidemiological studies are essential to the development of more accurate strategies for prevention of *S. agalactiae* infections.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*; colonization; serotype IV; antimicrobial resistance; genetic lineages; CC17

Índice

Elementos bibliográficos resultantes da dissertação	iii
Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
I – Introdução.....	1
1. O género <i>Streptococcus</i>	1
2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	2
2.1. Serótipos de <i>S. agalactiae</i> : epidemiologia e relevância clínica	2
2.2. Colonização <i>versus</i> Infecção	3
2.3. Prevenção da infecção por antibioterapia.....	5
3. O diagnóstico laboratorial de <i>S. agalactiae</i>	6
4. Profilaxia Antibiótica Intravenosa Intraparto	7
4.1. Resistência aos antibióticos.....	8
4.2. Associação entre serótipos e resistência a antibióticos	9
5. Caracterização molecular das estirpes de <i>S. agalactiae</i>	9
5.1. Linhagem genética ST17	11
5.2. Elementos genéticos móveis como marcadores epidemiológicos.....	12
6. Análise genómica comparativa.....	13
7. Factores de virulência em <i>S. agalactiae</i>	14
7.1. <i>Alpha-like Proteins</i>	15
7.2. DNases.....	15

8. Perspectivas futuras na prevenção da infecção por <i>S. agalactiae</i>	16
9. Objectivo geral.....	17
9.1. Objectivos específicos	18
II – Material e métodos	19
1. Origem das estirpes de <i>S. agalactiae</i>	19
2. Propagação das estirpes de <i>S. agalactiae</i>	20
3. Extracção de DNA	20
4. Serotipagem capsular de <i>S. agalactiae</i>	21
5. Genotipagem capsular de <i>S. agalactiae</i>	21
5.1. Purificação dos produtos amplificados por PCR	22
5.2. Sequenciação dos produtos de PCR purificados	23
5.3. Análise das sequências <i>cpsD-cpsE-cpsF</i>	23
6. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	23
6.1. Detecção dos genes de resistência aos macrólidos	25
7. Avaliação da produção de DNases	25
8. <i>Multi Locus Sequence Typing</i> (MLST).....	26
9. Detecção do clone ST17 de <i>S. agalactiae</i>	26
10. Análise Filogenética	27
11. Detecção dos MGE (<i>Mobile Genetic Elements</i>) IS1548 e GBSi1 na região intergénica <i>scpB-lmb</i>	28
12. Detecção das Sequências de Inserção IS1381, IS861 e ISSa4	28
13. Detecção dos genes da família <i>Alpha-Like Protein</i>	29
III – Resultados	30
1. Análise da distribuição dos serótipos de <i>S. agalactiae</i>	30
2. Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	31
3. Caracterização das estirpes de <i>S. agalactiae</i> do serótipo IV	33

3.1. Avaliação da produção de DNases	33
3.2. Identificação de Linhagens Genéticas por MLST	33
3.3. Relação entre linhagem genética e resistência à eritromicina e clindamicina..	36
3.4. Análise Filogenética	37
3.5. Subcaracterização das linhagens de <i>S. agalactiae</i>	39
IV – Discussão	42
1. Distribuição dos serótipos e dos perfis de resistência aos antibióticos nas estirpes de <i>S. agalactiae</i> da colecção em estudo.....	42
2. Avaliação da actividade das DNases	43
3. Linhagens genéticas e resistência aos antibióticos de segunda linha	43
4. Análise Filogenética	44
5. Subcaracterização das estirpes da linhagem hipervirulenta CC17	45
6. Subcaracterização das estirpes das restantes linhagens genéticas identificadas.....	46
7. Associação entre linhagens genéticas e proteínas da família Alp	47
V – Conclusões	48
VI – Referências Bibliográficas	50
Anexos	65
Anexo 1	66

Índice de Figuras

- Figura 1** – Representação do *cluster* CPS dos vários serótipos (adaptado de Cieslewicz *et al.*, 2005). Os *cpsA-E* e *cps-L* bem como *NeuB*, *-D*, *-A* e *-C* são conservados nos nove serótipos e representados apenas no *cluster* Ia. Entre *cpsH* e *cpsI* foi introduzido um espaço para permitir o alinhamento dos *clusters* para os vários serótipos. 10
- Figura 2** – Distribuição dos serótipos das estirpes de *S. agalactiae* de colonização (n=953) isoladas de mulheres em idade reprodutiva, em Portugal, de 2005 a 2012 30
- Figura 3** – Percentagem dos diferentes serótipos nas estirpes resistentes à eritromicina (A) e clindamicina (B) em Portugal, de 2005 a 2012 32
- Figura 4** – Gráfico circular ilustrativo da distribuição das linhagens genéticas ou complexos clonais (CC) definidos por MLST das 88 estirpes do serótipo capsular IV de *S. agalactiae*..... 34
- Figura 5** – Percentagem do serótipo IV de 2005 a 2010 e proporção das linhagens genéticas ou complexos clonais (CC) por ano de estudo..... 35
- Figura 6** – Árvore filogenética construída com base na análise das sequências dos *loci* de *S. agalactiae* incluídos no MLST. A história evolutiva foi inferida pelo método Neighbor-Joining e as distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método de Kimura-2 parâmetros (unidades do número de substituições de bases por local) 38
- Figura 7** – Gráfico térmico representando os perfis dos biomarcadores moleculares (presença de MGE IS1548 e GBSi1 na região intergénica *scpB-lmb*; sequências de inserção IS1381 e IS861; e genes da família *Alpha-Like Protein*) nos complexos clonais (CC) das 88 estirpes de *S. agalactiae* do serótipo IV 40

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Distribuição anual (2005-2010) das estirpes de <i>S. agalactiae</i> por instituição de saúde.....	20
Tabela 2 – Critérios de avaliação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) em <i>Streptococcus</i> spp. (excepto <i>Streptococcus pneumoniae</i>) (12).....	25
Tabela 3 – Distribuição das resistências à eritromicina e à clindamicina para as 953 estirpes em estudo, de 2005 a 2012	31

Lista de Abreviaturas

ACOG – *American College of Obstetricians and Gynecologists*

Alp – *Alpha-like Proteins*

CC – Complexo Clonal

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI – Concentração Mínima Inibitória

cMLS_B – *Constitutive macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotype*

CPS – *type-specific capsular polysaccharides*

CUF – Hospital CUF Descobertas

DCV/CREM – Departamento de Ciências da Vida, Centro de Recursos Microbiológicos

DDI/URST – Departamento de Doenças Infecciosas, Laboratório Nacional de Referência das Infecções Sexualmente Transmissíveis

DLV – *double-locus variation*

dNTP – *deoxyribonucleotide triphosphate*

eDNA – DNA extracelular

EOD – *Early Onset Disease*

erm – *erythromycin ribosome methylase*

EUA – Estados Unidos da América

FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia

FCT/UNL – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

GBS – *Group B Streptococcus*

HDS – Hospital de Santarém

HE – Hospital D. Estefânia

HGO – Hospital Garcia de Orta

IHMT/UNL – Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

iMLS_B – *induced macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotype*

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

LOD – *Late Onset Disease*

MAC – Maternidade Alfredo da Costa

mef – *macrolide efflux*

MGE – *Mobile Genetic Elements*

min – minutos

MLST – *Multi Locus Sequence Typing*

N.º – Número

NETs – *Neutrophil Extracellular Traps*

NT – Não Tipável

pb – pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

rpm - *revolutions per minute*

s – segundos

ST – *Sequence Type*

SLV – *single-locus variation*

SNP – *single-nucleotide polymorphism*

V – Volts

I – Introdução

1. O género *Streptococcus*

O termo *Streptococcus* deriva dos termos gregos *strepto* (curvo) e *coccus* (esférico). O primeiro registo destes microrganismos, embora ainda sem uma designação associada, ocorreu em 1683 em desenhos de imagens de microscópio de van Leeuwenhoek (70).

Os microrganismos pertencentes ao género *Streptococcus* são catalase negativos e de Gram positivo. Muitas vezes são observados aos pares ou em cadeias, são esféricos, ovóides ou cocos em forma de lanceta, e podem medir até 2 µm de diâmetro. São anaeróbios facultativos e algumas espécies requerem CO₂ para o seu isolamento inicial, podendo perder essa exigência em subcultura (37, 81).

A primeira tentativa de diferenciar os estreptococos terá sido feita em 1903 por Shottmuller, que usou agar com sangue (21). Os estreptococos puderam então ser classificados em β-hemolíticos, α-hemolíticos ou γ-hemolíticos consoante hemolisam completa ou parcialmente os eritrócitos, ou não induzem hemólise (37). A partir de 1933, as estirpes de *Streptococcus* β-hemolíticas foram agrupadas de acordo com a composição em hidratos de carbono da parede, nos grupos de Lancefield (21, 37, 81).

Todos os grupos de Lancefield incluem uma ou mais espécies, por exemplo, grupo A: *Streptococcus pyogenes*, grupo B: *Streptococcus agalactiae* (GBS, de *Group B Streptococcus*), grupo C: *Streptococcus equi* ssp. *equi* e *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae* e, mais recentemente, grupo M: *Streptococcus fryi* (100).

Com base nas sequências genéticas de 16S rRNA, foram definidos grupos que incluem mais de 100 espécies de *Streptococcus*: *Anginosus*, *Pyogenic*, *Bovis*, *Salivarius*, *Mutans* e *Mitis*. O grupo piogénico inclui *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. equi*, *S. dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, e *Streptococcus iniae* (70).

2. *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae foi reconhecido em 1920 como o agente etiológico da mastite bovina e identificado pela primeira vez em 1935 por Lancefield e Hare (57). Nesta altura este microrganismo foi pela primeira vez associado quer a casos de colonização de mulheres assintomáticas quer a casos de sépsis puerperal (3, 51, 57). No entanto, tem sido possível identificar diferenças no genoma entre as estirpes de *S. agalactiae* bovinas e humanas (78).

2.1. Serótipos de *S. agalactiae*: epidemiologia e relevância clínica

S. agalactiae exibe um polissacárido, o antigénio do grupo B, composto por unidades repetidas de ramnose, comum a todas as estirpes (34). Existe ainda outro antigénio, o polissacárido capsular (CPS, de *type-specific capsular polysaccharides*), que tem sido utilizado para distinguir as estirpes de *S. agalactiae* por serotipagem, nomeadamente em estudos epidemiológicos (75, 76). A estrutura do polissacárido capsular de *S. agalactiae* é determinada por genes do *locus cps* que codificam enzimas responsáveis pela síntese dos polissacáridos, reconhecidos por métodos de precipitação ou de aglutinação em látex (8, 74, 76, 90). Assim, os hidratos de carbono de superfície constituem marcadores epidemiológicos capazes de identificar nove tipos capsulares: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII, tendo sido recentemente considerada a existência do serótipo IX (52, 66, 72, 76). Subsistem, no entanto, algumas estirpes não tipáveis (NT), provavelmente por não expressarem o polissacárido capsular devido a inserção ou mutação nos genes capsulares (52, 71, 86, 90).

Tendo em conta que a distribuição dos serótipos varia de acordo com a região geográfica e a origem étnica, a sua monitorização através de investigações epidemiológicas torna-se importante para que se possam adoptar medidas preventivas, nomeadamente o desenvolvimento de vacinas, adequadas a cada população (32, 52, 61).

Nos Estados Unidos da América (EUA), Europa e Austrália os serótipos Ia, II, III e V têm representado 80 a 90% das estirpes de *S. agalactiae* (29, 32, 52, 67), enquanto os serótipos IV, VI, VII, VIII e IX têm sido raramente identificados (32, 52). Já no Japão

são comuns os serótipos VI e VIII (3, 52, 55, 86). Nos últimos anos, 7 a 32% das estirpes de *S. agalactiae* de oito países (distribuídos por todos os continentes, excepto África) foram relatadas como NT (52). A nível mundial, as estirpes do serótipo III são consideradas responsáveis pela maioria dos casos de meningite neonatal (40, 61, 73, 74, 76), enquanto as do serótipo V são mais frequentes na população adulta (excluindo as mulheres grávidas) (32, 76).

Em Portugal os serótipos III e V foram identificados como os mais frequentes na colonização assintomática (44%), enquanto o Ia e o III foram mais frequentes nos casos de doença invasiva (EOD, de *Early Onset Disease*, e LOD, de *Late Onset Disease*, respectivamente) (69%). Entre as estirpes que causaram infecção apenas foram identificadas duas do serótipo IV, um serótipo frequentemente associado a colonização na Ásia mas raramente encontrado como causa de infecções neonatais nos países ocidentais (67). Contudo, a colonização pelo tipo IV tem vindo a ser mais frequente, sendo possível que este serótipo possa vir a emergir como agente patogénico, tal como ocorreu com o serótipo V na década de 1990, uma vez que a sua associação a casos de infecção tem vindo a ser relatada (2, 17, 25, 72, 89, 99). A título de exemplo, nos últimos anos o serótipo IV foi identificado em crianças com doença de início precoce ou tardio (17).

2.2. Colonização versus Infecção

O tracto gastrointestinal é considerado como o mais provável reservatório humano de *S. agalactiae* (41, 64) e é a principal causa de colonização vaginal (51). *S. agalactiae* pode transmitir-se por contacto directo, por via fecal-oral e verticalmente (de mãe para filho) (30, 64).

Estima-se que a maioria dos adultos saudáveis esteja colonizado mas não evidencie sintomas. De facto, mesmo as infecções do trato urinário por *S. agalactiae* são pouco sintomáticas (51); no entanto, a bacteriúria por *S. agalactiae* na mulher grávida é considerada como um marcador de colonização genital (10). Durante a gravidez, *S. agalactiae* pode ser responsável por infecção urinária, corioamnionite, endometrite, sépsis, meningite, tromboflebite pélvica séptica, ruptura prematura de membranas, parto prematuro ou mesmo aborto espontâneo (3, 41, 68, 84).

A frequência de colonização rectovaginal é semelhante em mulheres grávidas e não grávidas e estima-se em 10 a 30% (3, 20). No início dos anos 1960 estabeleceu-se a associação entre a colonização do tracto genital materno por *Streptococcus* e a doença no recém-nascido (3, 51, 81). Mas só em 1979 *S. agalactiae* emergiu como um importante agente patogénico para o Homem, responsável por infecções invasivas, pneumonia, sépsis e meningite durante a primeira semana de vida do recém-nascido, com taxas de mortalidade de 20 a 50% (10, 33, 34, 68, 81). No caso das mulheres grávidas, estima-se que a transmissão de *S. agalactiae* ao recém-nascido seja responsável por 1,8 infecções neonatais por 1.000 nados vivos por ano (3, 20). A proporção de letalidade diminuiu de 50% em 1970, para 4-6% nos últimos anos, principalmente devido à melhoria na prestação de cuidados neonatais (10, 33, 60). A mortalidade é mais elevada nas crianças pré-termo, 10% a 30%, em contraste com os 2 a 3% verificados nas crianças de termo (1, 10).

Durante a vida uterina pode ocorrer contaminação do líquido amniótico por *S. agalactiae* por ruptura ou invasão das membranas, e posterior colonização do tracto respiratório do feto. No entanto, a vasta maioria das infecções ocorre durante o parto por contacto directo com a mucosa vaginal materna colonizada, originando EOD (nos primeiros 7 dias de vida), que se traduz em pneumonia, sépsis e, menos frequentemente, em meningite (10, 39, 81, 84, 85). Existem ainda alguns factores maternos de risco para EOD tais como idade gestacional inferior a 37 semanas, ruptura de membranas superior a 18h, febre intraparto (> 38°C), idade materna jovem ou EOD por *S. agalactiae* em parto anterior (3, 10, 33, 68). O tratamento preventivo (administração intravenosa de antibióticos) é recomendado nas parturientes colonizadas por *S. agalactiae* e naquelas que evidenciem qualquer um destes factores de risco (10).

A implementação de estratégias de prevenção implicou uma diminuição drástica da incidência da EOD (i.e. EUA: de 1,7 para cerca de 0,37 por 1000 nascimentos entre 1993 e 2008; Espanha: de 2,4 para 0,45 por 1000 nascimentos entre 1996 e 2008) (10, 33, 68). No caso dos países subdesenvolvidos têm sido reportadas baixas taxas de incidência da doença (i.e. 0,17/1000 nados vivos na Índia) que, muito provavelmente, reflectem a insuficiente vigilância da EOD (68, 88). No entanto, as variações na incidência da EOD podem ainda estar relacionadas com diferentes taxas de colonização por *S. agalactiae*, diferenças populacionais na susceptibilidade à infecção por *S.*

agalactiae (étnica ou racial), local (hospital ou outro) e tipo de parto, abordagens diagnósticas e ainda com diferenças de virulência entre estirpes de *S. agalactiae* (68). Actualmente estima-se que a profilaxia antibiótica intraparto (penicilina G e ampicilina) tenha uma eficiência de 86-89% na prevenção da EOD em recém-nascidos de mães colonizadas por *S. agalactiae* (3, 10, 23).

Após o parto, a transmissão de *S. agalactiae* pode ocorrer por via horizontal pela amamentação e por contacto directo (material hospitalar, comunidade), dando origem a infecções de início tardio ou LOD (geralmente entre o 1º a 3º meses de vida) (10, 60, 68, 81).

A incidência da LOD tem-se mantido estável (0,4/1000 nados vivos) ao longo dos últimos 20 anos dado não ser evitável pelas estratégias preventivas implementadas para a EOD (68).

Os recém-nascidos que sobrevivem a EOD ou LOD sofrem frequentemente de deficiências de desenvolvimento, incluindo atraso mental e perda auditiva ou de visão (84).

Em adultos não gestantes, e em particular nos idosos e nos indivíduos imunocomprometidos, *S. agalactiae* pode causar bacteriémia, endocardite, infecções da pele e tecidos moles, artrite, pneumonia, meningite e osteomielite (10, 64, 68, 81, 84).

Perante a necessidade de reduzir a morbilidade e mortalidade associadas às infecções por *S. agalactiae* foram adoptadas algumas estratégias de prevenção (15, 21, 39).

2.3. Prevenção da infecção por antibioterapia

Apesar do progresso substancial na prevenção da doença perinatal por *S. agalactiae* desde 1990, esta infecção permanece a principal causa de EOD nos EUA (10, 11). Assim, o rastreio às 35-37 semanas de gravidez e o tratamento intraparto das grávidas portadoras tem sido considerado fundamental na prevenção da infecção neonatal, apesar da correlação entre o isolamento no último trimestre da gravidez e no momento parto não ser evidente – uma vez que a colonização com *S. agalactiae* pode ser transiente, intermitente ou persistente –, existindo o risco de toma antibiótica desnecessária (3, 15, 39, 68).

Foram elaboradas várias directrizes para a profilaxia intraparto como prevenção da EOD por *S. agalactiae*. As primeiras foram emitidas em 1996 pelo *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) e pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (10). Estas directrizes foram actualizadas e republicadas em 2002 e, novamente, em 2010 e contêm orientações específicas para a identificação precoce e tratamento de mulheres colonizadas por *S. agalactiae*, bem como para a identificação e tratamento de recém-nascidos em risco de desenvolver EOD (10).

Uma alternativa ao rastreio às 35-37 semanas de gestação seria o desenvolvimento de um teste rápido que permitisse uma triagem intraparto das grávidas portadoras, restringindo e afinando a profilaxia antibiótica (15, 39).

3. O diagnóstico laboratorial de *S. agalactiae*

O tempo de gestação da grávida e as condições de transporte das amostras anogenitais influenciam o sucesso da detecção de *S. agalactiae*, cuja cultura pode ser ainda prejudicada por factores maternos, tais como a toma antibiótica ou o uso de antissépticos de higiene feminina antes da colheita. (68).

Para a pesquisa de *S. agalactiae* fazem-se colheitas do intróito vaginal e do recto inferior com zaragatoas de algodão que devem ser colocadas em meio de transporte (Amies ou Stuart's) e conservadas a 4°C até ser efectuada sementeira para cultura (método de referência) nas 24 horas seguintes (3, 10, 68).

O crescimento é efectuado em meio de enriquecimento selectivo (i.e. caldo Todd-Hewitt suplementado com antibióticos – ácido nalidíxico e colistina ou ácido nalidíxico e gentamicina) de forma a impedir o crescimento de Gram negativos e outras bactérias saprófitas e a favorecer a multiplicação de *S. agalactiae* melhorando em cerca de 50% o sucesso da cultura (3, 10, 20).

Após enriquecimento é efectuada subcultura em placas de gelose com sangue de carneiro para observar as características das colónias, nomeadamente as propriedades hemolíticas (10, 20, 37). As colónias de *S. agalactiae*, β ou γ -hemolíticas, variam na cor (cinza a esbranquiçadas) e geralmente possuem algum brilho (81). Alternativamente, podem ser utilizados meios cromogénicos (por exemplo, Granada) nos quais as colónias β -hemolíticas de *S. agalactiae* aparecem de cor rosa ou laranja. Tal como acontece com

os caldos de enriquecimento pigmentados, estes agares cromogénicos podem facilitar a detecção de *S. agalactiae* β -hemolíticos mas a maioria não permitirá a detecção de estirpes não hemolíticas (10).

A observação microscópica de esfregaços das colónias corados pela técnica de Gram permitirá identificar os cocos Gram positivos em cadeia característicos de *S. agalactiae*. Mas a confirmação da identificação é habitualmente feita com recurso a testes serológicos por aglutinação de suspensões celulares, obtidas a partir de colónias isoladas de *S. agalactiae*, com anti-soros específicos para os grupos A, B, C, D, F e G de Lancefield (3, 10).

4. Profilaxia Antibiótica Intravenosa Intraparto

S. agalactiae é sensível aos antimicrobianos β -lactâmicos, nomeadamente à penicilina G e à ampicilina (3, 23), sendo que a penicilina G constitui o antibiótico de eleição quer na profilaxia intraparto quer no tratamento das restantes infecções por *S. agalactiae* nos adultos (3, 49). O uso da penicilina G intraparto prende-se com a sua eficácia na passagem transplacentária e com o seu baixo custo (3). Doses mais elevadas de penicilina G são recomendadas para o tratamento de infecções graves por *S. agalactiae*, particularmente meningite (10).

Os macrólidos (eritromicina) e as lincosamidas (clindamicina) surgiram como alternativas terapêuticas para mães alérgicas à penicilina (3, 36). Os dados sobre a capacidade da clindamicina e da eritromicina alcançarem níveis bactericidas na circulação fetal e líquido amniótico são muito limitados, mas suspeita-se que pelo menos a eritromicina não atinja de forma fiável os tecidos fetais, pelo que as novas directrizes do CDC não recomendam a eritromicina na profilaxia intraparto (10). Em mulheres alérgicas à penicilina e com alto risco de anafilaxia é actualmente recomendada a administração de clindamicina. Se o isolado for intrinsecamente resistente à clindamicina, se tiver resistência à clindamicina induzida pela eritromicina, ou se a susceptibilidade de ambos os agentes for desconhecida, é administrada, em alternativa, vancomicina (10).

4.1. Resistência aos antibióticos

O uso generalizado de profilaxia antibiótica intraparto para prevenir a doença de início precoce por *S. agalactiae* tem gerado preocupação acerca do desenvolvimento de resistência aos antibióticos entre os isolados (10).

As modificações metabólicas que permitem que as células lidem com a ação inibitória de antimicrobianos incluem inativação do antibiótico (através de enzimas que o destroem), bombas de efluxo (expulsão do antibiótico das células antes que atinja o seu alvo e produza efeito) e modificação do alvo (aquisição de genes que promovem alterações no sítio de ligação do antimicrobiano ou mutações que limitam o seu acesso ao alvo intracelular) (95, 102).

Tem sido documentada a existência de isolados com susceptibilidade reduzida à penicilina ou ampicilina (10, 49); contudo, não estão descritos casos de resistência a estes antibióticos em *S. agalactiae*, contrariamente ao que tem vindo a ser reportado para os macrólidos, para os quais se verifica resistência, principalmente por um mecanismo de efluxo mediado por uma proteína codificada pelos genes *mef* (*macrolide efflux*), *mefA/mefE* (19, 32). Os genes *mefA* e *mefE* originam um fenótipo de resistência somente a macrólidos (fenótipo M) (36). Outro mecanismo de resistência é uma modificação ribossômica mediada por uma metilase codificada pelos genes *erm* (*erythromycin ribosome methylase*), *ermB* e *ermA* subclasse *ermTR* (19, 32). Esta modificação consiste na metilação da região 23S rRNA que altera a ligação do alvo aos antibióticos, conferindo um fenótipo MLS_B e resistência cruzada aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B (36, 80). Esta resistência pode ser expressa de forma constitutiva (cMLS_B, de *constitutive macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotype*) ou induzida pela eritromicina (iMLS_B, de *induced macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotype*), quando a presença do antibiótico é necessária para induzir a produção da enzima (16, 19, 32, 36, 87).

Nos EUA, a percentagem de estirpes de *S. agalactiae* resistentes à eritromicina variou de 25% a 32% e a de resistentes à clindamicina de 13% a 20% no período 2006 a 2009 (10). Em Portugal, num estudo realizado entre 2005 e 2007, foi detectada resistência à clindamicina e eritromicina em 10% e 19% das estirpes, respectivamente. Entre as 19 estirpes resistentes à eritromicina, 53% apresentaram o fenótipo cMLS_B

(conferindo alto nível de resistência a macrólidos), 42% o fenótipo iMLS_B e 5% o fenótipo M (29).

Um estudo longitudinal de sépsis de início precoce por *S. agalactiae* revelou que, embora a taxa global da EOD tenha diminuído ao longo do tempo, as estirpes de *S. agalactiae* resistentes à eritromicina induziram um aumento da proporção da doença durante este intervalo (10). Justifica-se, por isso, a necessidade de constante monitorização dos padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos em *S. agalactiae* (23, 27, 84).

Estirpes de *S. agalactiae* altamente resistentes a fluoroquinolonas têm sido relatadas em diferentes localizações geográficas (46, 47, 101).

4.2. Associação entre serótipos e resistência a antibióticos

A resistência à eritromicina e clindamicina tem sido associada a determinados serótipos de *S. agalactiae*, especialmente aos serótipos III e V (3, 23, 27, 29). A disseminação clonal e a transferência horizontal de genes de resistência entre estirpes do serótipo V, tais como *ermB*, têm sido apontadas como as principais causas de resistência aos macrólidos neste serótipo (62). Ferrieri e colaboradores (25) relataram mais de 60% de resistência à clindamicina em estirpes dos serótipos Ib, IV ou V, em comparação com o observado em estirpes dos serótipos predominantes Ia (8,3%) e III (11,1%). A resistência à clindamicina foi significativamente associada ao serótipo IV que, em 2010, representou 28,6% de todas as estirpes resistentes (25).

5. Caracterização molecular das estirpes de *S. agalactiae*

A sequenciação do *cluster cps* de *S. agalactiae* permitiu determinar a correlação entre serótipos e genótipos capsulares e reduziu o número de estirpes não tipáveis (NT) por aglutinação. No entanto, algumas estirpes permanecem não tipáveis por genotipagem molecular (52, 90). A genotipagem molecular (baseada na amplificação e sequenciação génica) possui elevada reprodutibilidade e potencial discriminatório,

permitindo não só a resolução de discrepâncias em resultado da aplicação de outros métodos, mas também a identificação de novos serótipos (52, 54).

O *cluster cps* compreende os genes *cpsA-O*, *cpsR*, *cpsS*, *cpsY* que, na sua maioria, existem e são conservados em todas as estirpes. No entanto, os genes *cpsG-K* são altamente variáveis nos serótipos Ia, Ib e II a VII, enquanto que no serótipo VIII os genes variáveis são *cpsE-cpsK* (figura 1) (11, 63).

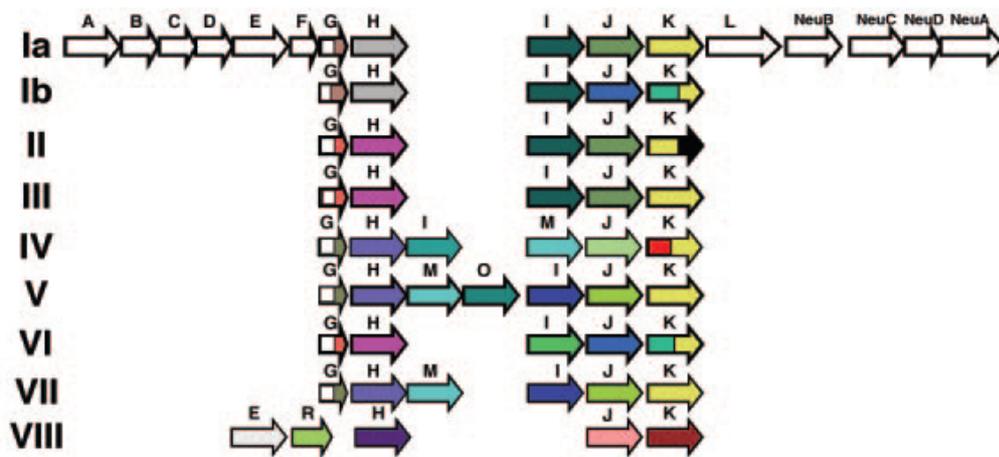


Figura 1 – Representação do *cluster CPS* dos vários serótipos (adaptado de Cieslewicz *et al.*, 2005). Os *cpsA-E* e *cps-L* bem como *NeuB*, *-D*, *-A* e *-C* são conservados nos nove serótipos e representados apenas no *cluster Ia*. Entre *cpsH* e *cpsI* foi introduzido um espaço para permitir o alinhamento dos *clusters* para os vários serótipos.

Para além da análise das sequências dos *locus cps* foram desenvolvidas técnicas para caracterização molecular das estirpes de *S. agalactiae* como é o caso do PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) e MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) (31).

A técnica de PFGE consiste na separação por um sistema de electroforese em campo pulsado de fragmentos de DNA cromossomal de peso molecular elevado originados pela clivagem com enzimas de restrição de “corte raro”. É uma técnica com elevado poder discriminatório que permite a identificação da relação genotípica e clonal entre estirpes. No entanto, os critérios para análise dos padrões de PFGE não estão padronizados o que pode originar diferentes interpretações e, conseqüentemente, baixa reprodutibilidade interlaboratorial (77, 96).

A metodologia MLST tem sido utilizada na caracterização molecular das estirpes de *S. agalactiae* permitindo definir estruturas populacionais através da identificação de

linhagens genéticas (44, 69). É um método de tipagem que envolve a sequenciação de fragmentos com aproximadamente 500 pb de sete genes constitutivos (*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK*, *ikt*) que representam o "núcleo" estável do genoma ("core-genome") (44, 69, 99). A combinação dos alelos dos sete *loci* atribui a cada um dos isolados um perfil alélico ou *sequence type* (ST) que pode reunir estirpes de diferentes serótipos capsulares. Por este motivo, supõe-se que os genes da biossíntese capsular de *S. agalactiae* estejam sujeitos a transferência horizontal com relativa frequência, tal como descrito em *Streptococcus pneumoniae* (8, 44, 69, 99).

A tipagem por MLST é uma ferramenta valiosa que parece ser suficientemente discriminatória para estudos epidemiológicos e que fornece um modo preciso e inequívoco de caracterização das estirpes de *S. agalactiae*, permitindo promover uma investigação mais aprofundada sobre a biologia populacional deste microrganismo. Por outro lado, possui elevada reprodutibilidade intra e interlaboratorial, pelo que tem sido destacada como método padrão para a identificação da estrutura clonal das populações de *S. agalactiae* (17, 44, 59).

O critério para agrupar diferentes ST num complexo clonal (CC) baseia-se no número de alelos iguais partilhados entre vários ST (28, 44).

5.1. Linhagem genética ST17

O CC17 de *S. agalactiae* é o protótipo de um clone emergente que se propagou com sucesso a nível mundial. O aumento da prevalência de infecção invasiva neonatal observada a partir de 1960 foi fortemente associada à linhagem hipervirulenta CC17, quase exclusivamente composta por estirpes do serótipo III (5, 43, 56). Recentemente, Bellais e colaboradores (5) detectaram o clone hipervirulento CC17 entre estirpes de *S. agalactiae* do serótipo IV. A análise da sequência revelou que a mudança de cápsula do serótipo III para IV terá ocorrido devido à troca de um fragmento de DNA de 35,5kb contendo a totalidade do operão *cps*. O facto dos fragmentos de DNA sequenciados serem idênticos entre as estirpes sugere que estas sejam derivadas de um ancestral comum (5).

Lamy e colaboradores (56) identificaram um gene (*gbs2018*) que codifica uma proteína de superfície de *S. agalactiae* específica do clone ST17. Esta sequência alvo foi utilizada para desenvolver um ensaio de PCR rápido (menos de 2 horas), aplicável ao rastreio molecular de estirpes *S. agalactiae* ST17, altamente virulentas, particularmente útil na identificação de recém-nascidos em risco de EOD (56).

O aparecimento de clones hipervirulentos de *S. agalactiae* pode ser resultado de eventos de transferência genética horizontal (34). A análise filogenética indica que o clone hipervirulento ST17 surgiu a partir de uma linhagem de isolados de bovinos (7).

5.2. Elementos genéticos móveis como marcadores epidemiológicos

Tal como acontece com muitas outras espécies bacterianas, a transferência horizontal de genes teve um papel significativo na evolução de *S. agalactiae* (78).

A presença de MGE (*Mobile Genetic Elements*) em *S. agalactiae* sugere que a recombinação e a transferência genética horizontal podem desempenhar um papel importante na adaptação de *S. agalactiae* ao ambiente em que se encontram, contribuindo para a diversidade do genoma e para a emergência de clones virulentos (38, 82).

Os MGE incluem bacteriófagos, transposões, sequências de inserção e intrões do grupo II. As sequências de inserção são pequenos elementos genéticos, que codificam apenas a sua própria mobilidade, ao passo que os intrões do grupo II têm um mecanismo de transposição mais complexo (9, 38). *S. agalactiae* possui vários MGE, cinco dos quais estão bem caracterizados: IS1548, IS1381, IS861, ISSa4 e GBSi1 (38).

A região intergênica *scpB-lmb* é um *hot-spot* para a integração de dois MGE (mutuamente exclusivos), a sequência de inserção IS1548 ou o intrão do grupo II GBSi1 (38, 61, 82). Os genes *scpB* e *lmb*, que codificam proteínas de superfície que se ligam à fibronectina e laminina, estão presentes em quase todas as estirpes humanas de *S. agalactiae* (9, 82). A presença de MGE não tem influência sobre a expressão do gene *scpB* mas a transcrição e a expressão do gene *lmb* é significativamente maior nas estirpes que possuem a IS1548 na região intergênica *scpB-lmb* (82). O facto da IS1548 e do GBSi1 nunca coexistirem na mesma estirpe pode sugerir que constituam marcadores de linhagens genéticas distintas. De facto, GBSi1 é habitualmente identificado nas

estirpes da linhagem CC17 e a sequência de inserção IS1548 nas da linhagem CC19; contudo, existem estirpes CC19 com GBSi1 na região intergênica *scpB-lmb* (38, 61, 82). Outras sequências de inserção têm sido associadas a linhagens genéticas específicas de *S. agalactiae*, nomeadamente a IS1381 aos CC1, CC12 e CC19, a IS861 aos CC12, CC19 e CC17 e a ISSa4 ao CC23 (38).

A distribuição peculiar dos MGE (mutuamente exclusivos e com associação preferencial) pode ser explicada pela ligação aos ecossistemas em que as estirpes são isoladas. Os MGE contribuem, através de recombinação e transferência genética horizontal, para a adaptação de *S. agalactiae* ao ambiente em que se encontra (38).

6. Análise genómica comparativa

S. agalactiae compreende um grande número de ilhas genómicas. Com base nesta constatação foi proposto que *S. agalactiae* se tenha tornado um agente patogénico através de aquisições sucessivas de factores de virulência exógenos (34). Por exemplo, no caso da mastite bovina, a troca de material genético entre diferentes espécies que infectam o úbere (*S. uberis*, *S. dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae* e *Staphylococcus aureus*, por exemplo) pode ter auxiliado a adaptação de *S. agalactiae* e a incorporação de factores de virulência no genoma (78, 98).

Foram identificados genes específicos de *S. agalactiae* que desempenham um papel na colonização ou doença, nomeadamente proteínas de superfície, genes de síntese da cápsula, hemolisina, e vários reguladores transcricionais. Muitos destes genes específicos têm sido associados a elementos móveis, incluindo bacteriófagos, transposões, e sequências de inserção (98).

A sequenciação do genoma completo de oito estirpes de *S. agalactiae*, nomeadamente das estirpes de referência 2603V/R (V/ST110), NEM316 (III/ST23) e COH1 (III/ST17), revelou um número semelhante de genes por estirpe, bem como de conteúdo GC (35,3% em COH1 e 35,6% em 2603V/R e NEM316) (34, 97, 98). A análise destes genomas demonstrou que as estirpes de *S. agalactiae* podem ser consideradas um *pan-genome* que consiste num *core-genome* partilhado por todas as estirpes (representando 80% do genoma) e por um *accessory-genome* específico de cada

estirpe. A identificação de vários novos genes específicos por genoma sequenciado reflecte a diversidade genómica de *S. agalactiae* (*open pan-genome*) (97).

Os genes adquiridos têm tendência a localizar-se em regiões cromossómicas do *accessory-genome* designadas por ilhas genómicas de patogenicidade e contribuem para a diversidade genética e para a adaptação de *S. agalactiae* a nichos ecológicos específicos, auxiliando a emergência desta bactéria como um importante agente patogénico (97, 98). Várias dessas ilhas genómicas codificam hipotéticas proteínas de superfície e factores de virulência ainda não caracterizados, cuja análise futura poderá contribuir significativamente para a compreensão da evolução de *S. agalactiae* (9).

7. Factores de virulência em *S. agalactiae*

Um dos principais factores de virulência em *S. agalactiae* é o polissacárido capsular que auxilia a evasão bacteriana ao interferir com a fagocitose da bactéria. Os pili constituem outro factor de virulência importante, já que facilitam a adesão de *S. agalactiae* às células epiteliais e ao endotélio vascular (58, 68).

Por outro lado, a disseminação da infecção (podendo causar meningite e osteomielite) pressupõe que algumas estirpes tenham capacidade de escapar às defesas imunológicas naturais do hospedeiro (68). A título de exemplo, a C5a peptidase codificada pelo gene *scpB* de *S. agalactiae*, impede o recrutamento de neutrófilos para os locais de infecção e medeia a ligação da bactéria à fibronectina humana, contribuindo para a invasão das células epiteliais (68, 91). Outro exemplo é a lipoproteína de superfície Lmb que medeia a ligação de *S. agalactiae* com a laminina da membrana basal (9, 82).

Dos vários factores de virulência identificados em *S. agalactiae* descrevem-se de forma sumária aqueles que foram alvo de estudo nesta dissertação.

7.1. *Alpha-like Proteins*

As proteínas da membrana externa das bactérias desempenham normalmente um papel importante na interação com o hospedeiro, podendo mediar a invasão e, como tal, são muitas vezes consideradas como factores de virulência (82, 91). *S. agalactiae* não constitui excepção, sendo as proteínas do antígeno C as melhor caracterizadas. (91). Este complexo é composto pelas proteínas de superfície da família *Alpha-like proteins* (Alp): Alpha C, Rib, Epsilon (Alp1), Alp2, Alp3 e Alp4. As seis proteínas da família são codificadas por genes mosaico gerados por recombinação no mesmo *locus* cromossómico; caracterizam-se por longas sequências de repetição em *tandem*, cujo número de repetições tem implicações no reconhecimento pelo sistema imunitário do hospedeiro, pelo que no decurso da infecção o número de repetições pode sofrer deleções internas (9, 13).

O serótipo Ia associa-se normalmente à presença das proteínas Alpha C, Alp1 e Alp2, enquanto os serótipos Ib e IV à Alpha C, os serótipos II e III à Rib e o serótipo V à Alp3 (32). Contudo, a proteína Alfa C existe na maioria dos serótipos, a Rib foi detectada nos serótipos II, V e VIII e em estirpes NT, e a Alp3 também existe nos serótipos VII e VIII (13).

Apesar do papel biológico das proteínas da família Alp na infecção de *S. agalactiae* ainda não ser totalmente compreendido, foi-lhes reconhecida influência na patogénese das infecções por *S. agalactiae* (53). As Alp induzem imunidade protectora e, como tal, o seu uso em vacinas conjugadas de polissacáridos está sob investigação (13, 53).

7.2. DNases

Os neutrófilos são considerados como os principais efectores da resposta imune inata do hospedeiro contra a infecção bacteriana e a descoberta das *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) contribuiu para a compreensão do modo de actuação desses leucócitos perante os agentes patogénicos. As NETs consistem numa matriz constituída por uma cadeia de DNA nuclear associada a péptidos antimicrobianos, histonas e protéases na qual os microrganismos ficam aprisionados e mais facilmente podem ser

destruídos (6). Assim, a capacidade de secretar nucleases evidenciada por algumas bactérias Gram positivas permitir-lhes-á resistir à destruição nas NETs (6) e facilitar a difusão e disseminação dessas bactérias no organismo (92). Já em 1980 Ferrieri e colaboradores (26) examinaram a possibilidade de *S. agalactiae* produzir nucleases extracelulares que poderiam ser marcadores antigênicos valiosos, utilizados para seguir a resposta imunitária à colonização ou infecção por *S. agalactiae* (92).

Recentemente tem sido evidenciada a existência de uma relação entre a produção de DNases e a formação de biofilmes. Biofilmes definem-se como comunidades biológicas estruturadas constituídas por conjuntos de células agregadas envolvidas por uma matriz polimérica, permitindo o aumento da resistência dos microrganismos às agressões do meio em que se encontram (45, 48). Um estudo em *S. aureus* demonstrou que o DNA extracelular (eDNA) tem um papel estrutural na composição da matriz que envolve os biofilmes, pelo que a produção de DNases poderá inibir a sua formação. Pensa-se que existirá uma regulação do gene que codifica a enzima (gene *nuc*) de modo a controlar os níveis de eDNA durante a maturação do biofilme (48).

8. Perspectivas futuras na prevenção da infecção por *S. agalactiae*

Embora o uso de profilaxia antibiótica intraparto tenha reduzido consideravelmente a incidência de doença neonatal por *S. agalactiae*, tem sido considerado necessário encontrar novas formas de prevenir as infecções causadas por este microrganismo, nomeadamente o desenvolvimento de vacinas, para as quais as mulheres em idade fértil constituem a população alvo (60, 76).

As vacinas têm sido investigadas com o objectivo de promover a redução da colonização materna e prevenir a EOD no recém-nascido, já que os anticorpos maternos são transferidos activamente para o feto durante o terceiro trimestre da gravidez. Assim, as concentrações de anticorpos IgG anti-CPS em crianças seriam inversamente proporcionais ao risco de desenvolver EOD e LOD, protegendo contra a doença invasiva neonatal (10, 68). A vacinação para *S. agalactiae* poderia ainda ser utilizada para proteger adultos não gestantes, nomeadamente idosos, nos quais a incidência da

doença e as taxas de letalidade são elevadas (68, 84). No entanto, nenhuma vacina para *S. agalactiae* foi ainda licenciada (10).

Os polissacáridos capsulares têm sido considerados como o antigénio vacinal de eleição para o desenvolvimento de uma vacina (3, 52, 76, 91); no entanto, o desenvolvimento de vacinas com base no serótipo capsular será sempre dificultado pelas diferenças na distribuição de serótipos de *S. agalactiae* entre diferentes regiões geográficas e ao longo do tempo (17, 42). Por exemplo, o desenvolvimento de uma vacina pentavalente contra os serótipos tradicionalmente mais frequentes na Europa (Ia, Ib, II, III e V) é actualmente questionável, dada a recente emergência do serótipo IV e o conhecimento da existência de fenómenos de *switching* capsular (17, 42, 52).

Para superar a especificidade de serótipo têm vindo a ser ensaiados outros alvos vacinais, tais como a proteína Sip, localizada na superfície celular de *S. agalactiae*, e as proteínas imunogénicas da estrutura pili de *S. agalactiae* (42, 68).

Até que uma vacina segura e eficaz seja licenciada, particularmente se baseada em polissacáridos da cápsula, é necessária a vigilância permanente dos serótipos circulantes de *S. agalactiae* (17). É igualmente essencial a monitorização contínua das potenciais consequências da quimioprofilaxia antibiótica intraparto, de forma a evitar a emergência de estirpes *S. agalactiae* resistentes à penicilina e o aumento da incidência das infecções neonatais por outros microrganismos (10).

9. Objectivo geral

Caracterizar as estirpes de *S. agalactiae* pertencentes ao serótipo IV numa colecção de 953 estirpes isoladas em exsudados vaginais e/ou rectais de mulheres em idade fértil (15-49 anos de idade), entre 2005 e 2012, em sete instituições de saúde de Portugal continental.

9.1. Objectivos específicos

- Conhecer a prevalência do serótipo IV e identificar o seu contributo no perfil de distribuição de resistência aos antimicrobianos entre 2005 e 2012;
- Em todas as estirpes do serótipo IV:
 - ✓ Avaliar a actividade das DNases;
 - ✓ Identificar linhagens genéticas e avaliar a sua evolução temporal;
 - ✓ Avaliar os fenótipos e genótipos de resistência aos macrólidos;
 - ✓ Procurar associações entre linhagens genéticas e resistência aos antimicrobianos de segunda linha;
 - ✓ Avaliar a relação filogenética entre linhagens genéticas;
 - ✓ Subcaracterizar as linhagens genéticas através da detecção de alguns biomarcadores moleculares.

II – Material e métodos

1. Origem das estirpes de *S. agalactiae*

Para este trabalho foi-nos disponibilizada uma colecção de 953 estirpes de *S. agalactiae* associadas a colonização, isoladas entre 2005 e 2010 em exsudados vaginais e/ou rectais de mulheres saudáveis em idade fértil (15-49 anos de idade), 668 das quais grávidas, em sete instituições de Portugal (INSA Lisboa, Hospital CUF Descobertas, Hospital Garcia de Orta, Hospital Dona Estefânia, Hospital de Santarém, Maternidade Alfredo da Costa e Hospital Fernando da Fonseca).

Desta colecção inicial foram seleccionadas para o presente estudo todas as estirpes de serótipo IV (n=89) identificadas pelo método de serotipagem por aglutinação em látex. Dessas 89 estirpes, uma (isolada em 2005 no Hospital Fernando da Fonseca) não foi incluída no estudo devido à perda de viabilidade da cultura (apesar de ter sido conservada a -80°C, como descrito em II. 2.). Assim, foram utilizadas no presente trabalho 88 estirpes de *S. agalactiae* isoladas entre 2005 e 2010 em cinco hospitais e no INSA, as quais foram associadas a colonização de mulheres em idade fértil, 72 das quais grávidas (ver Tabela 1).

Neste estudo foi apenas incluído um isolado por cada mulher. As estirpes isoladas entre 2005 e 2010 foram parcialmente caracterizadas em trabalhos anteriores (14, 22, 35, 79).

Tabela 1 – Distribuição anual (2005-2010) das estirpes de *S. agalactiae* por instituição de saúde

Hospital/Instituição de origem	Local de Isolamento	Ano de Isolamento								Total
		2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
INSA	Lisboa	2	1	3	6	6	2	7	1	28
CUF	Lisboa					1				1
HGO	Lisboa	2	1	2	5	5	7	8	18	48
HE	Lisboa	1								1
HDS	Santarém			4	5					9
MAC	Lisboa	1								1
Total		6	2	9	16	12	9	15	19	88

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, CUF – Hospital CUF Descobertas, HGO – Hospital Garcia de Orta, HE – Hospital D. Estefânia, HDS – Hospital de Santarém, MAC – Maternidade Alfredo da Costa

2. Propagação das estirpes de *S. agalactiae*

Todas as estirpes utilizadas neste estudo estavam conservadas a -80°C em tubos de criopreservação *Cryoinstant Red* (VWR, Prolabo, Bélgica) ou em TSB (*Trypticase Soy Broth*) com 20% de glicerol. A propagação nas culturas a partir das amostras congeladas foi feita em gelose *Columbia* com 5% de sangue de carneiro (BioMérieux, Marcy l’Etoile, France), tendo sido efectuada incubação a 37°C durante 24 a 48h numa atmosfera com 5% de CO₂.

3. Extracção de DNA

O DNA foi extraído segundo o método descrito por Bell e colaboradores (4). Assim, após propagação das estirpes no meio de cultura sólido referido em II. 2. procedeu-se à recolha de colónias com uma ansa estéril de 10µl e à sua suspensão em 200 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 8,0]). Estas suspensões foram posteriormente aquecidas a 95°C durante 20 min e centrifugadas a 13000 rpm durante 2

min. Após centrifugação o sobrenadante foi aspirado e transferido para microtubos de 1,5 ml e armazenado a -20°C.

4. Serotipagem capsular de *S. agalactiae*

A tipagem capsular das estirpes de *S. agalactiae* foi realizada por serologia, com recurso a anticorpos específicos para os antígenos capsulares. Foi utilizado o sistema comercial *Essum GBS Serotyping Kit* (Essum ProBiotics, Umea, Sweden) tendo-se procedido de acordo com as instruções do fabricante. Este sistema permite determinar o serótipo de *S. agalactiae* por observação de aglutinação das colónias com o anti-soro correspondente. O *kit* inclui nove anti-soros ligados a partículas látex, de forma a possibilitar a identificação de nove dos dez serótipos actualmente reconhecidos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII). O serótipo IX ainda não está incluído.

No âmbito deste trabalho procedeu-se à serotipagem capsular das 192 estirpes de *S. agalactiae* obtidas em 2011 e 2012, uma vez que este ensaio tinha já sido anteriormente efectuado para as estirpes de 2005 a 2010 (14, 22, 35, 79). Posteriormente, e tal como referido em II. 1., este trabalho centrou-se na caracterização das estirpes de serótipo IV pelo que, após selecção das mesmas, se procedeu à confirmação do seu serótipo por genotipagem capsular.

5. Genotipagem capsular de *S. agalactiae*

A genotipagem capsular corresponde à análise de polimorfismos nas sequências nucleotídicas dos *loci* capsulares *cpsD-cpsE-cpsF* após amplificação por PCR e sequenciação. O método seguido foi o descrito por Florindo e colaboradores (29). A mistura reaccional para amplificação por PCR (volume final de 25 µl) foi composta por:

- 200 µM de dNTP's (Bioline, Londres, Inglaterra);
- Solução tampão 1X (Bioline, Londres, Inglaterra);
- 2,8 mM MgCl₂ (Bioline, Londres, Inglaterra);

- 25 pmol *primer forward* (anexo I);
- 25 pmol *primer reverse* (anexo I);
- 1,5 U de *Bio-X-Act Proof-reading DNA polymerase* (Bioline, Londres, Inglaterra);
- 5 µl de DNA;
- Água bidestilada estéril e apirogénica (Labesfal, Campo de Besteiros, Portugal).

A amplificação de produtos de PCR foi realizada nas seguintes condições [adaptado de Kong e colaboradores (54)]: 1 ciclo [95°C (3 min), 51°C (1 min)], 35 ciclos [72°C (2 min e 25 s), 95°C (30 s), 51°C (30 s)], 1 ciclo a 72°C (10 min), correspondendo a um ciclo inicial de desnaturação e emparelhamento seguido de 35 ciclos de extensão, desnaturação e emparelhamento, terminando com um ciclo final de extensão a 72°C. O termociclador utilizado foi o *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Os produtos de PCR foram visualizados após electroforese em gel de agarose a 1% (p/v) (Lonza, Rockland, USA) adicionado de 5 µl de corante de DNA *SYBR Safe* (Invitrogen, EUA) em solução tampão TBE 1X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH 8,3) (Sigma, St Louis, EUA) [90 V, 90 min]. Foi utilizado o marcador de peso molecular *Hyperladder I* (Bioline, Londres, Inglaterra) para melhor identificar a banda de aproximadamente 1900 pb do produto amplificado. O gel foi visualizado e fotografado através do sistema GEL DOC (BioRad, Richmond, California).

5.1. Purificação dos produtos amplificados por PCR

Foi necessário purificar os produtos de PCR antes de proceder à respectiva sequenciação. Tal purificação foi realizada através do sistema comercial *peqGOLD Cycle-Pure Kit* (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Alemanha), conforme as indicações do fabricante. Esta metodologia compreende a ligação do DNA de forma reversível à matriz de sílica da coluna de purificação, sendo posteriormente removidos sais, nucleótidos, oligonucleótidos e polimerases de DNA através de dois passos de

lavagem, de forma a obter DNA purificado em 35 µl do tampão de eluição fornecido pelo fabricante do *kit*.

5.2. Sequenciação dos produtos de PCR purificados

Para a reacção de sequenciação utilizou-se a metodologia *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). O volume total de cada reacção foi de 10 µl, sendo que 0,5 µl são correspondentes ao volume de DNA amplificado e purificado e 9,5 µl ao volume de *Big Dye* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A reacção de sequenciação seguiu as seguintes condições: 95°C (30 s) e 25 ciclos [95°C (10 s), 50°C (5 s), 60°C (4 min)], correspondendo a um ciclo inicial de desnaturação seguido de 25 ciclos de desnaturação, emparelhamento e extensão. Os produtos desta reacção foram posteriormente sequenciados na Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA, com recurso ao sequenciador de DNA ABI Prism 3700 (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

5.3. Análise das sequências *cpsD-cpsE-cpsF*

Para identificar o genótipo capsular das estirpes em estudo procedeu-se à análise das sequências dos *loci cpsD-cpsE-cpsF* por comparação com a sequência de uma estirpe de referência, neste caso correspondente ao serótipo IV (número de acesso no GenBank: AF332908). Para isso foram utilizadas as aplicações bioinformáticas *Chromas Lite* (versão 2.01) e *Lasergene 9 Core Suite* (DNASTAR, Madison, EUA).

6. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Todas as estirpes tinham sido já avaliadas quanto à susceptibilidade à penicilina G e vancomicina. Igualmente, algumas das estirpes tinham sido já parcialmente

caracterizadas no que respeita à susceptibilidade à eritromicina e clindamicina (14, 22, 35, 79) por um dos seguintes três métodos:

- Método de difusão em disco (Método de Kirby-Bauer);
- Método de Macrodiluição;
- E-test (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

No presente trabalho apenas foi realizado o ensaio com tiras de *E-test* (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) para avaliar a CMI (concentração mínima inibitória) para a eritromicina e clindamicina de acordo com os parâmetros definidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (12).

Cento e noventa e duas estirpes de *S. agalactiae* foram propagadas como descrito em II. 2., tendo sido efectuada uma suspensão bacteriana com concentração celular de 0,5 na escala de McFarland (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Após homogeneização da suspensão foram inoculadas placas de *Mueller-Hinton* com 5% de sangue de carneiro (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) por espalhamento com zaragatoa. Posteriormente foram colocadas tiras de *E-test* de clindamicina (S30, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) e de eritromicina (S30, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) e foi efectuada incubação a 37°C, numa atmosfera de 5% CO₂, durante 20 a 24h. As tiras de *E-test* foram colocadas a meio da placa, tendo sido utilizada uma placa para cada estirpe e antibiótico. As tiras contêm um gradiente de concentração do antimicrobiano em µg/ml. O valor da CMI em µg/ml foi determinado pela presença de uma elipse de inibição de crescimento bacteriano em redor da tira e foi interpretado de acordo com os parâmetros definidos pelo CLSI (12), conforme indicado na Tabela 3.

O fenótipo de resistência à clindamicina induzida pela eritromicina tinha sido já identificado em estudos anteriores (22, 35, 79) não tendo sido estudado no presente trabalho.

Tabela 2 – Critérios de avaliação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) em *Streptococcus* spp. (excepto *Streptococcus pneumoniae*) (12)

Classe de Antimicrobiano	Antimicrobiano	Resistente CMI (µg/ml)	Resistência Intermédia CMI (µg/ml)	Susceptível CMI (µg/ml)
Macrólido	Eritromicina	≥ 1	0,5	≤ 0.25
Lincosamida	Clindamicina	≥ 1	0,5	≤ 0.25

O controlo de qualidade do método *E-test* foi realizado com a estirpe de referência *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (12).

6.1. Detecção dos genes de resistência aos macrólidos

No caso das estirpes resistentes ou com resistência intermédia aos macrólidos pesquisou-se, por PCR, a presença dos genes *mefA*, *ermA* e *ermB*, segundo o método descrito por Florindo e colaboradores (29).

A mistura reaccional utilizada foi idêntica à descrita em II. 5., com excepção dos *primers* (Anexo I), da temperatura de emparelhamento (55°C) e do tempo de extensão [72°C (1min e 10s)].

A visualização dos produtos de PCR foi efectuada por electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) (Lonza, Rockland, USA) tendo sido as condições da electroforese idênticas ao descrito em II. 5., com excepção do marcador de peso molecular utilizado, *Hyperladder IV* (Bioline, Londres, Inglaterra), adequado ao tamanho dos fragmentos amplificados dos genes *mefA*, *ermA* ou *ermB*: 346 pb, 395 pb ou 639 pb, respectivamente, conforme descrito por Florindo e colaboradores (29).

7. Avaliação da produção de DNases

A avaliação da produção de DNases foi realizada de forma qualitativa em placas de *DNA methyl green agar* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), pela visualização de um halo

transparente em redor das colónias produtoras, devido à hidrólise do DNA existente no meio pelas nucleases extracelulares, após incubação de 24h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Como controlo positivo utilizou-se a estirpe de referência de *S. agalactiae* O90R.

8. Multi Locus Sequence Typing (MLST)

A metodologia designada por MLST foi descrita pela primeira vez para *S. agalactiae* por Jones e colaboradores (44), envolvendo a amplificação por PCR e a sequenciação de fragmentos internos, com aproximadamente 459-519 pb, de sete genes *housekeeping* (*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK*, *tkl*) de *S. agalactiae*.

A mistura reaccional utilizada foi idêntica à descrita em II. 5., com excepção dos *primers* (anexo I). O perfil de amplificação variou apenas na temperatura de emparelhamento (55°C) e no tempo de extensão [72°C (1min e 10s)]. Na electroforese foi utilizado um gel de agarose a 2% (p/v), tendo as restantes condições sido idênticas ao descrito em II. 5., com excepção do marcador de peso molecular utilizado – *Hyperladder IV* (Bioline, Londres, Inglaterra), para melhor visualizar o peso molecular dos produtos de amplificação dos genes *adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK* e *tkl*: 672, 723, 627, 589, 646, 607 e 859 pb, respectivamente.

A purificação e sequenciação dos amplicões foram realizadas como anteriormente descrito (II. 5.1. e II. 5.2.).

A introdução individual das sequências na base de dados pública MLST (pubmlst.org/sagalactiae/) permitiu analisar os alelos dos sete *loci* e a sua combinação definiu um perfil alélico ou sequência tipo (ST), para cada estirpe.

9. Detecção do clone ST17 de *S. agalactiae*

Os complexos clonais (CC) foram definidos como agrupamentos de ST em linhagens compostas por grupos de dois ou mais isolados independentes que possuam cinco ou mais *loci* idênticos aos de pelo menos um outro membro do grupo. A variação

em um ou dois dos sete *loci* é denominada de SLV (*single-locus variant*) ou DLV (*double-locus variant*).

Tendo em conta que alguns resultados de MLST sugeriram a existência de estirpes de serótipo IV com SLV do clone ST17 (geralmente associado ao serótipo III), procedeu-se à amplificação do gene *gbs2018*, que codifica uma proteína de superfície e que é considerado associado ao ST17, segundo o método descrito por Marie-Cécile Lamy e colaboradores (56).

À excepção dos *primers* (anexo I) a mistura reaccional utilizada foi idêntica à descrita em II. 5. O perfil de amplificação também foi semelhante ao descrito em II. 5. tendo variado apenas na temperatura de emparelhamento (55°C) e no tempo de extensão [72°C (30 s)]. A visualização dos produtos PCR foi efectuada de uma forma geral como descrito em II. 5., com a excepção de ter sido utilizado um gel de agarose a 1,5% (p/v) (Lonza, Rockland, USA) e o marcador de peso molecular *Hyperladder IV* (Bioline, Londres, Inglaterra), já que o produto de amplificação tinha 210 pb.

10. Análise Filogenética

Foi efectuada a análise filogenética das sequências dos *loci* MLST com recurso à aplicação informática MEGA5 (93) e foi inferida a respectiva história evolutiva pelo método Neighbor-Joining (83), dando origem à árvore filogenética apresentada na secção de Resultados (III. 3.4.). O valor de *bootstrap*, correspondente ao número de árvores que apresenta uma determinada característica no mesmo *cluster* (em 1000 réplicas), é representado (sob a forma de percentagem) em cada ramo (24). Os valores de *bootstrap* devem ser superiores a 50%, considerando-se que um agrupamento tem um suporte óptimo se ocorreu em mais de 80% das árvores inferidas (idealmente em mais de 95%).

Os comprimentos de ramificação da árvore filogenética são proporcionais às distâncias evolutivas. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método de Kimura-2 parâmetros (50) e estão representadas em unidades do número de substituições de bases por local. A análise envolveu dezasseis sequências nucleotídicas referentes aos dezasseis ST determinados por MLST. Todas as posições ambíguas

foram removidas para cada par de sequências. Cada uma das dezasseis sequências analisadas possuía um número total de 3456 bases.

11. Detecção dos MGE (*Mobile Genetic Elements*) IS1548 e GBSi1 na região intergénica *scpB-lmb*

A região intergénica *scpB-lmb* é o local preferencial para a integração de dois elementos genéticos móveis: a sequência de inserção IS1548 e o intrão do grupo II GBSi1. A estrutura da região intergénica *scpB-lmb* das estirpes foi estudada de acordo com o método descrito por Safadi e colaboradores (82).

A mistura reaccional utilizada e o perfil de amplificação foram idênticos aos descritos em II. 5., com excepção dos *primers* (anexo I), da temperatura de emparelhamento (55°C) e do tempo de extensão [72°C (2 min)]. A visualização dos produtos de PCR foi efectuada por electroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) (Lonza, Rockland, USA) tal como descrito em II. 5..

A detecção de um amplicão de 400 pb indicou a ausência de elementos móveis na região intergénica. A detecção de amplicões de 2200 pb e 1600 pb sugeriu a presença de GBSi1 e de IS1548, respectivamente, de acordo com Safadi e colaboradores (82).

12. Detecção das Sequências de Inserção IS1381, IS861 e ISSa4

A avaliação da presença das sequências de inserção IS1381, IS861 e ISSa4 foi realizada segundo o método descrito por Héry-Arnaud e colaboradores (38).

As misturas reaccionais utilizadas para amplificação de cada uma das sequências de inserção foram idênticas às descritas em II. 5., com excepção dos *primers* (anexo I) e do perfil de amplificação que variou apenas na temperatura de emparelhamento (50°C) e no tempo de extensão [72°C (1 min)]. A visualização dos produtos de PCR foi efectuada por electroforese em gel de agarose tal como descrito em II. 5., tendo sido utilizado um gel de agarose a 2% (p/v) (Lonza, Rockland, USA) e o marcador de peso molecular *Hyperladder IV* (Bioline, Londres, Inglaterra), já que a amplificação por PCR das

IS1381, IS861 e ISSa4 origina amplicões de 431 pb, 472 pb e 102 pb, respectivamente, conforme descrito por Dmitriev e colaboradores (18).

13. Detecção dos genes da família *Alpha-Like Protein*

Os principais antígenos localizados à superfície de *S. agalactiae* pertencem à família de proteínas designada por Alp. Esta família é formada pelas proteínas Alpha-C, Rib, Epsilon (ou Alp1), Alp2/Alp3 e Alp4, consideradas potenciais factores de virulência (13). Dado que têm sido descritas associações entre os serótipos capsulares e algumas destas proteínas de superfície, procedeu-se à detecção dos genes que codificam as proteínas acima indicadas pelo método descrito por Creti e colaboradores (13). Assim, procedeu-se à amplificação simultânea dos vários genes através de uma reacção de PCR Multiplex. Tanto as misturas reaccionais como o perfil de amplificação e as condições da electroforese em gel de agarose foram semelhantes ao descrito em II. 5., excepto no que respeita aos *primers* utilizados (anexo I), à temperatura de emparelhamento (58°C), ao tempo de extensão (45 s), à densidade do gel de agarose [1,5% (p/v) (Lonza, Rockland, USA)] e ao marcador de peso molecular utilizado [*Hyperladder IV* (Bioline, Londres, Inglaterra)], já que amplicões de 398, 295, 200, 334 ou 110 pb foram considerados indicativos da presença dos genes *alpha-C*, *rib*, *epsilon*, *alp2/3* e *alp4*, respectivamente (13).

III – Resultados

1. Análise da distribuição dos serótipos de *S. agalactiae*

A análise da distribuição dos serótipos das 953 estirpes de *S. agalactiae*, entre 2005 e 2010, evidenciou que os serótipos mais frequentes durante este período foram o III, Ia e V: 23,3%, 21,3% e 20,1%, respectivamente; já os serótipos II, IV, Ib e NT foram identificados em 14,2%, 9,3%, 7,6 % e 4,2%, respectivamente (Figura 2). Os serótipos VI a VIII não foram identificados.

As variações na distribuição de serótipos foram observadas em especial nos últimos anos, altura em que se pôde notar o incremento dos serótipos Ib e IV (anteriormente menos frequentes). Observou-se um aumento da frequência do serótipo IV, de 1,4% em 2006 para 19,6% em 2012, ano em que foi o segundo serótipo mais detectado (Figura 2). É de realçar que o serótipo II se manteve estável ao longo deste período, com a sua frequência a variar entre 12,2% e 15,8%.

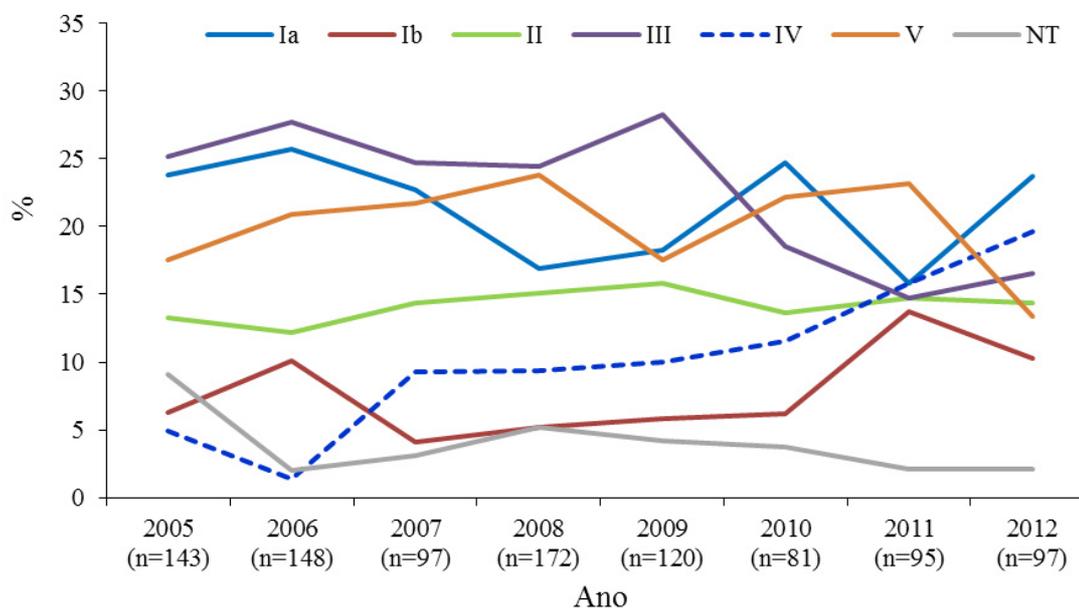


Figura 2 – Distribuição dos serótipos das estirpes de *S. agalactiae* de colonização (n=953) isoladas de mulheres em idade reprodutiva, em Portugal, de 2005 a 2012

2. Susceptibilidade aos antimicrobianos

Não foram detectadas estirpes resistentes ou com susceptibilidade reduzida à vancomicina ou à penicilina G.

As percentagens de resistência à eritromicina e à clindamicina variaram de 14,2% a 23,2% e de 5,8% a 17,5%, respectivamente (Tabela 3). As taxas mais altas de resistência para ambos os antibióticos foram observadas nos dois últimos anos (2011 e 2012) (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição das resistências à eritromicina e à clindamicina para as 953 estirpes em estudo, de 2005 a 2012

Ano (N.º estirpes)	Resistência à Eritromicina N.º estirpes (%)	Resistência à Clindamicina N.º estirpes (%)
2005 (n=143)	22 (15,4%)	12 (8,4%)
2006 (n=148)	21 (14,2%)	12 (8,1%)
2007 (n=97)	18 (18,6%)	12 (12,4%)
2008 (n=172)	25 (14,5%)	12 (7%)
2009 (n=120)	17 (14,2%)	7 (5,8%)
2010 (n=81)	17 (21%)	10 (12,3%)
2011 (n=95)	22 (23,2%)	16 (16,8%)
2012 (n=97)	20 (20,6%)	17 (17,5%)

Estirpes de vários serótipos evidenciaram resistência à eritromicina e à clindamicina (Figura 3). Apesar da predominância dos serótipos III e V entre 2005 e 2008, de 2010 a 2012 observou-se um aumento da frequência da resistência à eritromicina e à clindamicina nos serótipos Ib e IV (Figura 3).

De notar que em 2006 e 2007 nenhum isolado do serótipo IV foi resistente à eritromicina ou à clindamicina (Figura 3) e que em 2005, 2008 e 2009 a resistência à eritromicina e à clindamicina variou de 0,6% a 0,8% e de 0,7% a 1,2%, respectivamente. A partir de 2010 e até 2012 verificou-se um aumento da percentagem

de estirpes do serótipo IV resistentes a ambos os antimicrobianos. Em 2010, 2011 e 2012 o serótipo IV apresentou uma frequência de resistência à eritromicina de 2,5% (n=2/81), 4,2% (n=4/95) e 3,1% (n=3/96) e de resistência à clindamicina de 1,2% (n=1/81), 2,1% (n=2/95) e 3,1% (n=3/96), respectivamente.

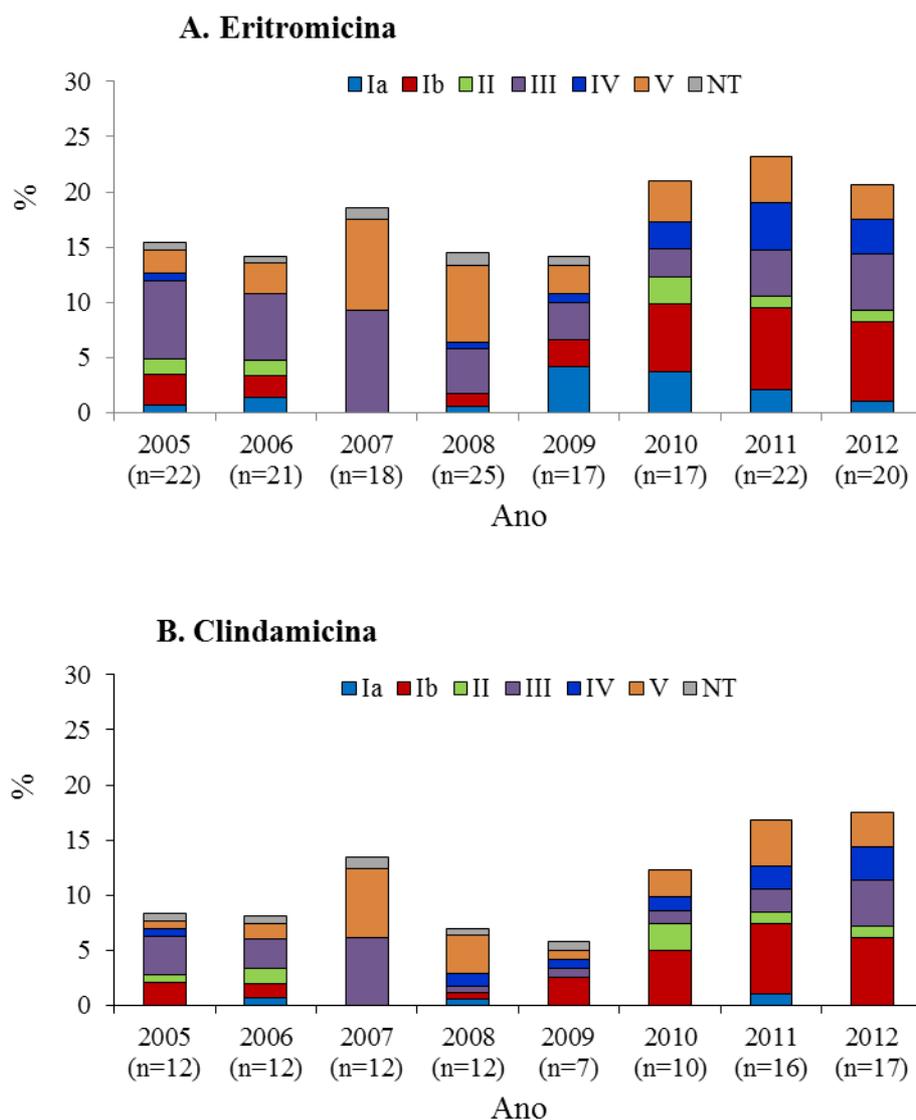


Figura 3 – Percentagem dos diferentes serótipos nas estirpes resistentes à eritromicina (A) e clindamicina (B) em Portugal, de 2005 a 2012

3. Caracterização das estirpes de *S. agalactiae* do serótipo IV

No presente estudo foram identificadas 88 estirpes de *S. agalactiae* do serótipo IV, inicialmente por serotipagem e posteriormente por genotipagem molecular. Estas 88 estirpes foram caracterizadas através da avaliação da produção de DNases, MLST, detecção das sequências de inserção IS1381 e IS861, de elementos móveis na região intergênica *scpB-lmb* e de proteínas de superfície da família Alp.

3.1. Avaliação da produção de DNases

Foi detectada produção de nucleases extracelulares em todas as 88 estirpes.

3.2. Identificação de Linhagens Genéticas por MLST

Por MLST foi possível identificar 16 sequências tipo (ST) diferentes: ST1, ST2, ST3, ST8, ST10, ST12, ST19, ST23, ST24, ST28, ST130, ST144, ST162, ST196, ST288 e ST291, pertencentes a cinco linhagens genéticas ou complexos clonais (CC) distintos: CC1, CC12, CC17, CC19 e CC23. CC23 e CC1 foram os mais frequentes, tendo representado 35,2% e 33% das estirpes, respectivamente (Figura 4). Identificou-se ainda o *singleton* ST130 que não está incluído em qualquer complexo clonal.

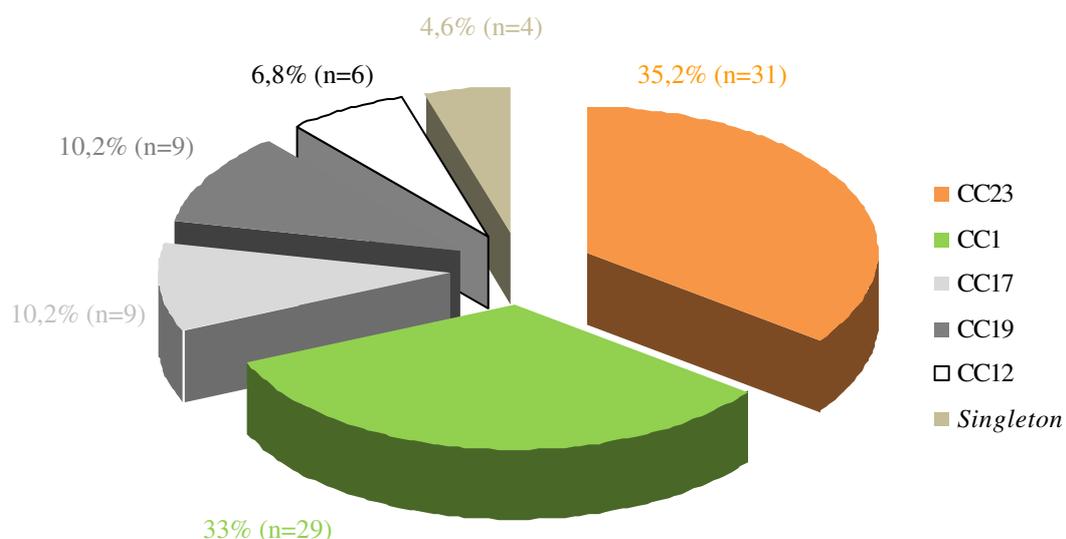


Figura 4 – Gráfico circular ilustrativo da distribuição das linhagens genéticas ou complexos clonais (CC) definidos por MLST das 88 estirpes do serótipo capsular IV de *S. agalactiae*

É de destacar a existência de nove estirpes da linhagem hipervirulenta CC17, isoladas em 2008 (n=3), 2009 (n=1), 2010 (n=1) e 2012 (n=4). A linhagem CC17 é a mais homogênea de todas as linhagens identificadas, já que as nove estirpes identificadas pertenceram ao ST291. As restantes linhagens apresentaram-se de um modo geral heterogêneas, com o CC1 constituído por cinco ST diferentes [ST1 (n=7), ST2 (n=12), ST3 (n=1), ST196 (n=8), ST288 (n=1)], o CC12 por três [ST8 (n=2), ST10 (n=3), ST12 (n=1)], o CC19 por dois [ST19 (n=7), ST28 (n=2)] e o CC23 por quatro [ST23 (n=11), ST24 (n=15), ST144 (n=4), ST162 (n=1)].

As linhagens genéticas CC1 e CC23, em conjunto, representaram 68,2% das estirpes em estudo (n=60). Contudo, a distribuição dos CC não foi homogênea ao longo dos oito anos de estudo (Figura 5).

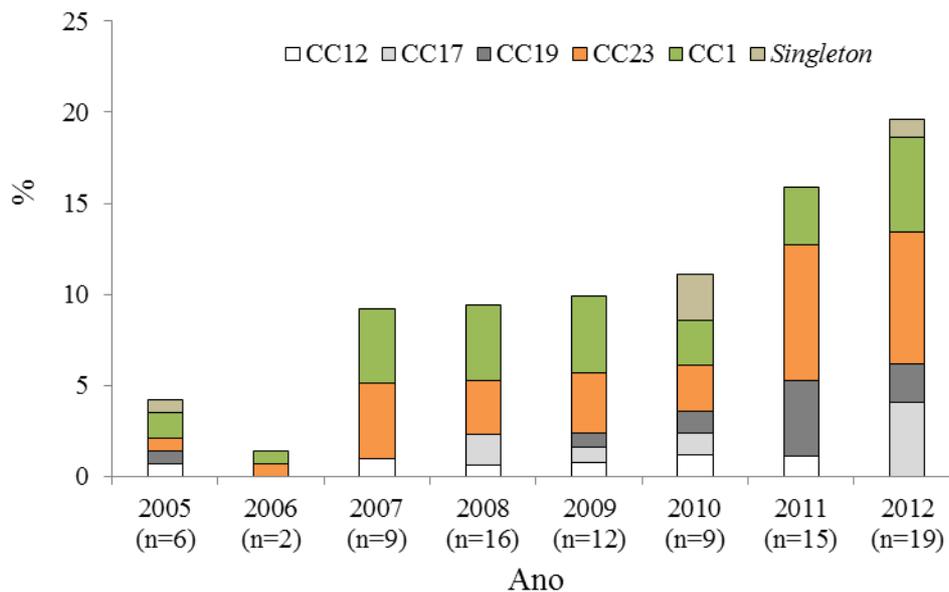


Figura 5 – Percentagem do serótipo IV de 2005 a 2010 e proporção das linhagens genéticas ou complexos clonais (CC) por ano de estudo

Apesar da proporção das linhagens genéticas por ano de estudo se revelar heterogênea, foi possível verificar que os CC mais frequentes em cada ano foram o CC1 e o CC23. Em conjunto, e com uma única exceção, estas duas linhagens representaram anualmente pelo menos 50% das estirpes do serótipo IV; a exceção verificou-se no ano de 2010, no qual a percentagem foi de 44,4%.

O CC17 foi detectado apenas a partir de 2008, por três anos consecutivos, não tendo sido identificada esta linhagem genética em 2011. Em 2012 o CC17 voltou a ser detectado e apresentou maior proporção entre os isolados do que em 2008, 2009 ou 2010, representando 21% das estirpes de *S. agalactiae* do serótipo IV.

Em 2006 e 2012 não foi detectada nenhuma estirpe de *S. agalactiae* pertencente ao CC12 (Figura 5). Nos restantes anos em estudo a sua proporção variou entre 6,3% (em 2008) e 16,7% (em 2005).

O CC19 não foi detectado de 2006 a 2008 (Figura 5) mas em 2011 foi mais frequente (26,7%) do que em 2005 (16,7%), 2009 (8,3%), 2010 (11,1%) e 2012 (10,5%).

No que diz respeito ao ST130 apenas se verificou a presença de estirpes desta linhagem nos anos 2005 (n=1), 2010 (n=2) e 2012 (n=1) (Figura 5).

A heterogeneidade de distribuição das linhagens genéticas entre 2005 e 2012 permite concluir que o aumento da frequência do serótipo IV não foi devida ao aumento de um CC em particular ou à existência de uma nova linhagem (Figura 5).

3.3. Relação entre linhagem genética e resistência à eritromicina e clindamicina

Dez das 88 estirpes em estudo (11,4%) revelaram resistência simultânea à eritromicina e à clindamicina e três estirpes (3,4%) foram apenas resistentes à eritromicina.

Apenas a linhagem genética ST130 não evidenciou estirpes resistentes à eritromicina e/ou à clindamicina.

O CC1 e o CC23 reúnem 69,2% e 72,7% das estirpes com resistência à eritromicina e à clindamicina, respectivamente. O CC12 reuniu duas estirpes com resistência, uma de 2005 (eritromicina e clindamicina) e outra de 2011 (apenas eritromicina). Apenas uma estirpe do CC17 em 2012 e uma do CC19 em 2009 foram resistentes à eritromicina e à clindamicina.

Uma estirpe CC23 isolada em 2008 apresentou um perfil de resistência à clindamicina e de susceptibilidade à eritromicina, indicando um fenótipo de resistência às lincosamidas (Lin).

A amplificação por PCR dos genes de resistência *ermA*, *ermB* e *mefA* permitiu identificar os diferentes fenótipos de resistência aos macrólidos. Em oito das nove estirpes simultaneamente resistentes à eritromicina e clindamicina e com CMI ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$, foi detectada a presença do gene *ermB* (fenótipo cMLS_B). Uma das nove estirpes com CMI ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ para a eritromicina e clindamicina tinha o gene *ermA*. Este gene foi ainda detectado numa estirpe com resistência à clindamicina induzida pela eritromicina (fenótipo iMLS_B). Nas estirpes que foram apenas resistentes à eritromicina (com CMI entre 6 e 32 $\mu\text{g/ml}$) foi detectado o gene *mefA* (n=3, fenótipo M).

3.4. Análise Filogenética

A técnica de MLST, como já foi referido, permitiu a identificação de dezasseis ST distintos nas estirpes de *S. agalactiae* do presente estudo, correspondendo a cinco linhagens genéticas designadas por CC1, CC12, CC17, CC19 e CC23 e a um *singleton* (ST130).

As sequências obtidas por MLST permitiram construir uma árvore filogenética (Figura 6), tendo os vários ST sido agrupados nos CC esperados, de acordo com associações identificadas em estudos anteriores (44), à excepção dos ST3 e ST288 que, apesar de pertencerem ao CC1 (DLV de ST1), não agruparam com os restantes ST desta linhagem genética (Figura 6). Tal deveu-se provavelmente ao facto dos ST3 e ST288 apresentarem apenas uma diferença nucleotídica entre si e um maior número de diferenças nucleotídicas relativamente aos outros ST do CC1 (ST1, ST2 e ST196). Através da análise das sequências verificou-se que o ST3 possuía sete, oito e nove nucleótidos diferentes de ST1, ST2 e ST196, respectivamente, e que o ST288 possuía oito diferenças nucleotídicas de ST1, nove de ST2 e dez de ST196. Os ST1, ST2 e ST196 apresentaram entre si apenas entre uma a duas diferenças de nucleótidos.

As estirpes dos CC1 e CC19 são provavelmente relacionadas já que o ST2 constitui um SLV de ST1 e um DLV de ST19. As estirpes dos CC12, CC17 e CC23 foram consideradas menos relacionadas.

No CC23 observou-se a existência de ramos divergentes (Figura 6). Isto justificou-se, mais uma vez, pelo número de diferenças de nucleótidos existentes entre as sequências dos vários ST. Assim, o ST162 apresentou dez nucleótidos de diferença em relação ao ST23, onze em relação ao ST144 e apenas cinco em relação ao ST24, motivo pelo qual se encontra filogeneticamente mais próximo deste último. Por sua vez, o ST24 foi mais próximo do ST23 (cinco diferenças nucleotídicas) que do ST144 (seis diferenças nucleotídicas). Os ST23 e ST144 tiveram origem no mesmo ramo da árvore (Figura 6) e distaram apenas três nucleótidos (ST144 é um SLV de ST23 enquanto que o ST24 e ST162 são ambos DLV de ST23).

O ST130 é considerado um *singleton* uma vez que possui mais de dois alelos diferentes dos sete *loci* das restantes estirpes, não pertencendo portanto a nenhum dos complexos clonais identificados nesta colecção (conforme critério definido em II. 9.). A

linhagem mais próxima do ST130 é o CC12, o qual tem polimorfismos em quatro alelos (*sdhA*, *adhP*, *pheS* e *tkt*), correspondendo a sete nucleótidos de diferença.

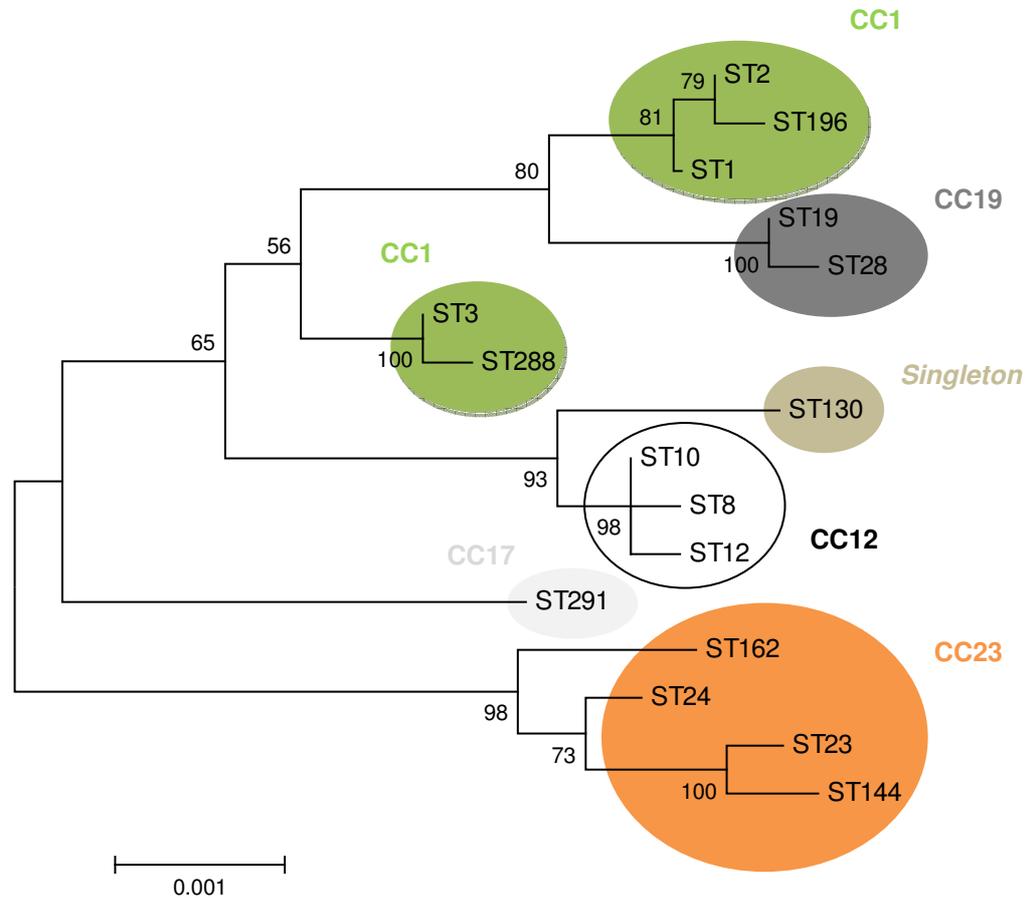


Figura 6 – Árvore filogenética construída com base na análise das seqüências dos *loci* de *S. agalactiae* incluídos no MLST. A história evolutiva foi inferida pelo método Neighbor-Joining e as distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método de Kimura-2 parâmetros (unidades do número de substituições de bases por local)

O número médio de diferenças entre as seqüências analisadas foi de 19,292 em 3456 nucleótidos. A distância máxima foi de 35 nucleótidos (entre ST144 e ST196) e a distância mínima de apenas um nucleótido (entre ST1 e ST2, ST3 e ST288, ST8 e ST10, ST10 e ST12, ST2 e ST196, ST19 e ST28).

3.5. Subcaracterização das linhagens de *S. agalactiae*

As sequências de inserção *IS1381*, *IS861* e *ISSa4*, os elementos móveis da região intergênica *scpB-lmb* (*GBSi1* e *IS1548*) e as proteínas de superfície da família Alp são biomarcadores que permitiram subcaracterizar as linhagens de *S. agalactiae* do serótipo IV (Figura 7). Neste trabalho verificou-se a existência de baixa especificidade (com visualização de múltiplas bandas no gel) na detecção da *ISSa4*, o que impossibilitou a interpretação dos resultados.

No caso da linhagem genética CC1 o perfil mais comum foi a ausência de elementos móveis na região intergênica *scpB-lmb* (93,1%), a presença de ambas as sequências de inserção, *IS1381* e *IS861* (86,2%), e a presença do gene que codifica a proteína de superfície Alp1 (65,5%) (Figura 7). No entanto, o elemento móvel *GBSi1* bem como a *IS1548* foram detectados, cada um, com uma frequência de 3,4% (n=1). Relativamente aos genes que codificam proteínas de superfície da família Alp o único não detectado nas estirpes do CC1 foi o *alp4*. A detecção dos genes que codificam a Alp 2/3, Alpha C e Rib oscilou entre os 3,4% (Rib) e os 24,1% (Alp 2/3).

O perfil do CC12 é bastante semelhante ao do CC1 (Figura 7), embora mais homogêneo, com total ausência de MGE na região intergênica *scpB-lmb* e com todas as estirpes a evidenciarem as sequências de inserção (*IS1381* e *IS861*). Foram detectados genes que codificavam a proteína Alpha C ou Alp4 em 83,3% e 16,7% das estirpes, respectivamente.

A linhagem genética CC17 foi considerada tão homogênea quanto a CC12, tendo-se obtido resultados muito semelhantes para os biomarcadores estudados em todas as estirpes (Figura 7). Assim, as nove estirpes CC17 apresentaram o elemento móvel *GBSi1* na região intergênica *scpB-lmb*, a sequência de inserção *IS861* e o gene *rib*. Apenas numa das estirpes (isolada em 2010) foi detectada também a presença da *IS1381* (11,1%), para além da *IS861*.

O CC19 apresentou homogeneidade para as sequências de inserção e para as proteínas de superfície, já que todas as estirpes possuíam *IS1381*, *IS861* e o gene *rib* (Figura 7). No caso dos MGE (*GBSi1* e *IS1548*) o perfil apresentado não foi uniforme; o *GBSi1* foi detectado em duas estirpes, enquanto a *IS1548* foi detectada em quatro. Numa das estirpes CC19 não foi possível detectar a presença/ausência de MGE na

região intergênica *scpB-lmb*, motivo pelo qual os resultados não foram considerados para a construção do gráfico térmico (Figura 7). No entanto, os restantes resultados obtidos para esta estirpe (sequências de inserção e gene *alp*) foram uniformes com os resultados obtidos para esta linhagem. O facto de não se ter detectado presença/ausência de MGE na região intergênica *scpB-lmb* pode significar que esta estirpe (ST28, isolada em 2009) poderá não possuir esta região.

No caso do CC23 a frequência de ausência de elementos móveis na região intergênica *scpB-lmb* foi de 96,8% e de presença de ambas as sequências de inserção (*IS1381* e *IS861*) foi de 93,5%. Apenas em dois casos não se detectou a presença da *IS1381*, sendo a totalidade das estirpes positivas para a *IS861*. A maioria das estirpes possuía o gene que codifica a proteína de superfície Alpha C (51,6%). As restantes possuíam o gene *alp1* (35,5%) ou *rib* (13%) (Figura 7).

O perfil do ST130 foi comum em todas as estirpes desta linhagem genética (sem *GBSi1* ou *IS1548* na região intergênica *scpB-lmb*, com detecção das *IS1381* e *IS861* e do gene *alphaC*) (Figura 7). De notar que este ST apresenta um perfil semelhante ao do CC12 para os biomarcadores estudados.

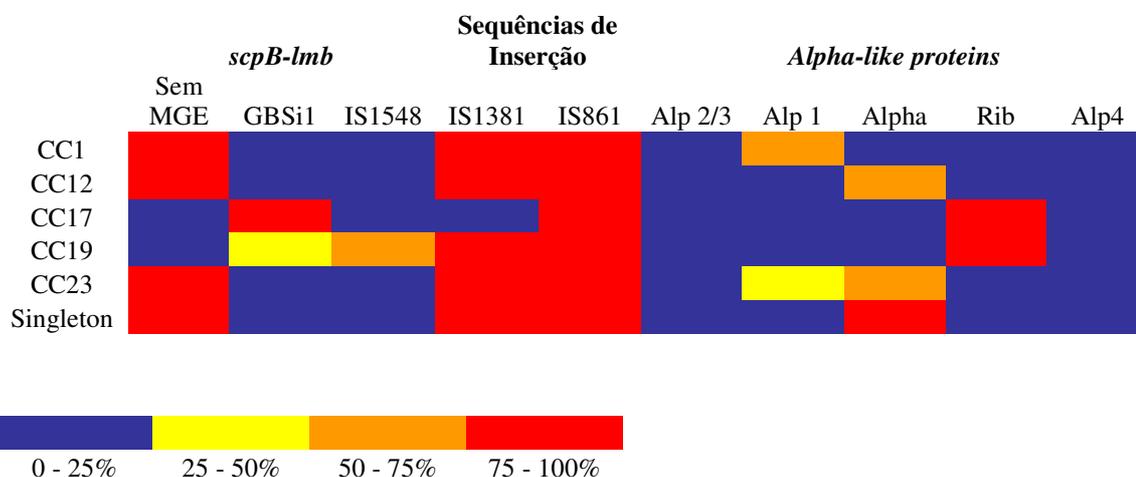


Figura 7 – Gráfico térmico representando os perfis dos biomarcadores moleculares (presença de MGE *IS1548* e *GBSi1* na região intergênica *scpB-lmb*; sequências de inserção *IS1381* e *IS861*; e genes da família *Alpha-Like Protein*) nos complexos clonais (CC) das 88 estirpes de *S. agalactiae* do serótipo IV

De um modo geral, foi observada associação entre a presença de GBSi1 na região intergénica *scpB-lmb* e o CC17, enquanto a maioria das restantes estirpes (76,1%) não possuía qualquer elemento móvel nesta região. Observou-se ainda que a presença das IS1381 e IS861 foi uma característica comum a 84,1% das estirpes estudadas, sendo que no CC17 normalmente se detectou exclusivamente a IS861 (88,9%). Relativamente às proteínas de superfície da família Alp verificou-se uma associação entre Alp1 e CC1, Alpha C e CC12, Rib e CC17/CC19 e Alpha C e ST130.

IV – Discussão

S. agalactiae é responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade na grávida e no recém-nascido e também em adultos não gestantes, particularmente nos imunodeprimidos e nos idosos (3). Apesar do tratamento atempado e da melhoria nos cuidados perinatais, estima-se que até 10% das infecções neonatais por *S. agalactiae* sejam letais e que entre 25% a 35% das crianças com meningite desenvolvam sequelas neurológicas permanentes (5). Assim, as principais linhas de investigação em *S. agalactiae* visam contribuir para a descoberta de mecanismos de prevenção mais eficazes (21).

1. Distribuição dos serótipos e dos perfis de resistência aos antibióticos nas estirpes de *S. agalactiae* da colecção em estudo

No presente estudo, a análise da tendência da distribuição dos serótipos de *S. agalactiae* em 953 estirpes de colonização isoladas em sete instituições de saúde portuguesas entre 2005 e 2012 permitiu identificar um notável aumento na frequência do serótipo IV entre 2006 e 2012 (18,2%). Esta observação corrobora os resultados de estudos efectuados nos EUA, nos Emirados Árabes Unidos e no Brasil (2, 17, 72). O relativo predomínio do serótipo IV poderá relacionar-se com uma melhor adaptação ao hospedeiro que proporcione maior facilidade de colonização/infecção. De facto, nos EUA, durante a última década, foi evidenciada a emergência de estirpes invasivas de *S. agalactiae* de serótipo IV (25), situação que não foi possível avaliar no presente trabalho já que a colecção disponibilizada apenas incluía estirpes de colonização.

Dada a possibilidade do serótipo IV poder vir a emergir como um importante agente infeccioso, tal como aconteceu com o serótipo V em 1990 (17, 89), o principal objectivo do presente trabalho foi caracterizar as estirpes do serótipo IV de entre as estirpes incluídas na colecção de *S. agalactiae*. Pretendeu-se igualmente determinar a evolução da frequência do serótipo IV e o seu contributo no perfil de distribuição de resistência aos antimicrobianos entre 2005 e 2012.

No que diz respeito à susceptibilidade aos antimicrobianos todas as estirpes foram totalmente sensíveis à penicilina G e vancomicina. O perfil da distribuição das resistências à eritromicina e clindamicina manteve-se muito semelhante durante os últimos três anos (2010-2012). É de realçar o contributo das estirpes do serótipo IV neste período, no qual se observou o decréscimo da importância do serótipo III (e V), anteriormente descrita em Portugal e Espanha (29, 65). Tal observação coincide com o recentemente descrito nos EUA por Ferrieri e colaboradores (25), num estudo compreendendo estirpes invasivas do serótipo IV. A emergência de novos serótipos resistentes aos antibióticos de segunda linha suscita sérios problemas para a profilaxia antibiótica intraparto em grávidas alérgicas à penicilina.

2. Avaliação da actividade das DNases

Todas as estirpes do serótipo IV revelaram ser produtoras de DNases o que pode significar uma maior patogenicidade deste serótipo, dado o reconhecido papel das DNases na evasão à resposta imunitária inata, ao promoverem a destruição das NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) (92).

3. Linhagens genéticas e resistência aos antibióticos de segunda linha

Com o intuito de proceder à identificação das linhagens genéticas das estirpes do serótipo IV, recorreu-se à metodologia MLST pelo seu elevado poder discriminatório. Foram identificadas as cinco linhagens genéticas principais (CC1, CC12, CC17, CC19 e CC23) e ainda um *singleton* (ST130), num total de dezasseis ST e verificou-se a existência duma elevada heterogeneidade entre as estirpes do serótipo IV. Esta heterogeneidade foi recentemente descrita num estudo abrangendo estirpes *S. agalactiae* invasivas (25), no qual foram identificados cinco ST nas oito estirpes do serótipo IV em estudo.

É importante notar que, quer no nosso estudo com estirpes de colonização quer no estudo de Ferrieri e colaboradores (25) com estirpes invasivas, o aumento do número de estirpes do serótipo IV não se deveu a uma linhagem genética em particular. As

linhagens genéticas mais frequentes no presente estudo foram o CC1 e o CC23 que, em conjunto, representaram 68,2% das estirpes em estudo. Mais uma vez este resultado esteve em consonância com o estudo de Ferrieri e colaboradores (25) no qual 75% das estirpes de serótipo IV pertenciam exactamente aos CC1 e CC23. Serão necessários mais estudos para avaliar a associação entre linhagens e aumento da frequência de determinados serótipos, tal como observado para o serótipo IV.

Relativamente à relação entre linhagem genética e resistência aos antimicrobianos, mais concretamente à eritromicina e clindamicina, verificou-se que as linhagens mais representativas foram o CC1 e o CC23. Contudo, tal observação reflecte, provavelmente e apenas, a maior frequência dos dois CC nas estirpes em estudo.

4. Análise Filogenética

A análise das sequências obtidas por MLST para as estirpes do serótipo IV permitiu a construção de uma árvore filogenética que representa de forma fidedigna a relação das linhagens genéticas entre si. Todos os ST, com excepção dos ST3 e ST288 foram agrupados nos CC esperados de acordo com a literatura (44). Apesar de ST3 e ST288 serem DLV de ST1, é importante considerar as diferenças nucleotídicas existentes, sete em ST3 e oito em ST288 (num total de 3456 nucleótidos), já que a análise das sequências e da árvore filogenética sugere que os ST3 e ST288 poderão não pertencer efectivamente ao CC1. A vantagem deste tipo de análise filogenética relativamente a outras, nomeadamente com recurso ao algoritmo BURST (eBURST; <http://eburst.mlst.net/>), é o agrupamento com base na comparação das sequências nucleotídicas e não apenas no número de alelos diferentes, permitindo identificar com precisão os isolados que mais se relacionam. Neste caso, se tivesse sido utilizado o programa eBURST ter-se-ia inferido incorrectamente a proximidade dos ST3 e ST288 com o CC1. Uma forma de evitar este tipo de erros seria considerar-se que uma linhagem é definida pela partilha entre isolados de seis (e não cinco como definido em II. 9.) ou mais *loci* com pelo menos um outro membro do grupo, de forma a obter um critério mais discriminatório.

A análise da árvore filogenética evidencia a proximidade entre CC1 e CC19, permitindo pensar na existência dum provável ancestral comum; o mesmo fenómeno pode ser equacionado entre ST130 e CC12.

5. Subcaracterização das estirpes da linhagem hipervirulenta CC17

A linhagem hipervirulenta CC17 de *S. agalactiae*, assim designada devido à sua associação com a meningite neonatal, é o protótipo dum clone emergente que se disseminou com sucesso. O aumento da prevalência de infecção neonatal observada após 1960 está provavelmente associado a esta linhagem genética, até então quase exclusivamente composta por estirpes pertencentes ao serótipo III, sendo por esse motivo considerado como um clone de epidemia homogéneo (5, 43). No entanto, foi recentemente descrita uma comutação capsular na linhagem CC17 (troca de um segmento de 35,5 kb de DNA contendo a totalidade do operão da cápsula, culminando num *switching* de cápsula do serótipo III para o IV) em estirpes isoladas nos anos 2009, 2010 e 2011. Tal comutação, que pode ser considerada expectável já que é em torno do *locus cps* que existe maior densidade de pontos de recombinação, terá originado clones hipervirulentos CC17 com cápsula do serótipo IV, descritos em várias regiões do mundo (5, 25, 99) e mais recentemente em Portugal (nove estirpes desde 2008). Esta associação é motivo de grande preocupação uma vez que este novo clone, associado à maior frequência do serótipo IV entre as estirpes circulantes, à produção de DNases e à resistência aos antibióticos de segunda linha, reúne as condições para alcançar notável sucesso epidemiológico.

As estirpes da linhagem hipervirulenta CC17 e cápsula de serótipo IV isoladas em Portugal, em França e nos EUA partilham o mesmo ST, ST291, que difere do ST17 por um SNP (*single-nucleotide polymorphism*) na posição 492 do gene *pheS* (5). Tal facto sugere que possa ter ocorrido um evento de recombinação único num ancestral comum; no entanto, esta hipótese precisa de uma avaliação mais aprofundada, já que as estirpes surgiram aparentemente em simultâneo em regiões geograficamente distantes.

No presente estudo a pesquisa de elementos genéticos móveis na região intergénica *scpB-lmb* e das *IS1381* e *IS861* para as estirpes ST291 procurou avaliar a hipótese de

origem clonal, uma vez que a sua aquisição via eventos de recombinação ou transferência horizontal está relacionada com a evolução e adaptação de *S. agalactiae* ao ambiente em que se encontram (38). Todos os isolados do clone IV/ST291 revelaram partilhar o mesmo perfil, apresentando GBSi1 na região intergénica *scpB-lmb* e IS861. Apenas um clone isolado em 2010 apresentou igualmente a IS1381. Este perfil está assim de acordo com o esquema evolutivo proposto por Héry-Arnaud e colaboradores (38) para o CC17. No que diz respeito à susceptibilidade aos antimicrobianos, um dos nove clones IV/ST291 (isolado em 2012) revelou resistência à eritromicina e à clindamicina. A existência de variantes com IS1381 ou com resistência a antibióticos sugere um estado evolutivo diferencial a partir de um antepassado comum.

Relativamente às proteínas de superfície da família Alp, todas as estirpes exibiram o gene que codifica a proteína Rib, o que se assemelha ao descrito em estudos anteriores que relatavam uma associação desta linhagem com o serótipo III (13, 32).

Apesar da linhagem hipervirulenta CC17 estar fortemente associada a infecção neonatal (5, 43), o mesmo não se tem verificado especificamente para as estirpes do clone IV/ST291. De facto, dois estudos envolvendo estirpes invasivas efectuados em locais geograficamente distantes (França e EUA), revelaram que apenas uma das cinco estirpes tinha sido isolada de um caso de EOD, tendo as restantes quatro sido isoladas em adultos (5, 25).

6. Subcaracterização das estirpes das restantes linhagens genéticas identificadas

A linhagem genética CC19 apresentou um perfil relativamente homogéneo para os biomarcadores moleculares avaliados neste estudo, apresentando IS1381, IS861 e o gene *rib* em todas as estirpes. No que se refere aos elementos móveis da região intergénica *scpB-lmb*, segundo Héry-Arnaud e colaboradores (38) esta linhagem é normalmente marcada epidemiologicamente pela presença da IS1548. No presente estudo, este MGE foi identificado em 75% das estirpes de serótipo IV, sendo que as restantes apresentavam GBSi1. Esta discrepância pode resultar do facto do esquema evolutivo proposto por Héry-Arnaud e colaboradores (38) ter sido baseado em estirpes da linhagem CC19 dos serótipos II, III, V e NT, mas poderá igualmente ser o reflexo da

constante evolução de *S. agalactiae*. Dois estudos parecem corroborar esta interpretação. Por um lado, o estudo de Luan e colaboradores (61) identificou IS1548 como marcador genético do CC19 mas apenas foram avaliadas estirpes de serótipo III. Por outro, Safadi e colaboradores (82) verificaram a presença de GBSi1 em 38,1% das estirpes CC19 dos serótipos II e NT.

No presente estudo, numa das estirpes CC19 (ST28, isolada em 2009) não foi possível detectar a presença/ausência de elementos genéticos móveis na região *scpB-lmb* o que poderá ser indicativo da ausência desta região do seu genoma. Tal observação pode ser sugestiva de origem bovina (directa ou indirecta), uma vez que os genes *scpB* e *lmb* estão normalmente ausentes nas estirpes isoladas de amostras biológicas bovinas (28).

Para as linhagens CC1, CC12 e CC23 não se verificou a existência de elementos genéticos móveis na região intergénica *scpB-lmb*, mas foram detectadas as IS1381 e IS861 nas estirpes pertencentes ao CC1 e CC12, tal como descrito por Héry-Arnaud e colaboradores (38). A identificação da IS861 em apenas 86,2% das estirpes da linhagem CC1, e não na sua totalidade, pode dever-se à perda da IS861 após aquisição por um ancestral comum, tal como proposto por aqueles autores (38). No que diz respeito ao CC23, a frequência das IS1381 e IS861 no presente estudo não está de acordo com o esquema evolutivo proposto por Héry-Arnaud e colaboradores (38), mas tal pode dever-se ao escasso número de estirpes do serótipo IV avaliadas por estes autores.

7. Associação entre linhagens genéticas e proteínas da família Alp

Estudos anteriores (13, 53) estabeleceram uma associação entre serótipos e proteínas Alp. No entanto, no presente estudo, as várias proteínas desta família puderam ser observadas nas estirpes do serótipo IV, o que provavelmente se deve ao facto de se ter incluído neste estudo um maior número de estirpes deste serótipo, podendo mesmo verificar-se uma associação entre complexos clonais e proteínas da família Alp.

V – Conclusões

Este trabalho revelou um notável aumento na frequência do serótipo IV entre as estirpes de colonização, bem como a sua associação com a resistência a antibióticos de segunda linha (sobretudo entre 2010 e 2012). Este cenário torna-se mais preocupante uma vez que foi detectada entre as estirpes do serótipo IV a linhagem hipervirulenta CC17, a qual representa um grupo clonal emergente que reúne características para alcançar sucesso epidemiológico.

Considera-se ainda importante realçar a proximidade das linhagens CC17 e CC19 entre as estirpes do serótipo IV. A linhagem CC17, antes quase exclusivamente composta por estirpes pertencentes ao serótipo III, e associada sobretudo a infecção, foi agora detectada em estirpes do serótipo IV de colonização. Por outro lado, o CC19, tradicionalmente associado a estirpes de colonização do serótipo III e habitualmente distinguido pela presença da IS1548, associou-se ao serótipo IV e evidenciou GBSi1 na região intergénica *scpB-lmb* em duas estirpes. Torna-se assim claro que as características das linhagens genéticas são díspares em serótipos diferentes e evidenciam a constante evolução/adaptação de *S. agalactiae*. Acresce ainda que a frequência do serótipo IV não tem por base apenas a emergência do clone IV/CC17, já que foram identificadas outras linhagens genéticas com destaque na distribuição do serótipo IV neste período de oito anos (i.e. CC1 e CC23).

Em termos de perspectivas futuras, considera-se importante a monitorização das infecções por *S. agalactiae* de forma implementar estratégias preventivas adequadas, nomeadamente o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz. Uma cuidadosa vigilância do clone emergente *S. agalactiae* IV/ST291 é recomendada, a fim de definir a sua especificidade ao hospedeiro, tropismo, potencial de virulência e fenótipo de resistência a antibióticos. Seria igualmente importante avaliar o papel das linhagens genéticas CC1 e CC23 no aumento da prevalência do serótipo IV e na resistência aos antibióticos de segunda linha. Assim, a realização de estudos epidemiológicos em regiões geográficas diversas poderia esclarecer sobre a origem de novos clones e sobre o verdadeiro contributo dos diferentes serótipos (actualmente com especial foco no

serótipo IV), linhagens genéticas e clones de *S. agalactiae* em situações de colonização/infecção e na resistência aos antibióticos.

VI – Referências Bibliográficas

1. **Almeida, A., J. Agro, and L. Ferreira.** 2004. Estreptococo β Hemolítico do grupo B: Protocolo de Rastreio e Prevenção de doença Perinatal. Consensos Nacionais em Neonatologia, Sociedade Portuguesa de Pediatria. http://www.spp.pt/UserFiles/File/Consensos_Nacionais_Neonatologia_2004/Estreptococo_Hemolitico_GrupoB.pdf, 30.08.2012.
2. **Amin, A., Y. M. Abdulrazzaq, and S. Uduman.** 2002. Group B Streptococcal Serotype Distribution of Isolates from Colonized Pregnant Women at the Time of Delivery in United Arab Emirates. *Journal of Infection.* **45**:42-46.
3. **Beitune, P., G. Duarte., and C. M. L. Maffei.** 2005. Colonization by *Streptococcus agalactiae* During Pregnancy: Maternal and Perinatal Prognosis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* **9**:276-282.
4. **Bell, J. M., J. C. Paton, and J. Turnidge.** 1998. Emergence of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in Australia: Phenotypic and Genotypic Characteristics of Isolates. **36**:2187-2190.
5. **Bellais, S., A. Six, A. Fouet, M. Longo, N. Dmytruk, P. Glaser, P. Trieu-Cuot, and Claire Poyart.** 2012. Capsular Switching in Group B *Streptococcus* CC17 Hypervirulent Clone: A Future Challenge for Polysaccharide Vaccine Development. *The Journal of Infectious Diseases.* **206**:1745-1752.
6. **Berends, E. T. M., A. R. Horswill, N. M. Haste, M. Monestier, V. Nizet, and M. von Kockritz-Blickwede.** 2010. Nuclease Expression by *Staphylococcus aureus* Facilitates Escape from Neutrophil Extracellular Traps. *Journal of Innate Immunity.* **2**:576-586.
7. **Bisharat, N., D. W. Crook, J. Leigh, R. M. Harding, P. N. Ward, T. J. Coffey, M. C. Maiden, T. Peto, and N. Jones.** 2004. Hyperinvasive Neonatal

Group B *Streptococcus* Has Arisen from a Bovine Ancestor. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**:2161-2167.

8. **Bohnsack, J.F., A. Whiting, M. Gottschalk, D. M. Dunn, R. Weiss, P. H. Azimi, J. B. Philips, L. E. Weisman, G. G. Rhoads, and F. Y. Lin.** 2008. Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six U.S. Academic Centers from 1995 to 1999. *Journal of clinical microbiology*. **46**:1285-1291.
9. **Broker, G. and B. Spellerberg.** 2004. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and horizontal gene transfer. *International Journal of Medical Microbiology*. **294**:169-175.
10. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2010. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: Revised Guidelines. *MMWR*. **59**:1-23.
11. **Cieslewicz, M. J., D. Chaffin, G. Glusman, D. Kasper, A. Madan, S. Rodrigues, J. Fahey, M. R. Wessels, and C. E. Rubens.** 2005. Structural and Genetic Diversity of Group B *Streptococcus* Capsular Polysaccharides. *Infection and Immunity*. **73**:3096-3103.
12. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2011. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21. **31**:1-163.
13. **Creti, R., F. Fabretti, G. Orefici, and C. von Hunolstein.** 2004. Multiplex PCR Assay for direct Identification of Group B *Streptococcal* Alpha-Protein-Like Protein Genes. *Journal of clinical microbiology*. **42**:1326-1329.
14. **Damião, V.** 2012. Produção de DNases extracelulares em estirpes de *Streptococcus agalactiae* de origem humana e bovina. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

15. **Daniels, J. P., J. Gray, H. M. Pattinson, R. Gray, R. K. Hills, and K. S. Khan on behalf of the GBS Collaborative Group.** 2011. Intrapartum tests for group B streptococcus: accuracy and acceptability of screening. *BJOG*. **118**:257-265.
16. **De Azavedo, J.C., M. McGavin, C. Duncan, D. E. Low, and A. McGeer.** 2001. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive group B *Streptococcus* isolates from Ontario, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**:3504-3508.
17. **Diedrick, M. J., A. E. Flores, S. L. Hillier, R. Creti, and Patricia Ferrieri.** 2010. Clonal Analysis of Colonizing Group B *Streptococcus*, Serotype IV, an Emerging Pathogen in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**:3100-3104.
18. **Dmitriev, A., A. Shen, X. Shen, and Y. Yang.** 2004. ISSa4-Based Differentiation of *Streptococcus agalactiae* Strains and Identification of Multiple Target Sites for ISSa4 Insertions. *Journal of Bacteriology*. **186**:1106-1109.
19. **Domelier, A-S, N. Mee-Marquet, L. Arnault, L. Mereghetti, P. Lanotte, A. Rosenau, M-F. Lartigue, and R. Quentin.** 2008. Molecular characterization of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **62**:1227-1233.
20. **El Aila, N. A., I. Tency, G. Claeys, B. Saerens, P. Cools, H. Verstraelen, M. Temmerman, R. Verhelst, and M. Vaneechoutte.** 2010. Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B *Streptococcus* carriage in pregnant women. *BMC Infectious Diseases*. **10**:285.
21. **Facklam, R.** 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*. **15**:613-630.

22. **Farinha, C.** 2012. Caracterização de estirpes de *Streptococcus agalactiae* provenientes de colonização dos tratos genitourinário e gastrointestinal da mulher grávida. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
23. **Farley, M.** 2001. Group B *Streptococcal* Disease in Nonpregnant Adults. *Clinical Infections Diseases*. **33**:556-561.
24. **Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**:783-791.
25. **Ferrieri, P., R. Lynfield, R. Creti, and A. Flores.** 2013. Serotype IV and Invasive Group B *Streptococcus* Disease in Neonates. **19**:551-558.
26. **Ferrieri, P., E. D. Gray, and L. W. Wannamaker.** 1980. Biochemical and immunological characterization of the extracellular nucleases of Group B streptococci. *The Journal of Experimental Medicine*. **151**:56-68.
27. **Fitoussi, F., C. Loukil, I. Gros, O. Clermont, P. Mariani, S. Bonacorsi, I. Le Thomas, D. Deforche, and E. Bingen.** 2001. Mechanisms of macrolide resistance in clinical group B *Streptococci* isolated in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**:1889-1891.
28. **Florindo, C., J. P. Gomes, M. G. Rato, L. Bernardino, B. Spellerberg, I. Santos-Sanches, and M. J. Borrego.** 2011. Molecular epidemiology of group B streptococcal meningitis in children beyond the neonatal period from Angola. **60**:1276-1280.
29. **Florindo, C., S. Viegas, A. Paulino, E. Rodrigues, J. P. Gomes, and M. J. Borrego.** 2010. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility profiles in *Streptococcus agalactiae* colonizing strains: association of

erythromycin resistance with subtype III-I genetic clone family. *Clinical Microbiology and Infection*. **16**:1458-1463.

30. **Foxman, B., B. W. Gillespie, S. D. Manning, and C. F. Marrs.** 2007. Risk Factors for Group B *Streptococcal* Colonization: Potential for Different Transmission Systems by Capsular Type. *Ann Epidemiol*. **17**:854-862.
31. **Foxman, B., L. Zhang, J. S. Koopman, S. D. Manning, and C. F. Marrs.** 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives & Innovations*. **2**:10.
32. **Gherardi, G., M. Imperi, L. Baldassarri, M. Pataracchia, G. Alfarone, S. Recchia, G. Orefici, G. Dicuonzo, and R. Creti.** 2007. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B *Streptococci* in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**:2909-2916.
33. **Gibbs, R.S., S. Schrag, and A. Schuchat.** 2004. Perinatal Infections Due to Group B *Streptococci*. *Obstetrics & Gynecology*. **104**:1062-1076.
34. **Glaser, P., C. Rusniok, C. Buchrieser, F. Chevalier, L. Frangeul, T. Msadek, M. Zouine, E. Couvé, L. Lalioui, C. Poyart, P. Trieu-Cuot, and F. Kunst.** 2002. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Molecular Microbiology*. **45**:1499-1513
35. **Guimarães, P.C.M.** 2008. Caracterização de estirpes de *Streptococcus agalactiae* de Colonização Vaginal e/ou Rectal da Grávida. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
36. **Gygax, S. E., J. A. Schuyler, L. E. Kimmel, J. P. Trama, E. Mordechai, and M. E. Adelson.** 2006. Erythromycin and clindamycin resistance in group B *Streptococcal* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50**:1875-1877.

37. **McPherson, R. A. and M. R. Pincus.** 2007. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods (21 ed.). Saunders, Philadelphia.
38. **Héry-Arnaud, G., B. Guillaume, P. Lanotte, S. Brun, A. Rosenau, N. van der Mee-Marquet, R. Quentin, and L. Mereghetti.** 2005. Acquisition of Insertion Sequences and the GBSi1 Intron by *Streptococcus agalactiae* Isolates Correlates with the Evolution of the Species. *Journal of Bacteriology*. **187**:6248-6252.
39. **Honest, H., S. Sharma, and K. S. Khan.** 2006. Rapid Tests for Group B *Streptococcus* Colonization in Laboring Women: A Systematic review. *Pediatrics*. **117**:1055-1066.
40. **Imperi, M., G. Gherardi, A. Berardi, L. Baldassarri, M. Pataracchia, G. Dicuonzo, G. Orefici, and R. Creti.** 2011. Invasive neonatal GBS infections from an area-based surveillance study in Italy. *Clinical Microbiology and Infection*. **17**:1834-1839.
41. **Jahromi, B. N., S. Poorarian, and S. Poorbarfehee.** 2008. The Prevalence and Adverse Effects of Group B *Streptococcal* Colonization during Pregnancy. *Archives of Iranian Medicine*. **11**:654-657.
42. **Johri, A. K., L. C. Paoletti, P. Glaser, M. Dua, P. K. Sharma, G. Grandi, and R. Rappuoli.** 2006. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. **4**:932-942.
43. **Jones, N., K. A. Oliver, J. Barry, R. M. Harding, N. Bisharat, B. G. Spratt, T. Peto, and D. W. Crook.** 2006. Enhanced Invasiveness of Bovine-Derived Neonatal Sequence Type 17 Group B *Streptococcus* Is Independent of Capsular Serotype. *Enhanced Invasiveness of Neonatal GBS*. **42**:915-924.
44. **Jones, N., J. F. Bohnsack, S. Takahashi, K. A. Oliver, M. S. Chan, F. Kunst, P. Glaser, C. Rusniok, D. W. Crook, R. M. Harding, N. Bisharat, and B. G.**

- Spratt.** 2003. Multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**:2530-2536.
45. **Karatan, E. and P. Watnick.** 2009. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. **73**:310-347.
46. **Kawamura, Y., H. Fujiwara, N. Mishima, Y. Tanaka, A. Tanimoto, S. Ikawa, Y. Itoh, and T. Ezaki.** 2003. First *Streptococcus agalactiae* Isolates Highly Resistant to Quinolones, with Point Mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **47**:3605-3609.
47. **Ki, M., U. Srinivasan, K. Y. Oh, M. Y. Kim, J.-H. Shin, H. L. Hong, T. Dang, Z. Britt, and B. Foxman.** 2012. Emerging fluoroquinolone resistance in *Streptococcus agalactiae* in South Korea. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **23**:1685-1691.
48. **Kiedrowski, M. R., J. S. Kavanaugh, C. L. Malone, J. M. Mootz, J. M. Voyich, M. S. Smeltzer, K. W. Bayles, and A. R. Horswill.** 2011. Nuclease Modulates Biofilm Formation in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*. **6**:e26714.
49. **Kimura, K., S., Suzuki, J-i Wachino, H. Kurokawa, K. Yaamane, N. Shinata, N. Nagano, H. Kato, K. Shibayama, and Y. Arakawa.** 2008. First molecular characterization of Group B *Streptococci* with reduced Penicillin Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **52**:2890-2897.
50. **Kimura, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. **16**:111-120.
51. **Koenig, J.M., and W. J. Keenan.** 2009. Group B *Streptococcus* and Early-Onset Sepsis in the Era of Maternal Prophylaxis. *Pediatr Clin North Am*. **56**:689-710.

52. **Kong, F., L. M. Lambertsen, H-C. Slotved, D. Ko, H. Wang, and G. L. Gilbert.** 2008. Use of Phenotypic and Molecular Serotype Identification Methods To Characterize Previously Nonserotypeable Group B *Streptococci*. *Journal of Clinical Microbiology*. **46**:2745-2750.
53. **Kong, F., S. Gowan, D. Martin, G. James, and G. L. Gilbert.** 2002. Molecular Profiles of Group B Streptococcal Surface Protein Antigen Genes: Relationship to Molecular Serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**:620-626.
54. **Kong, F., S. Gowan, D. Martin, G. James, and G. L. Gilbert.** 2002. Serotype Identification of Group B *Streptococci* by PCR and Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**:216-226.
55. **Lachenauer, C. S., D. L. Kasper, J. Shimada, Y. Ichiman, H. Ohtsuka, M. Kaku, L. C. Paoletti, P. Ferrieri, and L. C. Madoff.** 1999. Serotypes VI and VIII Predominate among Group B Streptococci Isolated from Pregnant Japanese Women. *The Journal of Infectious Diseases*. **179**:1030-1033.
56. **Lamy, M-C, S. Dramsi, A. Billoet, H. Réglie-Poupet, A. Tazi, J. Raymond, F. Guérin, E. Couvé, F. Kunst, P. Glaser, P. Trieu-Cuot, and C. Poyart.** 2006. Rapid detection of the ‘‘highly virulent’’ group B *Streptococcus* ST-17 clone. *Microbes and Infection*. **8**:1714-1722.
57. **Lancefield, R.C., and R. Hare.** 1935. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic *Streptococci* from parturient women. *Journal of Experimental Medicine*. **61**:335-349.
58. **Lauer, P., C. D. Rinaudo, M. Soriani, I. Margarit, D. Maione, R. Rosini, A. R. Taddei, M. Mora, R. Rappuoli, G. Grandi, and J. L. Telford.** 2005. Genome Analysis Reveals Pili in Group B *Streptococcus*. *Science*. **309**:105.

59. **Lin, F. C., A. Whiting, E. Adderson, S. Takahashi, D. M. Dunn, R. Weiss, P. H. Azimi, J. B. Philips III, L. E. Weisman, J. Regan, P. Clark, G. G. Rhoads, C. E. Frasc, J. Troendle, P. Moyer, and J. F. Bohnsack.** 2006. Phylogenetic Lineages of Invasive and Colonizing Strains of Serotype III Group B Streptococci from Neonates: a Multicenter Prospective Study. **44**:1257-1261.
60. **Lindahl, G., M. Stalhammar-Carlemalm, and T. Areschoug.** 2005. Surface Proteins of *Streptococcus agalactiae* and Related Proteins in Other Bacterial Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. **18**:102-127.
61. **Luan, S., M. Granlund, M. Sellin, T. Lagergård, B. G. Spratt, and M. Norgren.** 2005. Multilocus Sequence Typing of Swedish Invasive Group B *Streptococcus* Isolates Indicates a Neonatally Associated Genetic Lineage and Capsule Switching. **43**:3727-3733.
62. **Manning, S. D., E. S. Katherine, A. C. Springman, E. Lehotzky, M. A. Lewis, L. M. Ouellette, G. Wu,^{1,2} G. M. Moorer, T. S. Whittam, and H. D. Davies.** 2008. Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance in Group B *Streptococcus* Colonizing Young, Nonpregnant Women. *Clinical Infectious Diseases*. **47**:388-390.
63. **Manning, S. D., D. W. Lacher, H. D. Davies, B. Foxman, and T. S. Whittam.** 2005. DNA Polymorphism and Molecular Subtyping of the Capsular Gene Cluster of Group B *Streptococcus*. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**:6113-6116.
64. **Manning, S. D., K. Neighbors, P. A. Tallman, B. Gillespie, C. F. Marrs, S. M. Borchardt, C. J. Baker, M. D. Pearlman, and B. Foxman.** 2004. Prevalence of Group B *Streptococcus* Colonization and Potential for Transmission by Casual Contact in Healthy Young Men and Women. *Clinical Infectious Disease*. **39**:380-388.

65. **Martins, E. R., A. Andreu, P. Correia, T. Juncosa, J. Bosch, M. Ramirez, and J. Melo-Cristino.** 2011. Group B Streptococci Causing Neonatal Infections in Barcelona Are a Stable Clonal Population: 18-Year Surveillance. **49**:2911-2918.
66. **Martins, E.R., J. Melo-Cristino, and M. Ramirez.** 2010. Evidence for Rare Capsular Switching in *Streptococcus agalactiae*. Journal of Bacteriology. **192**:1361-1369.
67. **Martins, E. R., M. A. Pessanha, M. Ramirez, and J. Melo-Cristino.** 2007. Analysis of Group B Streptococcal Isolates from Infants and Pregnant Women in Portugal Revealing Two Lineages with Enhanced Invasiveness. Journal of Clinical Microbiology. **45**:3224-3229.
68. **Melin, P.** 2011. Neonatal group B *Streptococcal* disease: from pathogenesis to preventive strategies. Clinical Microbiology and Infection. **17**:1294-1303.
69. **Melles, D. C., W. B. van Leeuwen, S. V. Snijders, D. Horst-Kreft, J. K. Peeters, H. A. Verbrugh, and A. van Belkum.** 2007. Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*. Journal of Microbiological Methods. **69**:371-375.
70. **Nobbs, A.H., R. J. Lamont, and H. F. Jenkinson.** 2009. *Streptococcus* adherence and colonization. Microbiology and Molecular Biology Reviews. **3**:407-450.
71. **Palacios, G.C., E. K. Eskew, F. Solorzano, and S. J. Mattingly.** 1997. Decreased capacity for type-specific-antigen synthesis accounts for high prevalence of nontypeable strains of group B *Streptococci* in Mexico. Journal of Clinical Microbiology. **35**:2923-2926.

72. **Palmeiro, J. K., L. M. Dalla-Costa, S. E. L. Fracalanza, A. C. N. Botelho, K. S. Nogueira, M. C. Scheffer, R. S. L. A. Torres, N. S. Carvalho, L. L. Cogo, and H. M. F. Madeira.** 2010. Phenotypic and Genotypic Characterization of Group B Streptococcal Isolates in Southern Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**:4397-4403.
73. **Poyart, C., H. Réglie-Poupet, A. Tazi, A. Billoet, N. Dmytruk, P. Bidet, E. Bingen, J. Raymond, and P. Trieu-Cuot.** 2008. Invasive Group B Streptococcal Infections in Infants, France. *Emerging Infectious Diseases*. **14**:1647-1649.
74. **Quentin, R., H. Huet, F. S. Wang, P. Geslin, A. Goudeau, and R. K. Selander.** 1995. Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by multilocus enzyme genotype and serotype: identification of multiple virulent clone families that cause invasive neonatal disease. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**:2576-2581.
75. **Ramaswamy, S.V., P. Ferrieri, A. E. Flores, and L. C. Paoletti.** 2006. Molecular Characterization of Nontypable Group B *Streptococcus*. *Journal of Clinical Microbiology*. **44**:2398-2403.
76. **Ramaswamy, S.V., P. Ferrieri, L. C. Madoff, A. E. Flores, N. Kumar, H. Tettelin, and L. C. Paoletti.** 2006. Identification of a novel *cps* locus polymorphisms in nontypable group B *Streptococcus*. *Journal of Medical Microbiology*. **55**:775-783.
77. **Rato, M. G., R. Bexiga, S. F. Nunes, L. M. Cavaco, C. L. Vilela, and I. Santos-Sanches.** 2008. Molecular Epidemiology and Population Structure of Bovine *Streptococcus uberis*. *Journal of Dairy Science*. **91**:4542-4551.
78. **Richards, V. P., P. Lang, P. D. P. Bitar, T. Lefébure, Y. H. Schukken, R. N. Zadoks, and M. J. Stanhope.** 2011. Comparative genomics and the role of

lateral gene transfer in the evolution of bovine adapted *Streptococcus agalactiae*. Infect Genet Evol. **11**:1263-1275.

79. **Rodrigues, F.B.** 2009. Estudo da Colonização e Infecção por Estreptococos do Grupo B em Grávidas e Recém-nascidos do Distrito de Santarém. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
80. **Rosato, A., H. Vicarini, and R. Leclercq.** 1999. Inducible or constitutive expression of resistance in clinical isolates of *Streptococci* and *Enterococci* cross-resistant to erythromycin and lincomycin. Journal of Antimicrobial and Chemotherapy. **43**:559-562.
81. **Ruoff, K. L., R. A. Whiley, and D. Beighton.** 2003. *Streptococcus*, p.405-417. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (8 ed.), Manual of Clinical Microbiology, vol. 1. ASM Press, Washington, DC.
82. **Safadi, R., S. Amor, G. Héry-Arnaud, B. Spellerberg, P. Lanotte, L. Mereghetti, F. Gannier, R. Quentin, and A. Rosenau.** 2010. Enhanced expression of *lmb* gene encoding laminin-binding protein in *Streptococcus agalactiae* strains harboring IS1548 in *scpB-lmb* intergenic region. PLoS One. **5**: e10794.
83. **Saitou, N. and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. **4**:406-425.
84. **Schrag, S.J., S. Zywicki, M. M. Farley, A. L. Reingold, L. H. Harrison, L. B. Lefkowitz, J. L. Hadler, R. Danila, P. R. Cieslak, and A. Schuchat.** 2000. Group B *Streptococcal* Disease in The Era of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis. The New England Journal of Medicine. **342**:15-20.
85. **Schuchat, A.** 1998. Epidemiology of group B *Streptococcal* disease in the United States: shifting paradigms. Clinical Microbiology Reviews. **11**:497-513.

86. **Sellin, M., C. Olofsson, S. Hakansson, and M. Norgren.** 2000. Genotyping of the capsule gene cluster (*cps*) in nontypeable group B *Streptococci* reveals two major *cps* allelic variants of serotypes III and VII. *Journal Clinical of Microbiology.* **38**:3420-3428.
87. **Seppala, H., M. Skurnik, H. Soini, M. C. Roberts, and P. Huovinen.** 1998. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **42**:257-262.
88. **Shet, A. and P. Ferrieri.** 2004. Neonatal & maternal group B streptococcal infections: A comprehensive review. *Indian J Med Res.* **120**:141-150.
89. **Skoff, T. H., M. M. Farley, S. Petit, A. S. Craig, W. Schaffner, K. Gershman, L. H. Harrison, R. Lynfield, J. Mohle-Boetani, S. Zansky, B. A. Albanese, K. Stefonek, E. R. Zell, D. Jackson, T. Thompson, and S. J. Schrag.** 2009. Increasing Burden of Invasive Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults, 1990-2007. *Clinical Infectious Diseases.* **49**:85-92.
90. **Slotved, H.C., F. Kong, L. Lambertsen, S. Sauer, and G. L. Gilbert.** 2007. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. *Journal of Clinical Microbiology.* **45**:2929-2936.
91. **Spellerberg, B.** 2000. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes and Infection.* **2**:1733-1742.
92. **Sumby, P., K. D. Barbian, D. J. Gardner, A. R. Whitney, D. M. Welty, R. D. Long, J. R. Bailey, M. J. Parnell, N. P. Hoe, G. G. Adams, F. R. Deleo, and J. M. Musser.** 2005. Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **102**:1679-1684.

93. **Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei M., and S. Kumar.** 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. **28**:2731-2739.
94. **Tazi, A., O. Disson, S. Bellais, A. Bouaboud, N. Dmytruk, S. Dramsi, M. Mistou, H. Khun, C. Mechler, I. Tardieux, P. Trieu-Cuot, M. Lecuit, and C. Poyart.** 2010. The surface protein HvgA mediates group B *Streptococcus* hypervirulence and meningeal tropism in neonates. **207**:2313-2322.
95. **Tenover, F. C.** 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *American Journal of Medicine*. **119**:S3-S10.
96. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**:2233-2239.
97. **Tettelin, H., V. Massignani, M. J. Cieslewicz, C. Donati, D. Medini, N. L. Ward, S. V. Angiuoli, J. Crabtree, A. L. Jones, A. S. Durkin, R. T. DeBoy, T. M. Davidsen, M. Mora, M. Scarselli, I. M. Ros, J. D. Peterson, C. R. Hauser, J. P. Sundaram, W. C. Nelson, R. Madupu, L. M. Brinkac, R. J. Dodson, M. J. Rosovitz, S. A. Sullivan, S. C. Daugherty, D. H. Haft, J. Selengut, M. L. Gwinn, L. Zhou, N. Zafar, H. Khouri, D. Radune, G. Dimitrov, K. Watkins, K. J. B. O'Connor, S. Smith, T. R. Utterback, O. White, C. E. Rubens, G. Grandi, L. C. Madoff, D. L. Kasper, J. L. Telford, M. R. Wessels, R. Rappuoli, and C. M. Fraser.** 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial “pan-genome”. *PNAS*. **102**:13950-13955.
98. **Tettelin, H., V. Massignani, M. J. Cieslewicz, J. A. Eisen, S. Peterson, M. R. Wessels, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, I. Margarit, T. D. Read, L. C. Madoff, A. M. Wolf, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. DeBoy, A.**

- S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, M. R. Lewis, D. Radune, N. B. Fedorova, D. Scanlan, H. Khouri, S. Mulligan, H. A. Carty, R. T. Cline, S. E. Van Aken, J. Gill, M. Scarselli, M. Mora, E. T. Iacobini, C. Brettoni, G. Galli, M. Mariani, F. Vegni, D. Maione, D. Rinaudo, R. Rappuoli, J. L. Telford, D. L. Kasper, G. Grandi, and C. M. Fraser.** 2002. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. PNAS. **99**:12391-12396.
99. **Tien, N., C. Ho, H. Lin, M. Shih, M. Ho, H. Lin, H. Lin, C. Chang, and J. Lu.** 2011. Multilocus sequence typing of invasive group B *Streptococcus* in central area of Taiwan. **44**:430-434.
100. **Tomida, J., S. Sauer, Y. Morita, T. Ezaki, and Y. Kawamura.** 2011. *Streptococcus fryi* sp. nov., a novel species with Lancefield group M antigens. FEMS Microbiol Lett. **314**:95-100.
101. **Wehbeh, W., R. Rojas-Diaz, X. Li, N. Mariano, L. Grenner, S. Segal-Maurer, B. Tommasulo, K. Drlica, C. Urban, and J. J. Rahal.** 2005. Fluoroquinolone-Resistant *Streptococcus agalactiae*: Epidemiology and Mechanism of Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **49**:2495-2497.
102. **Weisblum, B.** 1995. Erythromycin Resistance by Ribosome Modification. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **39**:577-585.

Anexos

Anexo 1

Primers para amplificação e sequenciação de DNA utilizados no presente trabalho

Método	Locus	Primer	Sequência	Tamanho do amplificação (pb)	Referência
Genotipagem Capsular de <i>S.</i> <i>agalactiae</i>		cpsD-I (Forward)	GTTGTTGATGCCGCAATAATC		
	cpsD-F	cpsE-I^F	TCTTACGCTAAGTTTTCACG	1902 ou 1911	Florindo <i>et al.</i> , 2010
		cpsF-I (Reverse)	CTACAGCGGCACCAGATGATA		
Detecção dos genes de resistência aos macrólidos	mef(A)	Forward	AGTATCATTAATCACTAGTGC	346	Florindo <i>et al.</i> , 2010
		Reverse	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG		
	erm(A)	Forward	GAAGTTTAGCTTTCCTAA	395	
		Reverse	GCTTCAGCACCTGTCTTAATTGAT		
	erm(B)	Forward	GAAAAGGTA CTCAACCAAATA	639	
		Reverse	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC		
	adhP	Forward	GTTGGTCATGGTGAAGCACT	672	
		Reverse	ACTGTACCTCCAGCACGAAC		
	pheS	Forward	GATTAAGGAGTAGTGGCACG	723	
		Reverse	TTGAGATCGCCCATTGAAAT		
	atr	Forward	CGATTCTCTCAGCTTTGTTA	627	
		Reverse	AAGAAATCTCTTGTGCGGAT		
glnA	Forward	CCGGCTACAGATGAACAATT	589	Jones <i>et al.</i> , 2003	
	Reverse	CTGATAATTGCCATTCCACG			
sdhA	Forward	AGAGCAAGCTAATAGCCAAC	646		
	Reverse	ATATCAGCAGCAACAAGTGC			
glcK	Forward	CTCGGAGGAACGACCATTAA	607		
	Reverse	CTTGTAACAGTATCACCGTT			
tkt	Forward	CCAGGCTTTGATTTAGTTGA	859		
	Reverse	AATAGCTTGTGGCTTGAAA			

Primers para amplificação e sequenciação de DNA utilizados no presente trabalho (Cont.)

Método	Locus	Primer	Sequência	Tamanho do amplicão (pb)	Referência
Detecção do clone ST17 de <i>S. agalactiae</i>	<i>gbs2018</i>	ST-17S	ATACAAATTCTGCTGACTACCG	210	Lamy <i>et al.</i> , 2006
		ST-17AS	TTAAATCCTTCCTGACCATTCC		
Detecção dos MGE IS1548 e GBSII na região intergênica <i>scpB-lmb</i>	<i>scpB-lmb</i>	<i>scpB3382</i>	TTATGACCACTTCTTCTTGGA	400, 1600 ou 2200	Safadi <i>et al.</i> , 2010
		<i>rlmb51</i>	CTATCATTACTAAACTCACAAC		
Detecção das sequências de inserção <i>IS1381</i> , <i>IS861</i> e <i>ISSa4</i>	<i>IS1381</i>	Forward	GTAAAGCTTAGAAGATCTCCTCATGG	431	Dmitriev <i>et al.</i> , 2004
		Reverse	CCTTGATAACCACTGTCTGCCA		
	<i>IS861</i>	Forward	ATGACAGAGCTCGAGCGACTT	472	
		Reverse	TATCAGCCTTCTTACCAACCTCA		
	<i>ISSa4</i>	Forward	GAGAGTTAGTCCCAATGAGCCA	102	
		Reverse	TCCCTATACAGCTGATGGCAT		
Detecção dos genes da Família <i>Alpha-Like Protein</i>		<i>Universal (Forward)</i>	TGATACTTACAGACGAAACAACG	-	Creti <i>et al.</i> , 2004
		<i>Alpha-C (Reverse)</i>	TACATGTGGTAGTCCATCTTCACC	398	
		<i>Rib (Reverse)</i>	CATACTGAGCTTTTAAATCAGGTGA	295	
		<i>Epsilon (Reverse)</i>	CCAGATACATTTTACTAAAGCGG	200	
		<i>Alp2/ Alp3 (Reverse)</i>	CACTCGGATTACTATAATATTTAGCAC	334	
	<i>Alp 4 (Reverse)</i>	TTAATTTGCACCGGATTAACACCAC	110		

^aO *cpsE-I* apenas foi utilizado em sequenciação.