

Ana Beatriz de Almeida Corrêa

## **Diversidade genética e patogenicidade em *Streptococcus agalactiae***



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia)

Orientadores: Leslie C. Benchetrit e Sergio Eduardo L. Fracalanza



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES  
RIO DE JANEIRO

ABRIL DE 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Corrêa, Ana Beatriz de Almeida  
Diversidade genética e patogenicidade em *Streptococcus agalactiae*/Ana Beatriz de Almeida Corrêa – Rio de Janeiro, 2009  
XV, 169  
Tese [Doutorado em Ciências (Microbiologia)]  
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientadores: Leslie C. Benchetrit e Sergio Eduardo L. Fracalanza

Referências bibliográficas: f 109

1. *Streptococcus agalactiae* 2. Patogenicidade 3. Diversidade genética 4. Virulência 5. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos 6. Eletroforese em gel de campos alternados I. Leslie C. Benchetrit e Sergio Eduardo L. Fracalanza. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia). III. Diversidade genética e patogenicidade em *Streptococcus agalactiae*

Ana Beatriz de Almeida Corrêa

Patogenicidade e diversidade genética em *Streptococcus agalactiae*

Rio de Janeiro, 27 de abril de 2009.

---

Leslie C. Benchetrit, Ph.D., UFRJ

---

Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues, Ph.D., UFRJ

---

Leon Rabinovith, Ph.D., FIOCRUZ

---

Vânia Lúcia Carreira Merquior, Ph.D., UERJ

---

Marinela Silva Laport, Ph.D., UFRJ

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cocos Patogênicos, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação dos Professores Leslie C. Benchetrit e Sergio Eduardo L. Fracalanza.

*A Deus, Senhor da minha vida  
Ao Jaime, com quem sou um  
Aos meus pais, meu alicerce*

*Ao fim de uma etapa importante em minha vida, sinto-me feliz pela oportunidade de agradecer a vocês pela contribuição nesta conquista.*

✓ Ao meu Deus, sempre fiel no cumprimento dos sonhos que faz surgir em meu coração, me dando forças para lutar ou conquistando por mim o que minhas mãos não alcançam. *“Eu te amarei do coração, ó Senhor, fortaleza minha. O Senhor é o meu rochedo, e o meu lugar forte, e o meu libertador; o meu Deus, a minha fortaleza, em quem confio; o meu escudo, a força da minha salvação e o meu alto refúgio.”* Salmos, 18:1, 2

✓ A Solange e Luís Henrique, meus pais, Henrique, Alessandra e Ana Clara, meu irmão e família, pelo companheirismo em todos os momentos até aqui, fossem estes bons ou maus. Amo e sou grata a todos vocês!!! Ao Jaime, meu esposo: esta conquista é tão sua quanto minha! Nas entrelinhas de cada frase aqui redigida há o seu carinho, cumplicidade, paciência e amor, muito amor. Sempre...

✓ Ao professor Leslie C. Benchetrit, meu orientador desde o curso de graduação e que em muito contribuiu para a minha formação profissional. Obrigada! Ao professor Sergio Eduardo L. Fracalanza, que foi fundamental para a concretização desta Tese de Doutorado, contribuindo sempre com paciência, competência, dedicação e carinho.

✓ Ao Marco Antônio, o Marquinho, que foi essencial à Tese, seja por me livrar do convívio excessivo com os camundongos e ratos ou por me fazer rir, e muito! A Ivi Cristina, Marcos, Tatiana, Lígia, Natália e Helena: todos vocês em maior ou menor grau, palpitararam, trabalharam, se decepcionaram e se regozijaram para ou com os experimentos e seus resultados, por vezes estranhos... E todos vocês, além de ótimos profissionais, são pessoas especiais com quem tive o privilégio de conviver. Ah! E como nos divertimos neste laboratório...

✓ Ao professor Malouri Cabral: sem sua ajuda minha relação com os macrófagos ainda seria impossível. Ao professor José Nelson e a Ana Maria por igualmente tornarem viáveis meus

ensaios com a cultura de células pulmonares. Ao professor Walter Oelemann, que escreveu a versão em inglês do resumo da Tese. Ao professor Louis Barrucand, que realizou a análise estatística de grande parte dos resultados. Aos professores e demais alunos dos seus laboratórios por seu inestimável auxílio e/ou acolhida: Regina Domingues, Agnes Marie, Bernadete Teixeira, Marinella Laport, Marcia Giambiagi, Beatriz Meurer, Marco Antônio Miguel, Ana Paula Colombo. Um agradecimento especial à professora Marinella Laport, que realizou um árduo trabalho para revisar a Tese num tempo curtíssimo.

✓ Aos meus amigos da graduação, Renata, Tatiana, Tatyane, Alessandra, Maria Carolina, Karla, Luiz Fernando e Deyvison que um pouquinho distantes ou bem próximos têm torcido por mim. Faz dez anos que iniciamos nossa jornada na Microbiologia (embora alguns tenham desertado desta peleja...).

✓ Aos meus familiares e amigos, que mesmo sem ter contato com o meu universo acadêmico, foram constantes em seu carinhoso apoio.

✓ Aos funcionários do IMPPG por toda a colaboração.

✓ Às instituições de fomento à pesquisa CNPq, FAPERJ e CAPES pelo suporte financeiro.

✓ A espécie *Streptococcus agalactiae* que, com a exceção de algumas cepas rebeldes, se doou integralmente para a execução deste trabalho.

Ana Beatriz de Almeida Corrêa

Diversidade genética e patogenicidade em *Streptococcus agalactiae*

Orientadores: Leslie C. Benchetrit e Sergio Eduardo L. Fracalanza

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

A espécie *Streptococcus agalactiae* é frequentemente isolada de quadros de infecções em humanos e animais ou da microbiota destes indivíduos. Estudos prévios relataram o compartilhamento de um mesmo perfil eletroforético ou “sequence type”, definidos utilizando-se “PFGE” ou “MLST”, em amostras isoladas de humanos e bovinos, o que corrobora com a possível transmissão interespecíes. Os objetivos do presente estudo foram: caracterizar amostras de *S. agalactiae* de origem humana isoladas no estado do Rio de Janeiro em 2008 quanto à diversidade genética e à suscetibilidade aos antimicrobianos; avaliar e comparar o potencial patogênico de amostras de *S. agalactiae* de origens bovina e humana relacionadas geneticamente; e investigar a influência do ambiente *in vivo* na patogenicidade do *S. agalactiae*. As amostras apresentaram sensibilidade à penicilina, vancomicina e levofloxacina, enquanto a resistência à eritromicina e clindamicina foi elevada. Esses perfis de resistência podem comprometer a utilização destes antibióticos como drogas de segunda linha no tratamento de infecções em indivíduos alérgicos à penicilina. Uma grande heterogeneidade genética, determinada através de PFGE, foi observada entre as amostras, isoladas, em sua maioria, de portadores assintomáticos. Duas amostras humana e bovina (80427 e 87159, respectivamente) relacionadas geneticamente apresentaram resultados similares em relação à capacidade de adesão, invasão a células pulmonares (16 HBe), sobrevivência intracelular em macrófagos murinos e resistência à ação microbicida de sangue humano fresco. Em ensaios de sepse utilizando camundongos neonatos, quatro amostras de *S. agalactiae* crescidas *in vitro* apresentaram comportamentos diferentes. Além disso, o teste de sepse em camundongos adultos e análise do perfil proteico utilizando 2 amostras de *S. agalactiae*, previamente cultivadas *in vitro* ou *in vivo*, foi observada a influência do ambiente *in vivo* na patogenicidade de modo amostra-dependente. Diante destes dados, propomos que tal variável deveria ser considerada quando do desenho de protocolos para o estudo em modelos animais.

Palavras-chave: 1. *Streptococcus agalactiae* 2. Patogenicidade 3. Diversidade genética 4. Virulência 5. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos 6. Eletroforese em gel de campos alternados

Rio de Janeiro  
Abril de 2009

Ana Beatriz de Almeida Corrêa

Genetic diversity and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae*

Supervisors: Leslie C. Benchetrit e Sergio Eduardo L. Fracalanza

Abstract of the Doctoral thesis submitted to the Graduate Program in Sciences (Microbiology), Institute of Microbiology Prof. Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, as part of the obligatory requirements to obtain the title of Doctor of Sciences (Microbiology).

*Streptococcus agalactiae* is frequently isolated either from human or animal infections or from the normal microflora of these individuals. Previous studies reported that bovine and human isolates share the same electrophoretic profile or “sequence type” as assessed by PFGE and MLST techniques, hereby corroborating a possible interspecies transmission. The aims of the present study were: to characterize the genetic diversity and antimicrobial susceptibility of human *S. agalactiae* isolates obtained in 2008 in the state of Rio de Janeiro; to evaluate and compare the pathogenic potential of genetically related *S. agalactiae* isolates from cattle and humans; and to investigate the influence of the *in vivo* environment on the pathogenicity of *S. agalactiae*. Isolates were sensitive to penicillin, vancomycin and levofloxacin, but show elevated resistance to erythromycin and clindamicin. These resistance profiles can compromise the use of these antibiotics as second line drugs in the treatment of infection in patients allergic to penicillin. PFGE detected a significant genetic heterogeneity in strains predominantly isolated from asymptomatic carriers. Two genetically related human and bovine isolates (80427 and 87159, respectively) showed similar results in relation to adhesion capacity, invasion of pulmonary cells (16 HBe), intracellular survival in murine macrophages and resistance to the microbicidal effect of fresh human blood. In assays evaluating sepsis in neonate mice, four *S. agalactiae* isolates grown *in vitro* presented different behavior. Furthermore, the sepsis assay in adult mice and analysis of the protein profiles using two *S. agalactiae* isolates grown either *in vitro* or *in vivo*, indicated an isolate dependent influence of the *in vivo* environment on pathogenicity. Our results suggest that this latter variable should be considered during the elaboration of protocols for studies in the animal model.

Keywords: 1. *Streptococcus agalactiae* 2. pathogenicity 3. genetic diversity 4. virulence 5. antimicrobial susceptibility test 6. pulsed field gel electrophoresis

Rio de Janeiro  
April 2009

AAP	American Academy of Pediatrics; Academia Americana de Pediatria
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists; Colegiado Americano de Ginecologia e Obstetricia
ALP	Alpha like protein; Proteína alfa-like
ATCC	American type cell collection; Coleção Americana de culturas padrão
BIB A	group B <i>Streptococcus</i> immunogenic bacterial adhesin; adesina bacteriana imunogênica do GBS
BRIJ	Éter laurílico polioxietileno
°C	Graus Celsius
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen
CC	Complexo clonal
CD 89	Conjunto de diferenciação 89
CDC	Centers for Disease Control and Prevention; Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute; Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
CspA	Cell-surface-associated protein; proteína associada à superfície celular
DNA	Deoxyribonucleotide acid; ácido desoxorribonucléico
DO	Densidade óptica
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine, dipalmitoilfosfatidilcolina
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic acid; ácido etilendiaminotetracético
EPM	Erro padrão da media
FBS A	Fibrinogen binding protein A, proteína de ligação a fibrinogênio A
FBS B	Fibrinogen binding protein B, proteína de ligação a fibrinogênio B
g	Gramma
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor; fator estimulante de colônias de granulócitos macrófagos
hBMEC	human brain microvascular endothelial cells, células de endotélio microvascular cerebral humano
HeLa	“Henrietta Lacks” ; Células imortalizadas de câncer cervical humano
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1, molécula de adesão intercelular 1

IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-8	Interleucina 8
kDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
Lmb	Laminin, binding protein; proteína ligadora de laminina
<	Menor que
M	Molar
µg	Micrograma
ml	Mililitro
MLEE	Multilocus enzyme electrophoresis; Eletroforese de isoenzima
MLST	Multilocus sequence typing; tipagem de sequência multilocus
mPCR/RLB	Multiplex polymerase chain reaction-based reverse line blot; Reação multiplex da polymerase em cadeia baseada na hibridização reversa
%	Porcentagem
NaCl	Cloreto de sódio
pb	Par de base
PBP1A	Penicillin binding protein 1A; proteína ligadora de penicilina 1ª
PBS	Phosphate buffer solution; solução de tampão fosfato
PCR	Polymerase chain reaction; reação da polymerase em cadeia
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis; eletroforese em campos alternados
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso/volume
RAPD	Random amplified polymorphism; polimorfismo da amplificação randômica do DNA
REA	Restriction enzyme analysis by conventional electrophoresis; análise da restrição enzimática por eletroforese convencional
RNA	Ribonucleotide acid; ácido ribonucléico
SDS	Sodium dodecyl sulphate; dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis; eletroforese em gel de poliácridamida em presença de SDS
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i> I
ST	Sequence type; sequência tipo

STK	Serine/threonine kinase 1; serina/treonina quinase 1
STP	Serine/threonine phosphatase 1; serina/treonina fosfatase 1
TBE	Tris/bortao/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, n, n', n' - tetra-metilenodiamina
THB	Todd-Hewitt broth; caldo Todd-Hewitt
Tm	Melting point; temperatura de fusão
Tris	Hidroximetil-aminometano
UI	Unidades internacionais
UFC	Unidades formadoras de colônias
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean; agrupamento não ponderado com base em media aritmética
V	Volts
v/v	Volume/volume
16HBe	Human bronchial epithelial; linhagem celular de epitélio brônquico pulmonar humano

<b>Resumo</b>	<b>viii</b>
<b>Summary</b>	<b>ix</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Histórico	1
1.2. Classificação da espécie	2
1.3. <i>S. agalactiae</i> em humanos	3
1.3.1. Síndromes clínicas	3
1.3.2. Prevenção e tratamento	8
1.3.3. Susceptibilidade aos antimicrobianos	10
1.3.4. Distribuição dos tipos sorológicos	11
1.4. <i>S. agalactiae</i> em bovinos	13
1.4.1. Mastite	13
1.4.2. Prevenção e tratamento	14
1.4.3. Susceptibilidade aos antimicrobianos	15
1.4.4. Distribuição dos tipos sorológicos	16
1.5. Patogenicidade	16
1.5.1. Alguns fatores metabólicos com papel na virulência	17
1.5.2. Principais fatores clássicos de virulência	19
1.6. Relação entre amostras de <i>S. agalactiae</i> isolada de bovinos e humanos	33
1.7. Estudo da patogenicidade de <i>S. agalactiae</i> : ensaios in vivo como ferramenta	35
1.8. Análise da diversidade genética: ferramentas de estudo	36
<b>2. Objetivos</b>	<b>38</b>
<b>3. Material e Métodos</b>	<b>39</b>
3.1. Soluções e meios de cultivo	39
3.2. Objetivo 1. Caracterização de amostras de <i>S. agalactiae</i> de origem humana isoladas no estado do Rio de Janeiro em 2008 quanto à diversidade genética e à susceptibilidade aos antimicrobianos	41
3.2.1. Amostras bacterianas	41
3.2.2. Confirmação da identificação fenotípica	41
3.2.3. Análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	43
3.2.4. Análise da diversidade genética	44
3.3. Objetivo 2. Avaliação e comparação do potencial patogênico de amostras de <i>S. agalactiae</i> de origens bovina e humana	46
3.3.1. Amostras bacterianas	46
Tabela 1	46
3.3.2. Detecção de genes que codificam fatores associados à virulência	47
Tabela 2	48
3.3.3. Adesão e invasão à cultura de células 16HBe	50
3.3.4. Sobrevivência intracelular em macrófagos de murinos	51
3.3.5. Susceptibilidade à ação bactericida de sangue humano total fresco	53
3.3.6. Análise do perfil protéico total das amostras de <i>S. agalactiae</i>	55

3.3.7. Avaliação da patogenicidade bacteriana em modelo de sepse em animais	57
3.3.8. Análises estatísticas	57
3.4. Objetivo 3. Avaliação da influência do ambiente in vivo na patogenicidade de <i>S. agalactiae</i>	58
3.4.1. Amostras bacterianas	58
3.4.2. Crescimento in vivo	58
3.4.3. Crescimento in vitro	60
3.4.4. Susceptibilidade à ação bactericida de sangue humano total fresco	60
3.4.5. Análise do perfil total	61
3.4.6. Avaliação da patogenicidade bacteriana em modelo de sepse em animais	61
3.4.7. Análises estatísticas	62
3.5. Aprovação no comitê de ética	62
<b>4. Resultados</b>	<b>63</b>
4.1. Caracterização de amostras de <i>S. agalactiae</i> de origem humana isoladas no estado do Rio de Janeiro em 2008 quanto à diversidade genética e à susceptibilidade aos antimicrobianos	63
4.1.1. Amostras bacterianas	63
4.1.2. Confirmação da identificação fenotípica	63
4.1.3. Análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	63
4.1.4. Análise da diversidade genética	64
4.2. Avaliação e comparação do potencial patogênico de amostras de <i>S. agalactiae</i> de origens bovina e humana	65
4.2.1. Detecção de genes que codificam fatores associados à virulência	65
4.2.2. Adesão e invasão à cultura de células 16 HBe	65
4.2.3. Sobrevivência intracelular em macrófagos de murinos	66
4.2.4. Susceptibilidade à ação bactericida de sangue humano total fresco	67
4.2.5. Análise do perfil protéico total das amostras de <i>S. agalactiae</i>	68
4.2.6. Avaliação da patogenicidade bacteriana em modelo de sepse em animais	68
4.3. Avaliação da influência do ambiente in vivo na patogenicidade de <i>S. agalactiae</i>	70
4.3.1. Crescimento in vivo	70
4.3.2. Susceptibilidade à ação bactericida de sangue humano total fresco	70
4.3.3. Análise do perfil total	71
4.3.4. Avaliação da patogenicidade bacteriana em modelo de sepse em animais	71
Tabela 3	73
Figuras	77
<b>5. Discussão</b>	<b>92</b>
5.1. Caracterização de amostras de <i>S. agalactiae</i> de origem humana isoladas no estado do Rio de Janeiro em 2008 quanto à diversidade genética e à susceptibilidade aos antimicrobianos	92
5.2. Avaliação e comparação do potencial patogênico de amostras de <i>S. agalactiae</i> de origens bovina e humana	98
5.3. Avaliação da influência do ambiente in vivo na patogenicidade de <i>S. agalactiae</i>	103
<b>6. Conclusões</b>	<b>108</b>

**Referências bibliográficas** **109**

---

**Anexos** **103**

---

Artigo submetido à publicação na revista <i>Veterinary Microbiology</i>	143
Artigo aceito à publicação na revista <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>	159

## 1. Introdução

### 1.1. Histórico

A espécie *Streptococcus agalactiae*, inicialmente isolada de quadros de mastite bovina no final do século XIX, foi reconhecida como integrante da microbiota anfiabiótica de humanos na década de 1930 (LANCEFIELD, 1933, COLEBROOK & PURDIE, 1937 & FRY, 1938 *apud* ROSS, 1978). Neste período também foi isolada de sangue em um caso de endocardite puerperal e de outros três casos de infecções fatais, sendo assim, referida sua capacidade para causar infecções no ser humano.

Anos mais tarde, na década de 1960, foi observada uma nítida relação entre o microrganismo e quadros graves em neonatos (MCCRACKEN, 1973). Logo após, *S. agalactiae* e *Escherichia coli* foram reconhecidos como os principais agentes de infecções neonatais, assinalando, desta forma, a importância crescente do microrganismo em quadros clínicos em humanos. Nos anos 70, as infecções causadas por *S. agalactiae* em neonatos eram fatais em 20 a 50% dos casos (FRANCIOSI, KNOSTMAN & ZIMMERMAN, 1973; FREEDMAN, INGRAM & GROSS, 1981). Seu reconhecimento imediato e a utilização precoce de terapia antimicrobiana foram, provavelmente, os responsáveis pelo decaimento nos índices de mortalidade nos casos de síndrome precoce (infecção de neonatos num curto período após o parto) observado ao longo dos anos, de 55% na década de 1970 para cerca de 15% e 5% nas décadas seguintes (OPAL *et al.*, 1988; CDC, 1997). Atualmente, a espécie é mais comumente associada a infecções em humanos e bovinos, mas foi também isolada de outros animais, como peixes e golfinhos (EVANS *et al.*, 2008).

## 1.2. Classificação da espécie

Os membros beta-hemolíticos do gênero *Streptococcus* foram classificados em grupos sorológicos designados de A a H e K a V por Lancefield (1933) num sistema que tem como base a composição antigênica do polissacarídeo de parede celular, denominado carboidrato C. São exceções os grupos D e N, nos quais o antígeno de parede celular detectado é o ácido lipoteicóico. Assim, a espécie *S. agalactiae* foi classificada como grupo B de Lancefield e o seu carboidrato C é composto por ramnose, N-acetilgalactosamina e galactose (CURTIS & KRAUSE, 1964).

Em adição, as cepas do grupo B podem ser classificadas em tipos sorológicos, de acordo com a composição antigênica do polissacarídeo capsular, também referido como polissacarídeo tipo específico (LANCEFELD, 1934). Originalmente, três tipos sorológicos, designados I, II e III, foram reconhecidos. Tais tipos foram ampliados para quatro (Ia, Ib, II e III) em 1938 e, posteriormente, para cinco (Ia, Ib, Ic, II e III) em 1971 (WILKINSON, 1978). Atualmente, são descritos nove sorotipos, Ia, Ib, II a VIII (PAOLETTI, BRADFORD & PAOLETTI, 1999; TSOLIA *et al.*, 2003) além do recentemente proposto sorotipo IX (SLOTVED *et al.*, 2007). Antígenos protéicos presentes na superfície celular são acessoriamente utilizados para a tipagem das cepas, como as proteínas alfa, beta, Alp 2 e 3, Rib e R1 a R4 (CHATELLIER *et al.*, 1996; LACHENAUER *et al.*, 1999; ROLLAND *et al.*, 1999; KONG *et al.*, 2002; MOYO, MAELAND & BERGH, 2002).

Apesar de amplamente empregada em estudos epidemiológicos, a sorotipagem não permite a detecção de diversidade ou relação genética entre cepas pertencentes a um mesmo sorotipo, fazendo-se necessário um sistema de tipagem mais discriminatório (FASOLA, LIVDAHL & FERRIERI, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Assim, métodos de tipagem mais recentes baseiam-se na análise do DNA bacteriano. Estes incluem ribotipagem, RAPD

(“random amplified polymorphism”), PFGE (“pulsed-field gel electrophoresis”) e, mais recentemente, MLST (“multi locus sequence typing”) (DUARTE *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006; BROCHET *et al.*, 2006).

### **1.3. *S. agalactiae* em humanos**

#### **1.3.1. Síndromes clínicas**

##### **A. Síndrome precoce**

De 15% a 35% das gestantes são colonizadas por *S. agalactiae* na vagina e/ou no reto e, embora a transmissão da mãe para a criança ocorra entre 35% e 73% dos casos, a síndrome precoce se desenvolve em apenas 1 ou 2% dos neonatos colonizados (BENCHETRIT *et al.*, 1982; SCHUCHAT, 1998; SPELLERBERG, 2000; ZALEZNIK *et al.*, 2000; AL-SWEIH *et al.*, 2005). A síndrome precoce ocorre em neonatos com até uma semana de vida, entretanto na maior parte dos casos os sintomas surgem nas primeiras 6 - 8 horas após o parto (DORAN & NIZET, 2004). As principais manifestações são septicemia, pneumonia e meningite (WEISNER *et al.*, 2004).

Alguns casos decorrem da infecção durante o parto, quando o fluido amniótico é contaminado pelo microrganismo presente na vagina ou cérvix (DORAN & NIZET, 2004; LINDAHL, STALHAMMAR-CARLEMAIL & ARESCHOUG, 2005). Entretanto, a maior parte dos casos possivelmente ocorre a partir do espalhamento ascendente do microrganismo do trato vaginal, através de membranas placentárias rompidas ou intactas, para o fluido amniótico, que é aspirado pelo feto e resulta na colonização do seu trato respiratório durante a vida intrauterina. Após a entrada pelo trato respiratório, a infecção pode se manifestar como pneumonia e o microrganismo pode alcançar a corrente sanguínea, com decorrente

desenvolvimento de septicemia, e então pode atingir diversos tecidos, resultando em manifestações como meningite, mais frequentemente, e osteomielite. Os neonatos que sobrevivem à meningite podem apresentar seqüelas neurológicas, incluindo retardo mental e perda de visão ou audição (SCHUCHAT, 1998).

Estudos recentes relataram incidência de 0,5 – 0,6 casos de síndrome precoce/ 1000 nascidos vivos na Finlândia, Reino Unido, Irlanda e Países Baixos (LYYTIKÄINEN *et al.*, 2003; HEATH *et al.*, 2004 & WEISNER *et al.*, 2004). Nos Estados Unidos a incidência é de 0,3 casos/1.000 nascidos vivos com mortalidade de 7% (BALTIMORE, 2007). Heath e colaboradores (2004), num estudo realizado com cepas de *S. agalactiae* isoladas no Reino Unido e Irlanda, descreveram que 11% dos neonatos evoluíram a óbito e a incidência de 4 casos/1.000 nascidos vivos dentre os bebês com baixo peso (<1.500g). Além do baixo peso no nascimento, parto prematuro, colonização materna densa e baixo nível de anticorpos anti-capsulares maternos são fatores de risco para o desenvolvimento da síndrome (SCHUCHAT, 1998).

#### B. Síndrome tardia

A síndrome tardia acomete crianças com idade entre uma semana e três meses de vida, sendo sua patogênese pouco compreendida (SCHRAG *et al.*, 2000). As crianças com síndrome tardia, em relação àquelas com síndrome precoce, em geral, apresentam menos frequentemente doença severa no momento do diagnóstico e incidências menores de morte e desenvolvimento de sequelas neurológicas. As manifestações mais comuns incluem septicemia sem envolvimento do pulmão e alta incidência de meningite (cerca de 50%) e pneumonia (DAHL, TESSIN & TROLLFORS, 2003; DORAN & NIZET, 2004; WEISNER *et al.*, 2004).

Origens materna e não materna, como fontes nosocomiais, são possíveis para a

síndrome tardia (FRANCIOSI, KNOSTMAN & ZIMMERMAN, 1973). Em 50% dos casos o microrganismo coloniza também as mães, e a sua aquisição pelo bebê pode ocorrer durante a passagem através do canal vaginal no momento do parto ou por contato com garganta ou mamilos maternos colonizados (ANTHONY, OKADA & HOBEL, 1979; BAKER *et al.*, 1973; DILLON, KHARE & GRAY, 1987; KOTIW *et al.*, 2003). Kotiw e colaboradores (2003) descreveram um modelo teórico para a patogênese da síndrome tardia envolvendo a transmissão via leite materno, empregando-se técnicas de biologia molecular. Neste modelo, o microrganismo é transmitido da orofaringe colonizada do bebê durante o parto ou de outras fontes para os ductos mamários maternos durante a amamentação e após a multiplicação neste local o bebê é infectado durante a lactação, sendo a mastite materna clínica ou não. De acordo com o modelo, a alta concentração bacteriana no leite materno seria um fator de risco para a patogênese da síndrome tardia.

Estudos recentes relataram incidência de 0,2 casos de síndrome tardia /1.000 nascidos vivos na Finlândia, Reino Unido, Países Baixos e Irlanda (LYYTIKÄINEN *et al.*, 2003; HEATH *et al.*, 2004 & WEISNER *et al.*, 2004). Heath e colaboradores (2004) descreveram mortalidade de 8% dentre os casos de síndrome tardia causada por *S. agalactiae* e não verificaram variação significativa na sua incidência ao se comparar Reino Unido e Irlanda (0,17 – 0,26/1.000 nascidos vivos). Esta variação foi verificada para os casos de síndrome precoce (0,21 – 0,73/1.000 nascidos vivos), o que foi associado a utilização de profilaxia antimicrobiana em algumas regiões. Estes dados sugerem a não influência desta profilaxia no estabelecimento da síndrome tardia, o que fôra previamente descrito por Schrag e colaboradores (2000). Nos Estados Unidos a incidência é de 0,3 casos/1.000 nascidos vivos (BALTIMORE, 2007).

### C. Síndromes em gestantes

Cerca de 10% a 35% das gestantes são colonizadas por *S. agalactiae* na vagina e/ou no reto, e as doenças clínicas nessa população podem variar de infecções no trato urinário e amniotite a seps e meningite (SCHRAG *et al.*, 2000; MOTLOVÁ *et al.*, 2004; AL-SWEIH *et al.*, 2005). Bacteremia, corioamniotite e endometrite são descritas como as principais manifestações clínicas e cerca de 30% dos casos clínicos resultam em aborto espontâneo ou parto de natimorto ou de crianças que evoluem a óbito em decorrência da infecção (SCHRAG *et al.*, 2000; TYRRELL *et al.*, 2000). Borger (2005) detectou a colonização em 19% das gestantes atendidas numa maternidade do Rio de Janeiro entre os anos de 2003 e 2004. Simões e colaboradores (2007) detectaram a colonização em 14% das gestantes atendidas numa maternidade em Campinas.

Hansen e colaboradores (2004) realizaram um monitoramento de gestantes e seus neonatos na Dinamarca e verificaram que 38% das gestantes apresentaram ao menos uma coleta vaginal e retal positiva para *S. agalactiae* ao longo da gestação, sendo esta taxa independente do período gestacional. Não houve alteração neste índice no período de um ano após o parto. Quase 50% dos neonatos nascidos de mães definidas como carreadoras persistentes (apresentaram três coletas intercaladas positivas por doze semanas) se tornaram colonizados durante o parto ao passo que apenas um neonato nascido de mãe carreadora transiente (apenas uma coleta positiva) se tornou colonizado. A análise por PFGE demonstrou que 86% das gestantes foram colonizadas por um único clone, enquanto as demais o foram por dois clones. Além disso, não foi observada modificação do clone carregado pelas gestantes ao longo dos vinte e um meses de estudo. Excetuando-se um bebê, os neonatos colonizados apresentaram o mesmo clone materno (HANSEN *et al.*, 2004).

#### D. Síndromes em adultos não gestantes

Num estudo realizado na Espanha entre 1993 e 2000 foi demonstrado que 92% dos adultos não gestantes com quadros clínicos associados a *S. agalactiae* eram portadores de doenças crônicas pré-existentes, sendo *diabetes mellitus* a mais freqüente (BLANCAS *et al.*, 2004). Estes pacientes possuíam idade média de 61 anos e as infecções de pele e tecidos moles foram as mais comuns, sendo a celulite a manifestação clínica mais freqüente, seguidas pelas infecções em ossos e articulações, dentre as quais a osteomielite foi a mais freqüente. Neste estudo foi observada uma taxa de mortalidade de 6%. Em cerca de 30% das 150 infecções foi verificada a presença de *S. agalactiae* e outros microrganismos, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Outros autores também associaram doenças crônicas, principalmente *diabetes mellitus*, à infecção por *S. agalactiae* (TYRRELL *et al.*, 2000 e PERSSON *et al.*, 2004).

Persson e colaboradores (2004) verificaram a incidência de 2,1 quadros invasivos (nos quais o microrganismo é isolado de espécime clínico originalmente estéril) associados a *S. agalactiae*/100.000 adultos não gestantes em um estudo realizado na Suécia entre 1998 e 2001. Num estudo realizado em 1996 no Canadá, foi verificada a incidência de 4,1 quadros invasivos associados a *S. agalactiae*/100.000 adultos não gestantes e uma taxa de mortalidade de 5,5% (TYRRELL *et al.*, 2000). Foi verificado, ainda, que a incidência aumentou de 5,9/100.000 entre os pacientes com idade entre 50 e 64 anos para 11,9/100.000 entre os pacientes com 65 anos ou mais. Segundo os autores, esse aumento da incidência provavelmente ocorre devido ao aumento de doenças de base no segundo grupo, o que predispõe o indivíduo à doença invasiva por *S. agalactiae*.

Portanto, embora doenças invasivas associadas a *S. agalactiae* possam ocorrer em adultos não gestantes saudáveis, a maior parte destas ocorre naqueles acometidos por doenças de base (TYRRELL *et al.*, 2000; FARLEY, 2001; BLANCAS *et al.*, 2004). O aumento dos

casos clínicos nesta população observado na última década pode ser atribuído, em parte, à expansão da expectativa de vida de adultos com doenças crônicas (FARLEY, 2001).

### **1.3.2. Prevenção e tratamento**

A profilaxia antimicrobiana foi proposta na década de 1990 pelo “American College of Obstetricians and Gynecologists” (ACOG) em associação com o CDC (“Centers for Disease Control and Prevention”), que à época padronizou um protocolo baseado em fatores de risco para o desenvolvimento de síndrome precoce, e pelo “American Academy of Pediatrics” (AAP), que recomendou um protocolo com base na cultura vaginal (CDC, 2002).

Em 2002, o CDC padronizou o protocolo, vigente até o momento, que preconiza a cultura de “swab” vaginal e retal de todas as gestantes entre a 35<sup>a</sup> e 37<sup>a</sup> semana gestacional (CDC, 2002; BALTIMORE, 2007). Assim, bacteriúria por *S. agalactiae* ou parto anterior de neonato acometido por doença invasiva causada por *S. agalactiae*, cultura positiva para *S. agalactiae* (no caso de parto vaginal), ausência de cultura somada a febre durante o parto, parto com menos de 37 semanas gestacionais ou ruptura de membrana por período superior a 18 horas são condições que suscitam a aplicação da profilaxia com antibiótico. A cesariana em gestante sem ruptura de membranas e trabalho de parto, independente da cultura bacteriana, assim como a cultura vaginal e retal negativas, são as condições em que a profilaxia antimicrobiana não deve ser adotada (CDC, 2002; BALTIMORE, 2007).

A profilaxia é realizada administrando-se o antibiótico no momento do parto (CDC, 2002). A penicilina é a droga de escolha, embora a ampicilina seja aceitável. Às pacientes alérgicas aos beta-lactâmicos sem risco de desenvolvimento de reação imediata de hipersensibilidade deve ser administrada cefazolina, enquanto para aquelas com risco conhecido, o teste de susceptibilidade à eritromicina e clindamicina é recomendado a fim de

avaliar sua possível administração. Se houver resistência a ambos os antimicrobianos, a vancomicina é recomendada.

Foi recentemente descrito que a profilaxia antimicrobiana é utilizada em 25% a 30% das gestantes nos Estados Unidos (SCHRAG *et al.*, 2006). Desde a sua implementação na década de 1990 nos Estados Unidos, houve uma queda de mais de 70% na incidência de síndrome precoce, mas não houve impacto na incidência de síndrome tardia (BALTIMORE, 2007). A penicilina é utilizada para o tratamento das infecções, sendo a vancomicina preconizada para pacientes hipersensíveis (BRAUNWALD *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de uma vacina poderia minimizar a necessidade de quimioprofilaxia além de proporcionar proteção para gestantes, adultos não gestantes e prevenir parto de natimorto, abortos espontâneos, quadros de síndrome tardia, e outras manifestações da infecção por *S. agalactiae* em grupos populacionais não alcançados pela estratégia de prevenção preconizada pelo CDC (SCHRAG *et al.*, 2000; FARLEY, 2001).

O polissacarídeo capsular purificado foi inicialmente utilizado para o desenvolvimento de uma vacina; entretanto, apenas 60% dos indivíduos vacinados desenvolveram níveis de imunoglobulina IgG significativos (JOHRI *et al.*, 2006). A utilização deste componente requer a sua associação com um adjuvante, como o toxóide tetânico, e a formulação de uma vacina multivalente, o que é dificultado pela diferente distribuição dos sorotipos entre as diferentes regiões geográficas (BAKER & EDWARDS, 2003, JOHRI *et al.*, 2006). Antígenos como proteínas alfa e beta, C5a peptidase, proteína ligadora de penicilina e Rib foram propostos como candidatos à formulação de uma vacina protéica (BAKER & EDWARDS, 2003, JOHRI *et al.*, 2006).

### 1.3.3. Susceptibilidade aos antimicrobianos

É frequente a análise do perfil de susceptibilidade de cepas de *S. agalactiae* aos antimicrobianos. No Brasil, Benchetrit e colaboradores (1982) descreveram resistência à eritromicina em cerca de 2% das cepas testadas, isoladas no Rio de Janeiro. Posteriormente, Oliveira e colaboradores (2005), num estudo com cepas isoladas no período de 1978 a 2003, relataram a resistência à tetraciclina variando de 67% a 92%, de acordo com o sorotipo analisado, e à eritromicina e clindamicina (15% e 5%, respectivamente) dentre as cepas do sorotipo III, além da susceptibilidade à penicilina, cloranfenicol, vancomicina e rifampicina.

Os resultados observados no Brasil são condizentes com dados da literatura científica, demonstrando, em conjunto, a sensibilidade à penicilina, a alta resistência à tetraciclina e a resistência variável à eritromicina e clindamicina. Estes dois últimos antimicrobianos são frequentemente empregados como alternativa para o tratamento e quimioprofilaxia em pacientes alérgicos a beta-lactâmicos (CDC, 2002).

Nos Estados Unidos, Silverman, Morgan e Nichols (2000) relataram a susceptibilidade à cefazolina, cloranfenicol e vancomicina e resistência à clindamicina e eritromicina (8% e 10%, respectivamente) entre as cepas obtidas de gestantes assintomáticas. Foi descrita a susceptibilidade à ampicilina, penicilina e vancomicina e resistência à eritromicina e clindamicina (4% e 7%, respectivamente) entre as cepas isoladas de casos clínicos no Canadá (TYRRELL *et al.*, 2000).

Um estudo envolvendo cepas clínicas obtidas de diversas regiões na França resultou na detecção de resistência à clindamicina e eritromicina (18% e 21%, respectivamente), além da alta taxa de resistência à tetraciclina (88%) e susceptibilidade à penicilina, amoxicilina e rifampicina (DE MOUY *et al.*, 2001). Schoening, Wagner e Arvand (2005) relataram a sensibilidade à penicilina, vancomicina e cefotaxima entre as cepas isoladas de gestantes e

neonatos assintomáticos e de quadros invasivos na Alemanha. A resistência à eritromicina e clindamicina foi evidenciada em 11% e 4%, respectivamente.

#### **1.3.4. Distribuição dos tipos sorológicos**

Os primeiros relatos acerca da epidemiologia de *S. agalactiae* no Brasil datam da década de 1980, e foram realizados com cepas isoladas de mulheres não gestantes, parturientes e neonatos assintomáticos (BENCHETRIT *et al.*, 1982; SMÂNIA, 1986). No estado do Rio de Janeiro foi verificada a predominância do sorotipo II (24,4%), sendo o sorotipo III observado em 19% dos casos. No estado de Santa Catarina, foi relatada a predominância dos sorotipos III (36%) e II (28%) (SMÂNIA, 1986). Os dados obtidos foram condizentes com estudos prévios, realizados nos Estados Unidos (BAKER & BARRETT, 1974).

Em 1977, Wilkinson descreveu cepas de *S. agalactiae* não tipáveis com os anti-soros disponíveis, que foram posteriormente designados como pertencentes ao sorotipo V (JELINKOVÁ & MOTLOVA, 1985). No Brasil, menos de 3% das cepas isoladas de mulheres não gestantes, parturientes e seus neonatos foram classificados neste sorotipo, resultados condizentes com relatos de outros países no período correspondente (BENCHETRIT *et al.*, 1982; ELLIOTT, FARMER & FACKLAM, 1998). Na Coreia do Sul o tipo V foi o terceiro sorotipo mais isolado (19%) de casos clínicos em 1997, tendo sido o primeiro relato do seu isolamento apenas dois anos antes (UH *et al.*, 2001).

Desde a última década observou-se uma distribuição mais balanceada entre os sorotipos Ia, III e V, que se alternam na predominância tanto entre os episódios de síndrome precoce e tardia quanto em casos em adultos gestantes e não gestantes, ao menos nos Estados Unidos, Canadá, Argentina, Taiwan, República Tcheca, Inglaterra e Países Baixos, Alemanha,

Itália e Portugal (BLUMBERG *et al.*, 1996; TYRRELL *et al.*, 2000; ZALEZNIK *et al.*, 2000; KO *et al.*, 2001; LOPARDO *et al.*, 2003; MOTLOVÁ *et al.*, 2004; WEISNER *et al.*, 2004; FLUEGGE *et al.*, 2005; GHERARDI *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2007; SAVOIA *et al.*, 2008). Em estudos realizados na Itália e em Portugal, o sorotipo II foi, juntamente com os sorotipos Ia, III e V, predominante (GHERARDI *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2007). Os sorotipos IV e VI a VIII são raramente isolados de infecções nestes locais.

Embora pouco frequentes em outros países, Lachenauer e colaboradores (1999) relataram a predominância dos sorotipos VI e VIII (25% e 36%, respectivamente) em estudos com gestantes assintomáticas no Japão. Relatos prévios descreveram resultados similares e, ainda, que em 9% e 11% dos casos de síndrome precoce foram isolados os sorotipos VIII e VI, respectivamente, sendo ressaltada a emergência destes sorotipos a partir do isolamento inicial na década de 1980 e durante a década seguinte (HOSHINA *et al.*, 1994 *apud* LACHENAUER *et al.*, 1999).

Discrepâncias, entretanto, podem ocorrer. Corrêa (2002) descreveu a predominância dos sorotipos Ia, III e V em cepas isoladas de adultos sintomáticos e assintomáticos em 2001 e 2002 no Rio de Janeiro. Simões e colaboradores (2007) descreveram a predominância dos sorotipos Ia, Ib e II nas cepas isoladas de gestantes em 2003 e 2004 em Campinas, São Paulo. Além disso, entre 3% e 15% das cepas permanece não tipável utilizando-se a técnica convencional (PAOLETTI, BRADFORD & PAOLETTI, 1999; TYRREL *et al.*, 2000; ZALEZNIK *et al.*, 2000).

Desde meados da década de 2000 foi descrita a tipagem molecular, na qual é empregada a técnica mPCR/RLB (“multiplex polymerase chain reaction – based reverse line blot”) é empregada para a determinação do tipo capsular (KONG, MA & GILBERT, 2005). Zhao e colaboradores (2008) descreveram a concordância entre os dados obtidos por esta técnica e a sorotipagem convencional para 99% das mais de 600 cepas testadas. A PCR

simples ou multiplex para detecção dos genes de cápsula também é empregada com a mesma finalidade (GERHARDI *et al.*, 2007).

#### **1.4. *S. agalactiae* em bovinos**

##### **1.4.1. Mastite**

A espécie *S. agalactiae* é um parasita da glândula mamária bovina e pode sobreviver nela por longos períodos de tempo, sendo altamente contagioso (KEEFE, 1997). A mastite permanece como um dos mais importantes problemas econômicos na indústria do gado leiteiro em todo o mundo e a qualidade do leite e a prevalência de mastite clínica e subclínica são os principais fatores na determinação da lucratividade de uma fazenda de gado leiteiro (KEEFE, 1997; BRADLEY, 2002). A mastite bovina pode ser classificada como subclínica ou clínica de acordo com os sinais apresentados (PHILPOT & NICKERSON, 1991). A mastite subclínica consiste na infecção da glândula mamária sem alterações visíveis no órgão e no leite. Na mastite clínica anormalidades na glândula mamária, com ou sem a presença de secreção, são observadas. Há um início repentino de intumescimento, aumento da temperatura, enrijecimento e sensibilidade nos tetos afetados. O leite apresenta uma aparência anormal e o rendimento é reduzido bruscamente (EBERHARD *et al.*, 1987; KEEFE, 1997; GRUET *et al.*, 2001).

A transmissão do *S. agalactiae* ocorre pelo contato entre vacas ou através do contato com leite e utensílios, como os utilizados por ordenhadores ou máquinas operadoras, contaminados (KEEFE, 1997). O microrganismo penetra através do canal do úbere, atinge a cisterna glandular por contiguidade de líquidos e infecta, primariamente, o sistema de canais da porção inferior da teta. A partir de então, pode ocorrer disseminação e dano tecidual em

toda a glândula. O tubo infectado sofre intumescimento devido ao processo inflamatório e eventualmente este processo pode evoluir para a obstrução do canal, bloqueando a drenagem dos tecidos produtores de leite. O leite acumula nesta região, resultando em involução, cicatrização e redução da produção leiteira (KEEFE, 1997).

Se o tratamento for administrado em período adequado, e se houver estímulo da glândula seguido do seu esvaziamento completo durante a ordenha, as obstruções são removidas e a área afetada é restaurada (KEEFE, 1997; GRUET *et al.*, 2001). Se a infecção persistir, a mastite por *S. agalactiae* pode se tornar uma infecção crônica, com períodos ocasionais de intensificação. O acúmulo de resíduos bacterianos intensifica a resposta inflamatória e resulta na perda do tecido produtor de leite, reduzindo, desta forma, a quantidade de leite produzido. *S. agalactiae* raramente causa doença grave, mas a fibrose extensa nos tecidos pode resultar em lactações subseqüentes não produtivas. A contínua infecção na mucosa durante uma ou várias lactações provoca atrofia progressiva do epitélio secretor (EBERHARD *et al.*, 1987; KEEFE, 1997; GRUET *et al.*, 2001).

No leite, especificamente, o grau das alterações ocasionadas pela infecção depende da sua gravidade e duração (KEEFE, 1997). Estas podem incluir um aumento de células somáticas (células de descamação do epitélio secretor e leucócitos), mudanças nos tipos de proteínas presentes, como redução da quantidade de caseína e aumento na quantidade de proteínas séricas, alteração na quantidade de íons, mudança de pH e nas quantidades de lipídios. Estas alterações afetam diretamente a qualidade e o rendimento do leite e seus subprodutos (KEEFE, 1997).

#### **1.4.2. Prevenção e tratamento**

Considerando as perdas econômicas causadas pelas mastites clínica e subclínica,

foram desenvolvidos em diversos países programas nacionais e regionais de controle da doença, nos quais o foco é a utilização de métodos para a prevenção e terapia em todo o rebanho, em vez de tratar casos individuais, o que abrange tanto as infecções clínicas como as subclínicas (KEEFE, 1997). Esses programas têm como base o aprimoramento da prática da ordenha, a limpeza das tetas e a terapia antimicrobiana intramamária utilizando soluções comerciais contendo um ou mais antibióticos, dentre os quais se destacam as penicilinas e seus derivados, as cefalosporinas e as tetraciclinas (BASEGGIO *et al.*, 1997).

Em Israel, a ocorrência de *S. agalactiae* no gado foi reduzida de 28% para menos de 2% nos primeiros cinco anos do programa (BAR-MOSHE *et al.*, 1987). Na Dinamarca houve um decréscimo de 13% em 20 anos (AGGER *et al.*, 1994) e nos Estados Unidos, durante o ano de 1992, foram observados índices de cura da doença maiores do que 90% devido à implementação do programa de controle (KEEFE, 1997).

Getahun e colaboradores (2008) recentemente realizaram um estudo na Etiópia com mais de 500 vacas e descreveram que em 30% dos quadros de mastite clínica foi isolado *S. agalactiae*. Em porcentagem semelhante dentre estes quadros foi isolado *Streptococcus dysgalactiae*. Dos quadros de mastite subclínica, 42,6% foram associados à *Staphylococcus aureus*, 22,1% a *Staphylococcus epidermidis*, 12,8% a *S. agalactiae* e 10,3% a *Streptococcus uberis*.

### **1.4.3. Susceptibilidade aos antimicrobianos**

Segundo Duarte *et al.* (2004), no Brasil foi verificado 100% de resistência à gentamicina e a resistência à tetraciclina e eritromicina foi detectada em 44,7% e 10,5% das cepas isoladas de quadros de mastite bovina, respectivamente. Em estudos realizados por Dogan *et al.* (2005), entre as cepas isoladas nos Estados Unidos foi verificado resistência à

gentamicina, tetraciclina e eritromicina (91,6%, 14,5% e 3,6%, respectivamente). Para cepas isoladas na Argentina foram relatados índices de resistência à eritromicina e à clindamicina de 10,7% e 25,5%, respectivamente (DENAMIÉL *et al.*, 2005).

#### **1.4.4. Distribuição dos tipos sorológicos**

Entre as cepas de origem bovina, o sorotipo III é um dos mais isolados no Quênia, Canadá, Brasil e Estados Unidos (MOSABI, ARIMI & KANG'ETHE, 1997; DAIGNAULT *et al.*, 2003; DUARTE *et al.*, 2004; DOGAN *et al.*, 2005). Na Alemanha e Eslováquia predominaram os tipos Ia, III e IV (BOPP & LÄMMLER, 1995; MERL *et al.*, 2003; SHAKLEINA *et al.*, 2004), enquanto na Indonésia e Inglaterra o sorotipo II foi predominante (ESTUNINGSIH *et al.*, 2002; BISHARAT *et al.*, 2004). Os sorotipos VI, VII e VIII são raramente detectados nas cepas de *S. agalactiae* isoladas de bovinos, entretanto, a predominância do sorotipo VII foi descrita entre as cepas isoladas na Turquia (EKIN & GURTURK, 2006).

Martinez e colaboradores (2000) relataram que 62% das 297 cepas isoladas de leite bovino entre 1996 e 1997 em diferentes regiões de Quebec, Canadá não foram passíveis de tipagem com os soros específicos para os tipos Ia, Ib, II a V. Os sorotipos III e II foram predominantes, sendo detectados em 28% e 7% das cepas, respectivamente. É comum um alto número de cepas de *S. agalactiae* bovinas não tipáveis (MARTINEZ *et al.*, 2000; BISHARAT *et al.*, 2004).

### **1.5. Patogenicidade**

Dentre as infecções causadas por *S. agalactiae* em humanos, a patogênese da infecção

neonatal é a mais estudada, dada a sua importância. A colonização do trato vaginal materno ocorre em duas etapas: inicialmente ocorre uma interação de baixa afinidade entre o ácido lipoteicóico e a mucosa vaginal e, subsequentemente, interação de maior afinidade entre proteínas de superfície bacterianas e componentes da matriz extracelular, que por sua vez interagem com células do hospedeiro (DORAN & NIZET, 2004). Enquanto estes mecanismos de ligação permitem ao microrganismo competir com a microflora por um nicho no trato vaginal, a sua habilidade em transpor barreiras celulares do hospedeiro é a primeira característica que distingue a sua patogenicidade.

### **1.5.1. Alguns fatores metabólicos com papel na virulência**

#### **A. Respiração aeróbica**

Yamamoto e colaboradores (2005) evidenciaram a existência em *S. agalactiae* de uma via metabólica que provavelmente ocorre *in vivo*, mas até o momento não havia sido detectada em ensaios envolvendo cultivo bacteriano em meios de cultura. Os autores descreveram a capacidade de o microrganismo realizar respiração aeróbica na presença de metaquinona, requerida para a transferência de elétrons, e hemina, um cofator da citocromo oxidase, obtidos do meio ambiente. Segundo os autores, o microrganismo não é capaz de sintetizar estes dois fatores e permanece restrito à realização da fermentação em meios de cultivo nos quais os dois componentes não são adicionados.

Utilizando modelo de sepse neonatal em ratos, foi demonstrada a atenuação da virulência em mutantes *cydA* negativas (incapazes de realizar a respiração aeróbica) em comparação com a cepa selvagem, sendo, portanto, o sangue do animal como fonte de metaquinona e hemina suficiente para a ativação da cadeia respiratória (YAMAMOTO *et al*, 2005). Este evento possivelmente ocorreria no sangue humano, onde a concentração das

substâncias requerida é semelhante àquela observada no sangue de rato. Sendo uma bactéria invasiva, *S. agalactiae* poderia se beneficiar da respiração, que é energeticamente favorável, para sua disseminação, uma vez que o alto nível de persistência durante a bacteremia facilitaria o conseqüente espalhamento nos órgãos do hospedeiro (YAMAMOTO *et al.*, 2005).

#### B. Serina treonina quinase e serina treonina fosfatase

Rajagopal e colaboradores (2003) identificaram e caracterizaram as enzimas serina/treonina quinase (STK 1; “serine/threonine kinase 1”) e serina/treonina fosfatase (STP 1; “serine/threonine phosphatase 1”), que são cotranscritas e codificadas, respectivamente, pelos genes *stk1* e *stp1*. Foi verificado que estas enzimas regulam processos metabólicos fundamentais que afetam o crescimento, a segregação celular e a virulência bacteriana: as mutações *stk1- / stp1-* e *stk1-* resultam na extensão da fase *lag*, na formação de cadeias com 50 a 100 células, enquanto a cepa selvagem as formam com 5 a 8 células. Para as cepas mutantes em relação à cepa selvagem, houve a atenuação da virulência, sendo observada a dose letal de 25 a 100 vezes maior. STK 1 é constitutivamente expressa pela cepa selvagem independentemente do meio de cultivo utilizado (rico ou mínimo; RAJAGOPAL *et al.*, 2005).

#### C. Proteína ligadora de penicilina 1A

A proteína ligadora de penicilina 1A (PBP 1A; penicillin binding protein 1A) é codificada pelo gene *ponA* e consiste de uma proteína bifuncional com atividade de transpeptidase e glicosiltransferase requerida para a polimerização da camada de peptidoglicano (JONES *et al.*, 2000). Em comparação com a cepa selvagem, a cepa mutante com deleção do gene para síntese de PBP1A, *ponA*, é menos virulenta em modelo animal, o que foi correlacionado com a maior susceptibilidade a peptídeos catiônicos antimicrobianos (defensinas e catelicidinas) produzidos por células epiteliais e neutrófilos humanos (JONES *et al.*, 2003; HAMILTON *et al.*, 2006). A susceptibilidade aumentada a peptídeos catiônicos

também foi verificada em ensaios utilizando lavado brônquio-alveolar de ratos adultos (JONES *et al.*, 2003).

### 1.5.2. Principais fatores clássicos de virulência

#### A. Polissacarídeo capsular

A cápsula polissacarídica, o principal fator de virulência de *S. agalactiae*, é codificada pelo operon *cps* e nos sorotipos Ia, Ib, II – V e VII é composta por glicose, galactose, N-acetilglicosamina e ácido N-acetilneuramínico; nos sorotipos VI e VIII não há N-acetilglicosamina e o sorotipo VIII contém ramnose (CHAFFIN *et al.*, 2000). Os sorotipos individuais são originados a partir da síntese de unidades repetidas de precursores oligossacarídicos de cápsula e/ou de diferenças no modo como estas unidades são polimerizadas (CHAFFIN *et al.*, 2005).

Os *loci cps* em cada sorotipo são organizados do mesmo modo, com genes da região 5' envolvidos na regulação e comprimento da cadeia, uma região central contendo os genes para estrutura da unidade repetitiva e para a polimerização e uma região 3' que codifica a enzima da síntese de ácido siálico. Apesar da heterogeneidade na região central, todos os sorotipos sintetizam unidades repetidas com cadeias laterais de ácido N-acetilneuramínico associado à galactose (CHAFFIN *et al.*, 2005).

Ácido siálico é um termo genérico utilizado para indicar uma família de carboidratos ácidos contendo nove carbonos que se associa à extremidades de moléculas de glicoconjugados de superfície celular (SEVERI, HOOD & THOMAS, 2007). O ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) é o ácido siálico mais abundante. Considerando que sialoglicoconjugados são as moléculas predominantes na superfície de muitas células de mamíferos e associadas ao reconhecimento “self/non-self”, a incorporação de ácido siálico a

sua superfície é uma estratégia, referida como mimetismo molecular, utilizada pelo *S. agalactiae* para escapar da resposta imune do hospedeiro (CHAFFIN *et al.*, 2005; SEVERI, HOOD & THOMAS, 2007). As moléculas de ácido siálico atuam especificamente inibindo a deposição do componente C3 do sistema complemento, o que, por sua vez, previne a ativação da via alternativa. Em última instância, a opsonofagocitose por neutrófilos é inibida (MARQUES *et al.*, 1992; HERBERT, BEVERIDGE & SAUNDERS, 2004).

Adicionalmente, a cápsula oculta proteínas da superfície celular bacteriana, o que também auxilia o escape da resposta imune (HERBERT, BEVERIDGE & SAUNDERS, 2004). A habilidade do microrganismo em aderir e invadir as células do hospedeiro é inversamente proporcional à expressão de polissacarídeo capsular; logo, há equilíbrio entre a necessidade de aderir versus a capacidade de evadir da resposta imune, conferida pela cápsula (HERBERT, BEVERIDGE & SAUNDERS, 2004).

Dados obtidos, empregando MLST, demonstraram que cepas de sorotipos distintos apresentam o mesmo ST (“sequence type”), ao passo que cepas do mesmo sorotipo por vezes apresentam STs distintos e não relacionados entre si, de modo a serem alocados em complexos clonais (CCs) distintos (DAVIES *et al.*, 2004; LUAN *et al.*, 2005; VON BOTH *et al.*, 2008). Estes dados apontam para a possibilidade de “switching” de cápsula entre as cepas de *S. agalactiae* a partir da transferência horizontal de genes. É possível que mudanças no *locus* capsular possivelmente dirigidas pela resposta imune do hospedeiro ocorram e as novas combinações genótipo-sorotipo podem se perder ou podem persistir na população e diversificar se uma vantagem adaptativa for adquirida (DAVIES *et al.*, 2004; LUAN *et al.*, 2005; VON BOTH *et al.*, 2008).

## B. Ácido lipoteicóico

Cepas clínicas de *S. agalactiae* isoladas de bebês com doença invasiva, tanto de

quadros de síndrome precoce quanto de síndrome tardia, possuem maiores quantidades de ácido lipoteicóico associado à célula do que cepas isoladas de superfícies mucosas de carreadores assintomáticos (NEALON & MATTINGLY, 1983). Adicionalmente, a presença de polímeros longos de ácido lipoteicóico (30 a 35 unidades de glicofosfato) foi detectada entre cepas isoladas de quadros invasivos, ao passo que as cepas de carreadores assintomáticos apresentaram polímeros menores (10 a 15 unidades de glicofosfato) (NEALON & MATTINGLY, 1985). Estes dados sugerem a importância do polímero para a patogenicidade de *S. agalactiae*.

O ácido lipoteicóico é um polímero de polifosfoglicerol, cujos resíduos de glicerolfosfato são substituídos por um éster D-alanil, e é ancorado à membrana celular por interação hidrofóbica da sua âncora glicolípídica (POYART *et al.*, 2003; DORAN *et al.*, 2005). O polímero é altamente carregado por grupos fosfato ionizados e a esterificação por D-alanil reduz a carga negativa. A incorporação deste resíduo é importante para a virulência de *S. agalactiae*, segundo resultados obtidos em ensaios de fagocitose por macrófagos e neutrófilos, sepse em modelo animal e de susceptibilidade a peptídeos catiônicos antimicrobianos (POYART *et al.*, 2001; 2003). Ácido lipoteicóico é referido por Ginsburg (2002) como uma adesina ampifílica.

O ácido lipoteicóico é associado às interações de baixa afinidade entre *S. agalactiae* e células epiteliais vaginais (DORAN & NIZET, 2004). Segundo Doran e colaboradores (2005), a sua ancoragem à membrana celular em *S. agalactiae* é essencial para a invasão de células imortalizadas de endotélio microvascular cerebral humanas (hBMEC) e para a patogênese da meningite. De acordo com a revisão de dados de Ginsburg (2002), quando o polímero é liberado em locais infectados e inflamados, pode estar envolvido na patogênese da sepse neonatal causada pelo microrganismo. Nesta situação, o ácido lipoteicóico estaria, provavelmente, agindo como uma adesina que facilitaria a colonização e a invasão bacteriana

a tecidos profundos e como estimulador do “burst” respiratório e exocitose de enzimas lisossomais.

#### C. Fator “CAMP”

O fator “CAMP” (CHRISTIE, ATKINS e MUNCH-PETERSEN, 1944) é codificado pelo gene *cfb* e, embora esteja presente em quase todas as cepas isoladas de doença invasiva, algumas destas não secretam a proteína final (HERBERT, BEVERIDGE & SAUNDERS, 2004). Sua secreção, portanto, não é um requerimento absoluto para o desenvolvimento de doença invasiva. Lang & Palmer (2003) caracterizaram o fator “CAMP” como uma proteína formadora de poros, possuindo a sua ação duas fases: a ligação à membrana e a formação de poros após oligomerização.

Hensler e colaboradores (2008) não verificaram diferenças entre a cepa selvagem e a mutante *cfb*-negativa na sua capacidade de sobrevivência à ação bactericida de sangue total humano e à ação bactericida de macrófagos de murinos, bem como em modelo de sepse em camundongos. Assim sendo, embora classicamente referido como um fator de virulência de *S. agalactiae*, seu papel na patogênese permanece não elucidado. Os autores especulam, entretanto, que a conservação do fator “CAMP” na espécie *S. agalactiae* e em outras espécies, como em *Streptococcus pyogenes*, implica em benefício evolutivo conferido pela toxina no contexto geral da ecologia da bactéria (HENSLER *et al.*, 2008).

#### D. Beta-hemolisina

A beta-hemolisina é uma citolisina formadora de poros diferente do fator CAMP, não imunogênica, oxigênio-estável codificada pelo gene *cylE* (NIZET, 2002). Até o momento a toxina não foi purificada (HENSLER, MIYAMOTO & NIZET, 2008). Nizet e colaboradores (1996) relataram que a hemolisina danifica o epitélio pulmonar em modelo animal e que sua

atividade é reduzida por concentrações fisiológicas de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC; “dipalmitoylphosphatidylcholine”), o principal componente do surfactante humano. De acordo com os autores, bebês prematuros deficientes em DPPC seriam incapazes de inibir a ação da hemolisina, o que poderia contribuir para o aumento da incidência e severidade da pneumonia e sepse neste grupo. Recentemente, Hensler e colaboradores (2005) utilizando um modelo de infecção de coelhos neonatos via intratraqueal demonstraram que a hemolisina contribui para a proliferação de *S. agalactiae* no tecido pulmonar, promove a penetração das barreiras epitelial e pulmonar e produz alta letalidade (39%). A contagem de células bacterianas foi cem vezes menor no tecido pulmonar e na corrente sanguínea nos coelhos infectados com a cepa mutante em relação aos coelhos infectados com a cepa selvagem.

*S. agalactiae* promove a infiltração de leucócitos no fluido cérebro espinhal, o que é um marcador clínico e diagnóstico reconhecido da meningite bacteriana aguda. Doran, Liu e Nizet (2003), que utilizaram cultura de hBMEC (células imortalizadas de endotélio microvascular cerebral humanas) em seus ensaios, associaram à beta-hemolisina o aumento na transcrição de citocinas como IL-8, ICAM-1 e GM-CSF, que atuam na resposta inflamatória de neutrófilos. Segundo os autores, estas citocinas atuam, respectivamente, na migração de neutrófilos através do endotélio cerebral e na estimulação de “burst” oxidativo e na degranulação destes. Em estudos empregando modelos de infecção em animais, a expressão da beta-hemolisina foi associada à alta mortalidade, ao aumento no grau de dano às articulações e na secreção de citocinas pró-inflamatórias local e sistêmica, além de ser associada com necrose no fígado e apoptose de hepatócitos (PULITI *et al.*, 2000; RING *et al.*, 2002). Recentemente, Hensler, Miyamoto & Nizet (2008) associaram à toxina a perda de função e morte de cardiomiócitos, embora permaneça desconhecido o papel disto na hipotensão sistêmica que ocorre em quadros de síndrome precoce severa e que, em conjunto com outros sinais, pode resultar em falência múltipla de órgãos. Em conclusão, os estudos

supracitados sugerem ser a beta-hemolisina um fator de virulência que contribui no estabelecimento de doença por citotoxicidade e ativação inflamatória.

#### E. Pigmento carotenóide

Muitas cepas de *S. agalactiae* expressam um pigmento carotenóide que confere as colônias uma cor alaranjada (SPELLERBERG *et al.*, 2000). Utilizando espectrofotometria foi verificado que o pigmento apresenta três picos em comprimentos de onda característicos de beta-caroteno e pigmentos relacionados (LIU *et al.*, 2004). Os fenótipos de síntese de hemolisina e produção do pigmento carotenóide são interligados, de forma que cepas hiper-hemolíticas são também hiperpigmentadas e cepas não hemolíticas não são pigmentadas (SPELLERBERG *et al.*, 2000). O gene *cylE* é requerido para a sua síntese, uma vez que mutantes *cylE*-negativos deixam de ser hemolíticos e pigmentados, fenótipo que é restabelecido com a restauração do gene via plasmídeo (SPELLERBERG *et al.*, 2000).

Liu e colaboradores (2004) avaliaram o papel do pigmento carotenóide na proteção contra hipoclorito, peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, produtos gerados no “burst” oxidativo de macrófagos e neutrófilos. Foram realizados ensaios livres de células eucariotas e na presença de DPPC, um inibidor da ação citotóxica da enzima, o que, segundo os autores, exclui a atuação da beta-hemolisina. Também foram realizados ensaios de sobrevivência de *S. agalactiae* em macrófagos murinos e neutrófilos humanos comparando a cepa selvagem com a mutante isogênica *cylE*-negativa. Liu e colaboradores (2004) associaram a resistência a atividade bactericida dos fagócitos por via oxidativa à presença do pigmento e especularam que o seu efeito antioxidante seria suficiente para prevenir a morte bacteriana por fagócitos com um “burst” oxidativo subótimo, característica observada em neonatos prematuros ou sépticos, gestantes e diabéticos, que são os principais grupos de risco para infecções invasivas causadas por *S. agalactiae*.

Os efeitos antioxidantes do pigmento de *S. agalactiae* poderiam compensar a ausência da catalase e explicar, em parte, a inesperada persistência do microrganismo dentro do fagolisossomo de macrófagos e, ainda, o seu alto nível de resistência à ação microbicida do peróxido de hidrogênio (LIU *et al.*, 2004).

#### F. Superóxido dismutase

A espécie *S. agalactiae* sintetiza a enzima superóxido dismutase A (Sod A), codificada pelo gene *sodA*, que converte o ânion superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (POYART *et al.*, 2001). Superóxido dismutases são metaloenzimas, que são classificadas de acordo com os metais que requerem como cofatores. A SodA requer manganês como cofator. Seu papel na virulência foi evidenciado quando ensaios mostraram que o mutante *sodA* negativo era mais susceptível à ação microbicida de macrófagos murinos e menos apto à sobrevivência em modelo animal, uma vez que o mutante tornara-se avirulento em comparação com a cepa selvagem. A enzima promove, juntamente com o pigmento carotenóide, a resistência à ação microbicida de fagócitos, atuando especificamente na detoxificação de reativos de oxigênio, como peróxido de hidrogênio e ânion superóxido (POYART *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2004).

#### G. Proteína ligadora de laminina

A proteína ligadora de laminina (Lmb; “laminin binding protein”) é uma lipoproteína localizada na superfície celular bacteriana, codificada pelo gene *lmb* e que possui homologia com membros da família Lra 1 de proteínas, que tem sido associada a adesão e transporte de metais em Gram-positivos (SPELLERBERG *et al.*, 1999). O gene *lmb* está, juntamente com o gene *scpB*, que codifica a enzima C5a peptidase, localizado num transposon (FRANKEN *et al.*, 2001). O transposon está presente em cepas de origem humana, tanto de quadros

infecciosos quanto de portadores assintomáticos, mas não obrigatoriamente presente em cepas de origem animal (FRANKEN *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2001; CORRÊA, 2005; DMITRIEV *et al.*, 2001; 2004). A mesma observação foi realizada em cepas de estreptococos beta hemolíticos dos grupos A (obrigatoriamente isoladas de humanos), C e G. Os dados acima descritos apontam para uma forte correlação entre a habilidade de cepas estreptocócicas colonizarem ou infectarem hospedeiros humanos e a presença dos genes (*lmb* e *scpB*).

Spellerberg e colaboradores (1999) verificaram que cepas *lmb* negativas apresentaram redução de 75% na aderência à laminina placentária imobilizada. De acordo com os autores, a aderência de *S. agalactiae* à laminina pode ser uma etapa crucial para o desenvolvimento da infecção. O dano causado ao epitélio pulmonar pelo microrganismo, um processo que expõe estruturas da membrana basal, incluindo a laminina, possibilitaria a ligação da proteína ligadora de laminina e tornaria possível a translocação para a corrente sanguínea, assim como, o acesso do microrganismo ao fluido cérebro-espinhal, facilitando o estabelecimento de processos infecciosos.

Tenembaum e colaboradores (2007) descreveram que mutantes com deleção do transposon que contém *lmb* e *scpB* ou com inserções em *lmb* apresentaram a mesma redução (cerca de 65%) na invasão a hBMEC quando comparadas a cepa selvagem. Além do seu papel na adesão celular, os estudos apresentados sugerem ser a Lmb uma invasina.

#### H. C5a peptidase

C5a peptidase é uma serina protease codificada pelo gene *scpB*, expressa na superfície celular, imunogênica e com alta especificidade por substrato, que atua clivando o sítio de ligação a polimorfonucleares da fração C5a de humanos, de forma que a molécula permanece com a propriedade de associação com a bactéria mas perde a propriedade de quimiotaxia para neutrófilos (HERBERT, BEVERIDGE & SAUNDERS, 2004).

Em um estudo foi avaliada a prevalência da atividade da peptidase num conjunto de cepas de *S. agalactiae* isoladas de quadros clínicos em humanos e os autores verificaram que cerca de 20% das cepas perderam a atividade enzimática (BONSACK *et al.*, 2000). Análises moleculares revelaram que o gene *scpB* destas cepas continha uma deleção que impedia a atividade enzimática. Mesmo sem atividade, o gene foi conservado nas cepas. Genes homólogos foram detectados em cepas de estreptococos beta-hemolíticos dos grupos A, C e G (FRANKEN *et al.*, 2001). Estes dados apontam para a existência de outra função para C5a peptidase na patogênese de *S. agalactiae* além da clivagem de C5.

Beckmann e colaboradores (2002) demonstraram a capacidade da protease em se associar à fibronectina imobilizada, uma glicoproteína presente na matriz extracelular, mas não à fibronectina solúvel. Esta última agiria como uma opsonina. Dados de Hull, Tamura & Castner (2008) sugeriram que a enzima reconheceria um sítio gerado pela justaposição de regiões amino-terminais de múltiplas moléculas de fibronectina; sítio que não existe em monômeros da molécula solúvel.

Cheng e colaboradores (2002) verificaram que a capacidade de aderência em células epiteliais de pulmão permanece em mutantes *scpB* negativas ou na presença de anticorpos anti-C5a peptidase, o que sugere não ser a proteína uma adesina essencial. Entretanto, a capacidade de invasão a estas células é reduzida em mutantes *scpB* negativas ou na presença de anticorpos anti-C5a peptidase, o que sugere ser a C5a peptidase uma das potenciais invasinas essenciais para a colonização de *S. agalactiae* ao epitélio pulmonar.

## I. Hialuronidase

A enzima hialuronidase ou hialuronato liase é codificada pelo gene *hylB*, é secretada no meio extracelular e é capaz de degradar ácido hialurônico e sulfato de condroitina (LI & JEDRZEJAS, 2001). O ácido hialurônico está presente em fluido sinovial, tecido umbilical,

fluido amniótico, plasma, cartilagem articular, pele, dentes, urina e tecido nervoso de humanos e a degradação enzimática desta glicosaminoglicana rompe a barreira física do tecido conjuntivo e desta forma pode propiciar a invasão e espalhamento do patógeno e seus fatores de virulência. Entretanto, a enzima não é absolutamente requerida para a invasão, uma vez que cepas nas quais o gene *hylB* foi inativado pela introdução do elemento de inserção IS1548 foram isoladas de infecções invasivas causadas por *S. agalactiae* (ROLLAND *et al.*, 1999).

#### J. Proteína alfa

Dentre os tipos sorológicos descritos por Lancefield (1934), os tipos Ia e Ib frequentemente apresentavam reatividade cruzada, então associada à presença de um antígeno protéico, designado como Ibc ou Ic e mais tarde referido apenas como proteína C (WILKINSON & EAGON, 1971; BEVANGER & IVERSEN, 1981). Este seria constituído por dois determinantes antigênicos, ambos imunogênicos, alfa e beta, que posteriormente se verificou serem fenotipicamente distintos, geneticamente não relacionados e expressos independentemente (LI *et al.*, 1997).

A proteína alfa, codificada pelo gene *bca*, é o protótipo de uma família de proteínas estreptocócicas caracterizada pela presença de um domínio amino-terminal conservado, longos elementos repetidos em tandem e domínio carboxi-terminal conservado (WASTFELT *et al.*, 1997; LACHENAUER *et al.*, 2000). Nesta família estão incluídas, além da proteína alfa, as proteínas Rib e Alp 1 a 4 (WASTFELT *et al.*, 1996; LACHENAUER *et al.*, 2000).

A presença de unidades repetidas é associada à variabilidade genética e fenotípica por originar locais de rearranjo gênico, promovendo diversidade antigênica e a variação no peso molecular da proteína final, verificada entre cepas clínicas (MICHEL *et al.*, 1992; MADOFF *et al.*, 1996; GRAVEKAMP, ROSNER & MADOFF, 1998). Gravekamp, Rosner & Madoff

(1998) descreveram que cepas de *S. agalactiae* isoladas de neonatos humanos sofreram deleções na região de repetições quando comparadas com as cepas isoladas de suas mães. Os mesmos autores relataram que a variabilidade genética alterou a estrutura antigênica da proteína final, o que resultou em aumento na patogenicidade modelo animal previamente imunizado com a cepa original (sem deleções na proteína alfa).

Embora os dados apresentados apontem para vantagem seletiva na presença de anticorpos específicos ao permitir a evasão da resposta imune do hospedeiro, a maioria das cepas clínicas apresenta proteína com nove ou dez repetições, o que sugere a existência de condições que selecionem o alto número de repetições; sendo possível que tal característica seja requerida para uma ótima interação com células eucarióticas (GRAVEKAMP, ROSNER & MADOFF, 1998; LACHENAUER *et al.*, 2000).

A deleção do gene *bca* atenuou a virulência de *S. agalactiae* em modelo de sepse em camundongos neonatos (LI *et al.*, 1997). Adicionalmente, a perda da expressão da proteína alfa foi associada à redução na invasão de células epiteliais cervicais (ME180) (BOLDUC *et al.*, 2002). Em conjunto, os dados sugerem que a proteína alfa e os demais membros possuem papel na patogênese bacteriana, possivelmente atuando como invasina, e possuem um sítio de variação antigênica, que promove escape da resposta imune do hospedeiro.

#### K. Proteína beta

A proteína beta, também referida como Bac ou proteína ligadora de IgA, é codificada pelo gene *bac* encontra-se localizada na superfície da célula bacteriana (BERNER *et al.*, 2002; JARVA *et al.*, 2003). Diferentemente da proteína alfa, a beta não contém repetições longas, mas a região carboxi-terminal possui uma sequência rica em prolina, também referida como região XPZ, em alusão aos três resíduos que se repetem periodicamente, arranjados em tandem, e que apresentam um acentuado polimorfismo genético que resulta em alteração no

número de unidades repetitivas (HEDÉN, FRITZH & LINDAHL, 1991; BERNER *et al.*, 2002).

Areschoug e colaboradores (2002) observaram que, embora esteja exposta na superfície bacteriana, a região XPZ não é necessária para a expressão da proteína beta na superfície celular e/ou na sua ancoragem à parede celular. Previamente fôra verificado que todas as variantes do gene *bac* de 80 cepas estudadas continham esta região (BERNER *et al.*, 2002). A sua exposição na superfície celular e o conhecimento prévio de que regiões ricas em prolina comumente participam de interações proteína-proteína sugerem que a região XPZ possa promover interações com proteínas do hospedeiro ou com outras proteínas presentes em superfícies bacterianas (WILLIAMSON, 1994; ARESCHOUG *et al.*, 2002).

Além da região XPZ, a região carboxi-terminal possui o sítio de ligação ao fator H, presente no soro, de uma forma que este permanece ativo (ARESCHOUG *et al.*, 2002 a). O fator H inibe a ligação do fator B ao C3b na superfície celular, o que geraria a C3 convertase necessária para a cascata de ativação do sistema complemento; acelera o decaimento do complexo C3bBb já formado; e age como cofator para a clivagem de C3b mediada pelo fator I (JARVA *et al.*, 2003).

A região amino-terminal possui um sítio de ligação à IgA sérica, mas não à IgA secretória, presente em mucosas (JARVA *et al.*, 2003). A proteína se liga à IgA via porção FC, no seu sítio de reconhecimento pelo receptor CD 89, por sua vez presente na superfície de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (PLEASS *et al.*, 2001). A interação IgA-CD89 resulta na ativação de mecanismos de erradicação do microrganismo como fagocitose, “burst” oxidativo e secreção de enzimas e mediadores inflamatórios. A ligação de IgA à superfície bacteriana poderia resultar no bloqueio para deposição de outros anticorpos opsonizantes e complemento, na inibição da fagocitose e outros mecanismos de defesa do hospedeiro e no mascaramento de outros antígenos (MICHEL *et al.*, 1991; MADOFF *et al.*, 1994). A proteína

Bac atuaria, portanto, na evasão da resposta imune do hospedeiro.

#### L. Proteínas ligadoras de fibrinogênio

O gene *fbSA* codifica a proteína FbsA (“fibrinogen binding protein A”), presente na superfície bacteriana e capaz de se associar com a mesma afinidade ao fibrinogênio humano, uma glicoproteína que compõe a matriz extracelular dos tecidos epitelial e endotelial, solúvel ou imobilizado (SCHUBERT *et al.*, 2002). A sua deleção resulta na supressão da associação com fibrinogênio. Um dos seus domínios é composto por unidades repetitivas onde estão localizados sítios de ligação ao fibrinogênio que constituem a base para a heterogeneidade de FbsA. Mesmo a proteína bacteriana com apenas uma repetição retém a capacidade de ligação ao fibrinogênio (SCHUBERT *et al.*, 2002).

Schubert e colaboradores (2004) descreveram que cepas dos sorotipos Ia, II, III e V apresentaram capacidade de aderência às células epiteliais de pulmão (A549) proporcional à sua capacidade de ligação ao fibrinogênio e que a deleção de *fbSA* nestas cepas resultou em perda de ligação ao fibrinogênio. Jonsson e colaboradores (2005) descreveram que mutantes *fbSA* apresentaram atenuação da virulência em modelo de sepse e de artrite em camundongos.

Pietrocola e colaboradores (2004) verificaram que FbsA induziu a agregação de plaquetas dependente de fibrinogênio, o que em *S. agalactiae*, aparentemente, seria dependente de FbsA, uma vez que mutantes *fbSA*-negativos não apresentaram tal agregação. Pierno e colaboradores (2006) descreveram que FbsA induz a formação de uma camada de fibrinogênio na superfície celular bacteriana que foi associada à diminuição da fagocitose por macrófagos humanos (J111) da cepa selvagem pré-incubada com fibrinogênio em comparação com a mutante *fbSA*-negativa submetida previamente ao mesmo tratamento. A inibição da fagocitose não foi detectada, entretanto, quando as duas cepas, selvagem e mutante, não foram previamente incubadas com fibrinogênio.

A proteína de superfície FbsB (“fibrinogen binding protein B”) é codificada pelo gene *fbsB* e, diferentemente de FbsA, possui um sítio de interação com fibrinogênio localizado em sua porção amino-terminal, sem a presença de unidades repetitivas, mas também interage com fibrinogênio imobilizado ou solúvel (GUTEKNUST *et al.*, 2004). A deleção de *fbsB* não resultou em alteração na aderência de *S. agalactiae* às células epiteliais pulmonares nem ao fibrinogênio; entretanto resultou em redução de 70% na sua invasão à cultura de células anteriormente citada. Em relação à sequência de aminoácidos, estas duas proteínas também não apresentam similaridades significativas e FbsA pode estar covalentemente associada à parede celular, via motivo de ancoragem, ou pode ser secretada no meio extracelular (GUTEKNUST *et al.*, 2004). FbsB pode ser secretada ou associada não covalentemente à parede celular e possui uma afinidade significativamente menor com o fibrinogênio imobilizado quando comparada com a FbsA (GUTEKNUST *et al.*, 2004; PIERNO *et al.*, 2006).

Os dados anteriormente referenciados sugerem que além de adesina, FbsA atue na evasão da resposta imune do hospedeiro e que FbsB atue como invasina.

#### M. Pili

Pili são estruturas celulares poliméricas não flagelares cuja síntese em *S. agalactiae* é associada a um operon que codifica, dentre outros fatores associados à biossíntese e regulação, três proteínas estruturais (genes *pilA – C*) (TELFORD *et al.*, 2006). Maisey e colaboradores (2007), empregando ensaios *in vitro*, associaram a proteína Pil A à adesão à células hBMEC enquanto Pil B foi associada à invasão destas células. Posteriormente, o mesmo grupo evidenciou que mutantes *pilB* negativos apresentaram maior susceptibilidade à ação microbicida de neutrófilos e macrófagos, bem como redução na virulência em modelo animal (MAISEY, DORAN & NIZET, 2008).

#### N. Adesina imunogênica Bacteriana de *Streptococcus* do grupo B

A proteína BibA (“group **B** *Streptococcus* **I**mmunogenic **B**acterial **A**dhesin”) é codificada pelo gene *bibA* e é expressa na superfície celular (SANTI *et al.*, 2007). Esta proteína pode ser também recuperada do sobrenadante de culturas. A deleção do gene *bibA* foi associada à redução na capacidade de sobrevivência em sangue total humano fresco heparinizado, na resistência à ação microbicida dependente de opsonofagocitose por neutrófilos humanos e na virulência em modelo de infecção em camundongos. Adicionalmente, os autores acima referidos verificaram que a cepa mutante apresentou redução na adesão a culturas de células epiteliais cervicais (ME180) e pulmonares (A549). Segundo os autores, BibA seria uma proteína multifuncional envolvida na resistência à ação microbicida fagocítica e na adesão a células do hospedeiro.

#### O. Proteína associada à superfície celular

A proteína CspA (“cell-surface-associated protein”), codificada pelo gene *cspA*, é parte de uma classe de serina proteases extracelulares de bactérias Gram-positivas, denominada CEP (“cell-envelope proteases”) (HARRIS *et al.*, 2003). Os dados apontam para a sua atuação na clivagem do fibrinogênio em produtos aderentes semelhantes à fibrina que recobrem a superfície bacteriana e interferem com a ação microbicida dependente de opsonofagocitose.

### **1.6. Relação entre cepas de *S. agalactiae* isoladas de bovinos e humanos**

Nas últimas décadas foi observada uma alteração no padrão das infecções causadas por *S. agalactiae*, de infecções predominantemente em bovinos (do final do século XIX até a década de 1960) para infecções em humanos (desde a década de 1970), sem, entretanto,

perder sua associação com mastites bovinas (ROSS, 1978; MCCRACKEN, 1973; ARNAUD *et al.*, 2007; DUARTE *et al.*, 2004).

Embora diversos estudos empregando PFGE e ribotipagem demonstrem que cepas isoladas de bovinos e humanos pertencem a grupos distintos, alguns autores verificaram, utilizando estas mesmas técnicas, cepas com as origens supracitadas que apresentaram relação genética (JENSEN & AARESTRUP, 1996; MARTINEZ *et al.*, 2000; DOGAN *et al.*, 2005; SUKHNANAND *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Alguns autores sugerem que embora clones humanos, como o ST 17, possam ter emergido a partir de cepas de origem bovina, a transmissão interespécie seria limitada (BISHARAT *et al.*, 2004; DOGAN *et al.*, 2005; SUKHNANAND *et al.*, 2005; HÉRY-ARNAUD *et al.*, 2007).

Oliveira e colaboradores (2006), analisando cepas de *S. agalactiae* isoladas no Brasil, detectaram perfis eletroforéticos indistinguíveis, empregando PFGE, bem como ribotipos indistinguíveis em uma cepa isolada no Rio de Janeiro, em 1980, de cervice humano e outra isolada em São Paulo, em 1987, de úbere bovino. Ambas reagiram com o antissoro do sorotipo V no teste de imunodifusão. Utilizando MLST, os mesmos autores verificaram uma única diferença de nucleotídeo em um dos sete genes metabólicos analisados, o que resultou na alocação da cepa bovina no ST 256 e da cepa humana no ST 26; ambos são parte do mesmo complexo clonal. Os autores verificaram ainda uma homologia de 100% entre os nucleotídeos das cepas na análise do sequenciamento parcial de nove outros genes metabólicos (dados não publicados).

É interessante ressaltar que os estudos supracitados empregaram técnicas de análise do DNA bacteriano para examinar as cepas de origens distintas, negligenciando, portanto, a expressão da virulência.

### **1.7. Estudo da patogenicidade de *S. agalactiae*: ensaios *in vivo* como ferramenta**

A elucidação detalhada da patogênese de *S. agalactiae* em seus hospedeiros possui várias dificuldades. O microrganismo se adapta ao seu hospedeiro durante o processo de colonização e expressa proteínas de superfície e outros fatores e é plausível que alguns destes sejam expressos apenas no hospedeiro e não em culturas de laboratório. Um exemplo é a respiração aeróbica descrita por Yamamoto e colaboradores (2005) que, segundo eles, ocorre *in vivo*, mas cuja ocorrência *in vitro* é dependente da adição de cofatores.

Outro ponto importante é que a evidência de que um componente bacteriano não contribui para a virulência em modelo animal não exclui a possibilidade de este ser importante durante o processo infeccioso no hospedeiro humano. As cepas de *S. agalactiae* de origem bovina possuem características de virulência diferentes daquelas detectadas em cepas isoladas de hospedeiro humano, como C5a peptidase, cujo gene é obrigatoriamente presente nas cepas humanas, porém frequentemente ausente nas bovinas (OLIVEIRA *et al.*, 2006; FRANKEN *et al.*, 2001). Esta proteína cliva o C5a humano mas não tem atividade enzimática sobre C5a murino, o que exemplifica as limitações do modelo animal em relação ao hospedeiro humano (LINDAHL, STALHAMMAR-CARLEMALM & ARESCHOUG. 2005).

Um terceiro aspecto é que os modelos de infecção utilizados para os estudos que objetivam elucidar a patogênese podem não reproduzir de modo fidedigno, no que tange à via de administração e dose infectante, por exemplo, a infecção humana. Camundongos e ratos neonatos são frequentemente empregados em estudos *in vivo* com *S. agalactiae*, dado a sua importância como patógeno neonatal, e a inoculação é geralmente realizada utilizando-se a via intraperitoneal ou hematogênica (LINDAHL, STALHAMMAR-CARLEMALM & ARESCHOUG. 2005). Um exemplo de limitação deste modelo é que as etapas de adesão ao epitélio pulmonar e posterior invasão da corrente sanguínea não são investigadas.

A despeito destes aspectos, muitas pesquisas têm demonstrado um grande número de componentes do *S. agalactiae* envolvidos na adesão, invasão, escape do “clearance” do sistema imune e em causar inflamação (SENDI, JOHANSSON & NORBY-TEGLUND, 2008).

### **1.8. Análise da diversidade genética: ferramentas de estudo**

Técnicas de tipagem molecular têm sido empregadas para a análise de diversidade genética de *S. agalactiae*, incluindo eletroforese de isoenzima (“multilocus enzyme electrophoresis”; “MLEE”), análise do RNA ribossomal, polimorfismo da amplificação randômica do DNA (“randomly amplified of polymorphic DNA”; “RAPD”), análise da restrição enzimática por eletroforese convencional (“restriction enzyme analysis by conventional electrophoresis”; “REA”), eletroforese em campos alternados (“pulsed-field gel electrophoresis”; “PFGE”) e “MLST” (“multilocus sequence typing system”) (QUENTIN *et al.*, 1995; CHATELLIER *et al.*, 1996; DMITRIEV *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2003).

As enzimas, os genes metabólicos e os genes que codificam rRNA, objetos de análise das técnicas de “MLEE”, “MLST” e ribotipagem, respectivamente, são vitais para a sobrevivência bacteriana, e, por isto, mais prováveis de serem conservados, e constituem bons marcadores de linhagem filogenética dentro das espécies (ROLLAND *et al.*, 1999). Entretanto, estudos empregando “PFGE”, “REA” e “RAPD” exploram integralmente o genoma bacteriano e permitem a análise de sequências não essenciais à sobrevivência, apresentando, assim, teoricamente, maior poder discriminatório em estudos de diversidade genética intraespécie (FASOLA, LIVDAHL & FERRIERI, 1993, ROLLAND *et al.*, 1999).

Tanto “MLEE” quanto “MLST” e ribotipagem apresentam reprodutibilidade satisfatória, entretanto é preconizado a utilização de ao menos 12 enzimas metabólicas, 7

genes metabólicos e três enzimas de restrição, respectivamente (ROLLAND *et al.*, 1999). Dentre as técnicas para análise de genoma total, o “RAPD” requer ao menos três iniciadores para ser discriminatório para *S. agalactiae* e não é satisfatoriamente reprodutível. Por outro lado, a “PFGE” e a “REA” são reprodutíveis e requerem a utilização de apenas uma enzima de restrição (FASOLA, LIVDAHL & FERRIERI, 1993; GORDILLO *et al.*, 1993, CHATELLIER *et al.*, 1997).

Na “REA”, enzimas de restrição com sítio frequente no DNA são requeridas para uma separação eficiente dos fragmentos gerados, existentes, então, em grande número, o que, por sua vez, dificulta a interpretação visual dos perfis eletroforéticos obtidos (FASOLA, LIVDAHL & FERRIERI, 1993). Para a realização da “PFGE” são comumente utilizadas enzimas de restrição com sítios pouco frequentes no DNA, o que resulta em um número menor de fragmentos maiores, facilitando sua interpretação visual. Adicionalmente, foram propostas alterações capazes de reduzir o tempo necessário a sua execução para menos de três dias em substituição aos seis a oito dias habituais (GORDILLO *et al.*, 1993, BENSON & FERRIERI, 2001). Portanto, a “PFGE” é adequada para a análise da diversidade genética em cepas de *S. agalactiae*. Existem numerosos estudos utilizando “PFGE” para a separação dos fragmentos gerados pela enzima de restrição *SmaI* (BLUMBERG *et al.*, 1996; ELLIOTT, FARMER & FACKLAM, 1998; LE THOMAS BORIES *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2001; MOYO, MAELAND & BERGH, 2002; SAVOIA *et al.*, 2008).

## 2. Objetivos

Levando-se em consideração a necessidade de um contínuo monitoramento da epidemiologia do *Streptococcus agalactiae* em nosso meio, a importância dos estudos relacionados ao papel patogênico de cepas de *S. agalactiae* isoladas de humanos e bovinos e da influência do crescimento *in vitro* e *in vivo* nas propriedades de virulência desses microrganismos, os objetivos neste trabalho foram:

1. Caracterizar cepas de *S. agalactiae* de origem humana isoladas no estado do Rio de Janeiro em 2008 quanto à diversidade genética e à susceptibilidade aos antimicrobianos.
2. Avaliar e comparar o potencial patogênico de cepas de *S. agalactiae* de origens bovina, 87159 e 87244, e humana, 80427 e 90356, previamente analisadas quanto às suas características moleculares (Oliveira *et al.*, 2006).
3. Investigar a influência do ambiente *in vivo* na patogenicidade de *Streptococcus agalactiae* nas cepas 80427 e 90356.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Soluções e meios de cultivo

- ✓ **Ágar sangue:** base de ágar sangue (Merck) acrescida de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Biocampo).
- ✓ **Ágar Mueller-Hinton sangue:** ágar Mueller Hinton (Oxoid) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro.
- ✓ **Meio 199 (Gibco):** meio com pH 7.0 tamponado com solução de NaHCO<sub>3</sub> (Reagen) a 1M.
- ✓ **PIV:** [Tris (Amersham Pharmacia Biotech) 0,01 M; HCl (Isolar); pH 8,0 (solução Tris - HCl)]; NaCl (Amersham Pharmacia Biotech) 1 M; água bidestilada q.s.p. 1000ml.
- ✓ **TBE 0,5 X:** Tris ultrapuro (Amersham Pharmacia Biotech) 50 mM; ácido bórico (Amersham Pharmacia Biotech) 50 mM; EDTA dissódico (Amersham Pharmacia Biotech) 1 mM; pH final 8,0; água bidestilada q.s.p. 1000ml.
- ✓ **EC lise:** tampão EC [Tris - HCl 6,0 mM pH 8,0; NaCl (Sigma) 1M; EDTA tetrassódico (Amersham Pharmacia Biotech) 0,1 M, pH8,0; desoxicolato de sódio (Amersham Pharmacia Biotech) 0,005M; dodecil sulfato de sódio (SDS; Amersham Pharmacia Biotech) 0,5% (p/v)]; lisozima (Amersham Pharmacia Biotech) 2x10<sup>4</sup> U/ml; mutanolisina (Amersham Pharmacia Biotech) 5U/ml; BRIJ® 35 solution (Sigma) 0,25%; RNase I (Amersham Pharmacia Biotech) 3,75 U/ml.
- ✓ **ESP:** tampão ES [EDTA tetrassódico 0,5 M pH 9,0;. SDS 1 %(p/v)]; proteinase K (Amersham Pharmacia Biotech) 4,16 U/ml.
- ✓ **Tampão TE:** Tris - HCl 10 mM pH 8,0; EDTA dissódico 1 mM pH 8,0; água bidestilada q.s.p. 1000ml.

- ✓ **Solução de restrição:** tampão da enzima *Sma* I 1X; albumina sérica bovina 1X; enzima *Sma*I (12 U/ ml); (kit da Amersham Pharmacia Biotech); água bidestilada q.s.p.
- ✓ **Solução de lise:** tampão TE; lisozima  $2 \times 10^4$  U/ml; mutanolisina 5 U/ml; BRIJ® 35 solution 0.5% (v/v); RNase 3,75 U/ml.
- ✓ **Solução de precipitação:** acetato de sódio (Reagen) 3M; etanol absoluto (Reagen).
- ✓ **Solução de degradação protéica:** tampão TE; protease (Amersham Pharmacia Biotech) 0,4 U/ml; SDS 10% (p/v).
- ✓ **Tampão de cepa:** azul de bromocresol (Sigma) 0,25% (p/v); sacarose (Reagen) 40% (p/v); água destilada q.s.p. 20ml.
- ✓ **“PBS”:** NaCl 0,14M; KCl (Reagen) 0,003M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Reagen) 0,01M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Reagen) 0,001M; água destilada q.s.p 1000 ml pH 7,0.
- ✓ **Solução de poliacrilamida a 30%:** acrilamida (Amersham Pharmacia Biotech) 30% (p/v); N’N’-bis-metileno-acrilamida (Amersham Pharmacia Biotech) 2,67% (p/v) ; água destilada q.s.p 100 ml.
- ✓ **Gel de empilhamento a 4 %:** Tris-HCL 0,125M, pH 6,8; SDS 0,1% (p/v); poliacrilamida 4% (v/v); persulfato de amônio (Sigma) 0,05% (p/v); TEMED (Sigma) 0,1% (v/v); água destilada q.s.p. 10ml.
- ✓ **Gel de separação a 12%:** Tris-HCL 0,375M, pH 8,8; SDS 0,1% (p/v); poliacrilamida 12% (v/v); persulfato de amônio 0,05% (p/v); TEMED 0,05% (v/v); água destilada q.s.p. 10ml
- ✓ **Tampão de amostra:** Tris-HCl 0,06M pH 6,8; SDS 2% (p/v); glicerol (Reagen) 10% (v/v); 2-mercaptoetanol (Reagen) 5% (p/v); azul de bromofenol (Sigma) 0,05% (p/v).
- ✓ **Tampão de corrida:** Tris–HCl 0,1M; SDS 0,5% (p/v); glicina 1M; água destilada q.s.p. 1000ml.
- ✓ **Solução 1:** etanol (ou metanol) 30% (v/v); ácido fosfórico (Isolfar) 2% (v/v); água

destilada q.s.p. 1000ml.

- ✓ **Solução 2:** ácido fosfórico 2% (v/v); água destilada q.s.p. 1000ml.
- ✓ **Solução 3:** ácido fosfórico 2% (v/v); etanol (ou metanol) 18% (v/v); sulfato de amônio (Sigma) 15% (p/v); água destilada q.s.p. 1000ml.
- ✓ **Solução corante:** Coomassie Blue-G 250 (Sigma) 2% (p/v); água destilada q.s.p. 50ml

### **3.2. Objetivo 1: Caracterização de cepas de *S. agalactiae* de origem humana isoladas no estado do Rio de Janeiro em 2008 quanto à diversidade genética e à susceptibilidade aos antimicrobianos.**

#### **3.2.1. Cepas bacterianas**

Foram analisadas 86 cepas de *S. agalactiae* de origem humana, isoladas de sítios anatômicos diversos, de pacientes do Hospital Naval Marcílio Dias e de militares do Centro de Instrução Pára-quedista General Penha Brasil, no estado do Rio de Janeiro, entre os meses de fevereiro e outubro de 2008. Os dados acerca destas cepas são descritos na tabela 3. Apenas uma cepa de cada paciente foi analisada no presente estudo. Todas as cepas fazem parte da Coleção de Culturas do Laboratório de Cocos Patogênicos e foram estocadas sob congelamento em freezer, em caldo Todd-Hewitt (THB; Difco) contendo 12,5% de glicerol (v/v).

#### **3.2.2. Confirmação da identificação fenotípica**

##### A. Detecção da atividade do fator CAMP

A atividade do fator CAMP foi detectada utilizando-se o método descrito por Christie

e colaboradores (1944), que consiste da semeadura de estria central de uma cepa de *Staphylococcus aureus* produtora de beta-lisina em placa contendo meio ágar sangue e, perpendicularmente a esta, estrias de cepas a serem testadas, seguindo de incubação por 18 horas à 37°C. A formação de zona de beta-hemólise em forma de ponta de seta ou meia lua entre as estrias das cepas teste e de *S. aureus*, decorrente da ação sinérgica do fator CAMP com a beta-lisina, foi considerado resultado positivo e presuntivo de *S. agalactiae*. A cepa SS-499 de Grupo D de Lancefield foi utilizada como controle negativo. A cepa de *S. agalactiae* ATCC 13.813 foi utilizada como controle positivo.

#### B. Detecção da hidrólise do hipurato de sódio

A enzima hipuricase promove a hidrólise do hipurato de sódio em benzoato de sódio e glicina. Colônias da cultura em placa foram adicionadas a 800µl de caldo contendo exclusivamente hipurato de sódio (Sigma) e água destilada, seguindo-se de incubação por 2 horas à 37°C. A fim de precipitar a glicina foram adicionados 400µl de solução de ninhidrina (a 3,5% diluída em acetona/butanol a 1:1). A formação da coloração roxa em um período de 10 minutos foi considerada resultado positivo. A cepa de *Streptococcus pyogenes* 75194 foi utilizada como controle negativo. A cepa de *S. agalactiae* ATCC 13.813 foi utilizada como controle positivo.

#### C. Confirmação do grupo sorológico

Foi utilizado o sistema comercial “Slidex Strepto – Kit” (bioMérieux) conforme as instruções do fabricante. Brevemente, 5 colônias de um crescimento bacteriano cultivado em ágar sangue foram suspensas em 0,4ml de solução da enzima de extração seguido de incubação por 15 minutos à 37°C para a extração do carboidrato C. Foi adicionada uma gota do extrato às suspensões de látex, constituídas por partículas do polímero recobertas com

anticorpos específicos para os grupos A, B, C, D, F e G numa superfície, seguido de homogeneização por aproximadamente 2 minutos. A reação de aglutinação foi considerada positiva quando houve a formação de grumos visíveis.

### **3.2.3. Análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos**

A análise da susceptibilidade aos antibióticos foi realizada em 86 cepas de *S. agalactiae* utilizando-se o método da disco-difusão em meio sólido. O protocolo, a escolha dos antibióticos e a interpretação dos halos foram preconizados pelo CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2007). A cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 foi utilizada como controle nos testes.

#### A. Inóculo bacteriano

As cepas foram cultivadas em ágar sangue por 18 horas a 37°C e submetidas a novo cultivo seguindo o mesmo procedimento. O inóculo padronizado foi preparado pela suspensão de colônias em solução de NaCl a 0,9% (p/v), empregando como parâmetro para a turbidez a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente  $10^8$  UFC/ml).

#### B. Disco-difusão

O inóculo foi semeado, através de um “swab” estéril, em placas contendo o meio de ágar Mueller-Hinton sangue, e em um intervalo máximo de 15 minutos os discos dos seguintes antibióticos foram aplicados na superfície da placa: cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), vancomicina (30µg), clindamicina (2µg), tetraciclina (30µg), rifampicina (5µg), penicilina (10UI) e levofloxacina (5µg) (CECON-São Paulo). Após incubação à 37°C por 18 horas, os halos de inibição do crescimento bacteriano foram mensurados e

interpretados de acordo com o CLSI (2007).

### **3.2.4. Análise da diversidade genética**

A técnica de “PFGE” foi executada conforme protocolo descrito por Corrêa (2005), com algumas modificações, em 65 cepas de *S. agalactiae* aleatoriamente selecionadas dentre as cepas previamente submetidas à análise da susceptibilidade aos antimicrobianos (acima descrito).

#### A. Emblocamento das células

A partir do cultivo da cepa em 5ml de caldo THB, durante 18 horas à 37°C, um volume de 1,5ml foi centrifugado a 2500 x g. Após duas lavagens com tampão PIV, o sedimento bacteriano foi ressuspensão no mesmo tampão, e adicionado (1:1) de agarose de baixos pontos de gelificação e fusão (Amersham Pharmacia Biotech). Esta agarose a 1,5% (p/v) foi previamente preparada em tampão TBE 0,5X e mantida à 42°C. Alíquotas de 20µl da preparação (células em PIV: agarose) foram utilizadas para a formação de discos.

#### B. Extração do DNA

Os discos foram submetidos a tratamento enzimático em duas etapas, resultando na extração do DNA. Na primeira, os discos foram incubados durante 24 horas à 37°C em solução de lise, sendo então transferidos para a solução de degradação protéica, incubando-se por 24 horas à 51°C. Após o descarte da solução, os discos foram submetidos a quatro incubações de 1 hora cada, à temperatura ambiente sob leve agitação em tampão TE 1X, para lavagem.

### C. Fragmentação do DNA

Os fragmentos de DNA foram obtidos a partir da impregnação de 3 discos com 60µl tampão da enzima de restrição *SmaI* durante 20 minutos sob temperatura ambiente e posterior incubação durante 18 horas à 30°C em 60µl da solução de restrição.

### D. Separação e detecção dos fragmentos de DNA

Para separação dos fragmentos de DNA, inicialmente, 3 discos de cada cepa foram submetidos ao aquecimento à 65°C durante 5 minutos em banho seco e, então, o material resultante e um disco de padrão de tamanho de DNA (Lambda Ladder, BioLabs) foram depositados nas canaletas do gel de agarose ultra pura (Gibco BRL) a 1% (p/v) em TBE 0,5X. A eletroforese foi realizada utilizando-se o aparelho CHEFF-DR III (BioRad) e TBE 0,5X como tampão de corrida. O programa consistiu de pulso inicial de 1 segundo e pulso final de 30 segundos, 6V/cm, temperatura do tampão a 11,3°C, 23 horas de corrida e ângulo de 120°. Para detecção dos fragmentos, o gel foi submetido à coloração com brometo de etídio (Sigma) a 0,5µg/ml durante 20 minutos a temperatura ambiente, descoloração com água destilada durante 18 horas à 4°C e, finalmente, a sua imagem foi capturada em “DNR Bioimage System” (Scorpion SCOR-14SOM) sob transiluminação de luz ultravioleta.

### E. Análise dos perfis eletroforéticos

As imagens foram analisadas utilizando-se o “software” GelComparII (Applied Maths, Belgium). O coeficiente de Dice foi empregado para analisar similaridades entre os perfis eletroforéticos, bem como a tolerância de posição em 1%. O método UPGMA (“unweighted pair group method with arithmetic mean”) foi utilizado para a formação dos “clusters”. Os dendogramas gerados foram analisados empregando-se o critério descrito por Singh *et al.* (2006). Em resumo, os perfis que apresentaram 100% de similaridade foram considerados

indistinguíveis e os perfis que apresentaram similaridade superior a 80% foram considerados relacionados geneticamente.

### **3.3. Objetivo 2: Avaliação e comparação do potencial patogênico de cepas de *S. agalactiae* de origens bovina e humana**

#### **3.3.1. Cepas bacterianas**

Foram analisadas quatro cepas de *S. agalactiae* (duas de origem humana e duas de origem bovina) cujos tipos sorológicos, perfis eletroforéticos e STs foram previamente avaliados empregando-se imunodifusão radial dupla para tipagem sorológica, PFGE e MLST, respectivamente (tabela 1). Todas as cepas fazem parte da Coleção de Culturas do Laboratório de Cocos Patogênicos e são estocadas a -20° C em caldo THB contendo 12,5% de glicerol. As cepas 80427 e 87159 possuem relação genética e as cepas 87244 e 90356 não possuem relação genética entre si ou com as duas cepas anteriormente citadas e foram inseridas no estudo como controles.

**Tabela 1:** Cepas de *S.agalactiae* utilizadas no objetivo 2 do estudo.

Cepa <sup>1</sup>	Origem clínica	Sorotipo	Local <sup>2</sup>	Ano	Perfil de PFGE <sup>3</sup>	MLST <sup>4</sup>
80427	Humana (cérvix de gestante)	V	RJ	1980	P1	ST 26
87159	Bovina (leite)	V	SP	1987	A2	ST 256
87244	Bovina (leite)	II	RJ	1987	B	ND
90356	Humana (líquor de neonato)	III	RJ	1990	G2	ND

<sup>1</sup>. Características determinadas por Oliveira *et al.* (2005, 2006).

<sup>2</sup>. RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo

<sup>3</sup>. PFGE, Pulsed-field gel electrophoresis; os perfis de PFGE P1 e A2 são indistinguíveis entre si.

<sup>4</sup>. MLST, multi locus sequence typing; ST, sequence type; ND, não determinado; os STs 26 e 256 possuem diferença em um alelo (*adhP*), como resultado de uma mutação pontual (C/A).

### **3.3.2. Detecção de genes que codificam fatores associados à virulência**

A presença dos genes associados à virulência *hylB*, *lmb*, *bca* e *bac*, que codificam, respectivamente, hialuronidase, proteína ligadora de laminina, proteína alfa e proteína beta e dos genes metabólicos *stp* e *stk* que codificam, respectivamente, serina treonina fosfatase e serina treonina quinase foi determinada por PCR. Os dois últimos genes foram utilizados como controles internos em cada reação.

#### A. Obtenção do DNA bacteriano

A extração do DNA foi realizada conforme protocolo padronizado por Oliveira (2001). As cepas foram cultivadas em 100ml de caldo THB durante 18 horas à 37°C. O sedimento bacteriano, obtido por centrifugação a 3000 x g por 20 minutos, foi submetido à lavagem com 1ml de tampão TE e posteriormente incubado durante 18 horas à 37°C em solução de lise. Após, foi adicionado 1ml de solução para degradação protéica seguido de incubação durante 1 hora à 37°C. A precipitação do DNA ocorreu a partir da adição de 2ml de solução de precipitação gelada, incubação por 30 minutos à -20°C e centrifugação a 3000 x g por 30 minutos. Após descarte da fase aquosa, o sedimento foi dissolvido em 1ml de água bidestilada e foi repetido todo o processo para precipitação do DNA. Ao sedimento final foi

adicionado 1ml de etanol à 70% gelado e centrifugado à 3000 x g por 30 minutos. O sedimento foi submetido à secagem à 37°C em estufa por cerca de 20 minutos e, posteriormente, dissolvido com 500µL de água bidestilada. O DNA obtido foi estocado à – 20°C e posteriormente empregado nas reações de PCR.

### B. Reação da polimerase em cadeia

Os iniciadores utilizados foram previamente descritos (Oliveira, 2005; Corrêa, 2005) e encontram-se apresentados na tabela 2.

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados nas reações de PCR multiplex para detecção de genes codificadores de fatores associados à virulência de *S. agalactiae*.

<b>Gene/proteína codificada</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Tamanho do produto de PCR</b>
<i>bca</i> / proteína alfa	“forward”: 5’ – CTACAATTCCAGGGAGTGCA – 3’ “reverse”: 5’ – ACTTTCTTCCGTCCACTTAG – 3’	376 pb
<i>bac</i> / proteína beta	“forward”: 5’ – AAGCAACTAGAAGAGGAAGC – 3’ “reverse”: 5’ – TTCTGCTCTGGTGTTTTAGG – 3’	479 pb
<i>hylB</i> / hialuronidase	“forward”: 5’ – CACCAATCCCCACTCTACTA – 3’ “reverse”: 5’ – TGTGTCAAACCATCTATCAG – 3’	444 pb
<i>lmb</i> / proteína ligadora de laminina	“forward”: 5’ – CCGTCTGTAAATGATGTGGC – 3’ “reverse”: 5’ – GAAATACCCGAGATACCAAG – 3’	413 pb
<i>stp</i> / serinatreonina fosfatase	“forward”: 5’ – GATATTGGGCAACGTCGTTC – 3’ “reverse”: 5’ – GATACTCTCCTTGACGAACG – 3’	327 pb
<i>stk</i> / serinatreonina quinase	“forward”: 5’ – GACAACCTTATGAGATGGGAC – 3’ “reverse”: 5’ – CGACTGTGCTAAGATTGTAC – 3’	639 pb

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (Applied BioSystems, São Paulo) de acordo com protocolo descrito por Corrêa (2005). Foram realizadas quatro reações distintas de PCR-multiplex empregando-se o mesmo ciclo: reação 1) iniciadores para a amplificação dos genes *lmb* e *stk*; reação 2) iniciadores para a amplificação dos genes *bac* e *stp*; reação 3) iniciadores para a amplificação dos genes *hylB* e *stk* e reação 4) iniciadores para a amplificação dos genes *bca* e *stk*. O volume final de 50µl da mistura para cada reação continha MgCl<sub>2</sub> a 2mM em tampão para reação (Tris-HCl 75mM, KCl 50mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, pH 9,0), 1,0 U de *Taq* polymerase (Biotools B&M Labs, São Paulo), 5 µL de DNA, 0,2nM de cada deoxinucleotídeo, 20 pM de cada iniciador e água bidestilada até completar o volume final. O seguinte ciclo foi utilizado: pré-desnaturação à 94°C durante 5 minutos, seguido de 25 ciclos, contendo uma etapa de desnaturação, à 94°C por 30 segundos, seguida pelo anelamento, durante 30 segundos à 53°C, e pela extensão, à 72°C por 1 minuto e, posteriormente, de uma extensão final à 72°C por 4 minutos. A temperatura de anelamento foi definida de acordo com os valores de T<sub>m</sub> (sigla inglesa para “melting point”, temperatura de fusão) dos iniciadores.

### C. Eletroforese convencional:

A detecção dos amplicons gerados foi realizada em gel de agarose (Gibco) a 1% (p/v) em tampão TBE 0,5X, com corrida em tampão TBE 0,5X, a 90V e durante 60 minutos, sendo empregado o padrão de tamanho de DNA 100pb (Invitrogen). As cepas foram diluídas em 5µl de tampão de cepa (proporção de 1:1). Posteriormente, o gel submetido à coloração com brometo de etídio (Sigma) a 5µg/ml durante 20 minutos a temperatura ambiente foi fotografado com filme Polaroid 667 sob transiluminação de ultravioleta.

### **3.3.3. Adesão e invasão à cultura de células 16HBe**

Foi empregado o protocolo descrito por Schubert e colaboradores (2004) com adaptações.

#### A.Cultura de células

As células 16HBe, isoladas de epitélio brônquico pulmonar humano, foram mantidas congeladas no nitrogênio líquido em meio 199 (contendo 20% de soro fetal bovino e 20% de DMSO). Para o ensaio de adesão e invasão, as células foram transferidas para placas de 24 poços com meio 199 acrescido de 2,5µg/L de fungizona (Sigma), 100µg/ml de sulfato de gentamicina (Sigma) e 10% de soro fetal bovino e incubadas à 37°C em atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) durante cerca de 48 horas. A formação de monocamada confluenta foi verificada em microscópio invertido sob aumento de 40x.

#### B.Inóculo bacteriano

As cepas bacterianas foram cultivadas em ágar sangue por cerca de 18 horas a 37°C e, posteriormente, em caldo THB à 37°C até atingirem turbidez equivalente à 0,4 DO<sub>540</sub>, o que corresponde a cerca de 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml. O inóculo bacteriano foi, então, diluído para 10<sup>6</sup> UFC/ml em meio 199 contendo 10% de soro fetal bovino. Este inóculo foi submetido à diluição decimal seriada e posteriormente semeado em ágar sangue e incubado a 37°C por 18 horas para a contagem das UFC correspondentes ao inóculo inicial do ensaio (tempo 0).

#### C. Infecção da monocamada de células

Após a lavagem da monocamada confluenta de células 16HBe com meio 199, uma alíquota de 1ml do inóculo bacteriano (10<sup>6</sup> UFC/ml) foi adicionada a cada poço, seguido de

incubação à 37°C durante 2 horas em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Placas de 24 poços distintas foram utilizadas para a avaliação da adesão e da invasão.

a) Adesão: após as duas horas de incubação, na placa destinada ao ensaio de adesão, foram realizadas três lavagens, que consistiram na adição e descarte de 1ml de “PBS” e lise da monocamada adicionando-se 1ml de Triton X-100 a 0,01% em água destilada (v/v). Então, o inóculo bacteriano recuperado foi submetido à diluição decimal seriada em solução de NaCl a 0,9% (p/v) e semeadura em ágar sangue para contagem das UFC após incubação por 24 horas à 37°C.

b) Invasão: após as duas horas de incubação, na placa destinada ao ensaio de invasão, foram realizadas três lavagens com meio 199, foi adicionado 1ml de meio 199 contendo 10% de soro fetal bovino, 100UI/ml de penicilina G e 100µg/ml de sulfato de gentamicina. A seguir, foi realizada nova incubação à 37°C em atmosfera com cerca de 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas. Após este período, foram realizadas três lavagens com “PBS”, lise da monocamada com 1 ml de Triton X-100 (Sigma) a 0,01% em água destilada (v/v), diluição decimal seriada e plaqueamento do inóculo bacteriano recuperado para contagem das UFC, após incubação por 24 horas à 37°C, conforme descrito no item imediatamente acima.

A porcentagem de adesão e de invasão foi avaliada utilizando-se o seguinte cálculo: porcentagem de adesão ou invasão = UFC final/UFC inicial x 100. Foram realizados três ensaios independentes, em quadruplicata.

#### **3.3.4. Sobrevivência intracelular em macrófagos de murinos**

Foi realizado o protocolo descrito por Poyart e colaboradores (2001; 2003) com

algumas modificações.

#### A. Animais

Foram utilizados camundongos adultos jovens com cerca de 30 gramas de peso, da linhagem Balb/c. Estes foram mantidos em caixas de polipropileno sob condições padrões de água, alimentação e temperatura.

#### B. Cultura de células

Para a obtenção da monocamada de macrófagos murinos, foi realizada a inoculação via intraperitoneal de 1ml de solução de tioglicolato (Merck) a 10% em água destilada (v/v) em três camundongos. Após 4 dias, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e o lavado peritoneal de cada animal foi removido por instilação e aspiração de meio 199 contendo 100µg/ml de gentamicina e 100UI/ml de penicilina. Foi realizada a contagem das células com morfologia típica de macrófagos bem como a avaliação da viabilidade celular empregando-se coloração com Azul de Tripán a 0,4% em água destilada (p/v), hemocitômetro e aumento de 40X em microscópio ótico. Cerca de  $1 \times 10^5$  macrófagos em meio 199 contendo 10% de soro fetal bovino, 100µg/ml de gentamicina e 100UI/ml de penicilina foram adicionados a cada poço da placa de 24 poços. Após 1 hora de incubação à 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, o meio de cultura contendo as células não aderentes foi descartado e após duas lavagens com “PBS” foi adicionado meio 199 fresco contendo 10% de soro fetal bovino seguido de nova incubação à 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas para a formação de monocamada confluenta.

#### B. Inóculo bacteriano

As cepas bacterianas foram cultivadas em agar sangue por cerca de 18 horas à 37°C, e

posteriormente em caldo THB, a 37°C, até atingirem turbidez equivalente à 0,4 DO<sub>540</sub>, o que corresponde a cerca de 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml. O inóculo bacteriano foi então diluído para 10<sup>6</sup> UFC/ml em meio 199 contendo 10% de soro fetal bovino. A fim de verificar a realização correta da diluição, o inóculo foi submetido à diluição decimal seriada e posteriormente semeado em ágar sangue e incubado à 37°C por 18 horas para a contagem das UFC.

### C. Infecção da monocamada de células

Após a lavagem da monocamada confluenta com meio 199, uma alíquota de 1ml do inóculo bacteriano foi adicionado a cada poço, seguido de incubação a 4°C por 15 minutos, para a adesão, e 30 minutos à 37°C, para invasão. Após este período, seguiram-se três lavagens com 1ml de “PBS” e posterior adição de 1ml de meio 199 contendo 10% de soro fetal bovino, 100UI/ml de penicilina G e 100µg/ml de sulfato de gentamicina e incubação à 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após a adição do meio contendo antibiótico, nos tempos 0 (tempo inicial do ensaio), 2, 4 e 6 horas, poços em triplicata para cada cepa foram submetidos a três lavagens com 1ml de PBS seguindo-se de lise da monocamada pela adição de 1ml de Triton X-100 a 0,1% em água destilada (v/v). A seguir foi realizada a diluição decimal seriada em solução de NaCl a 0,9% (p/v) e semeadura em ágar sangue do inóculo bacteriano recuperado para contagem das UFC, após incubação por 24 horas à 37°C.

A porcentagem de sobrevivência intracelular em macrófagos foi avaliada utilizando-se o seguinte cálculo: % sobrevivência = UFC final/UFC inicial x 100. Foram realizados três ensaios independentes em triplicata.

### **3.3.5. Susceptibilidade à ação bactericida do sangue humano total fresco**

Foi realizado o protocolo descrito por Liu e colaboradores (2003) e Santi e

colaboradores (2007). Foram realizados dois ensaios independentes com sangue coletado de quatro doadores. Os doadores foram do sexo feminino, imunocompetentes, sem infecção em curso conhecida e sem uso de medicação antimicrobiana ou anti-inflamatória nos 15 dias anteriores a coleta.

#### A. Inóculo bacteriano

As cepas bacterianas foram cultivadas em ágar sangue por cerca de 18 horas, à 37°C, e posteriormente em caldo THB, à 37°C, até atingirem turbidez equivalente à 0,4 DO<sub>540</sub>, o que corresponde a cerca de 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml. O inóculo bacteriano foi, então, diluído para 10<sup>4</sup> UFC/ml em solução de NaCl a 0,9% (p/v) e o valor correto da contagem determinado através de diluição decimal seriada e posterior semeadura em ágar sangue e incubação à 37°C, por 18 horas, para a contagem das UFC.

#### B. Infecção do sangue

Um volume de 300µl do inóculo bacteriano foi adicionado a 600µl de sangue humano total fresco heparinizado. Imediatamente uma alíquota foi retirada, submetida à diluição decimal seriada em solução de NaCl a 0,9% (p/v) e semeada em ágar sangue, seguido-se de incubação à 37°C, por 24 horas, para a posterior contagem das UFC relativas ao inóculo inicial (tempo zero) do ensaio. O sangue inoculado foi submetido à incubação a 37°C, por 3 horas, sob rotação (20 rpm). Em seguida, o inóculo foi submetido à diluição decimal seriada e posteriormente semeado em ágar sangue e incubado a 37°C por 18 horas para a contagem das UFC.

A porcentagem de sobrevivência bacteriana à ação bactericida foi avaliada utilizando-se o seguinte cálculo: % de sobrevivência à ação bactericida = UFC final/UFC inicial x 100. Foram realizados dois ensaios independentes com cada um dos quatro doadores.

### **3.3.6. Análise do perfil protéico total das cepas de *S. agalactiae***

#### A. Obtenção de células bacterianas

Para o crescimento bacteriano, o protocolo que compreendia o crescimento em caldo THB até a obtenção de turbidez equivalente a 0,4 DO<sub>540</sub>, anteriormente citado, foi utilizado. Após duas lavagens com PBS, o sedimento bacteriano foi submetido à lise.

#### B. Lise celular e extração das proteínas bacterianas

Para a lise bacteriana, as células centrifugadas a 3.500  $\times$  g por 3 minutos e posteriormente ressuspensas em 500 $\mu$ l de tampão TE foram submetidas à lise por sonicação (Ultrasonic High Intensity Processor-Sigma), empregando-se 15 pulsos de 18 segundos cada, sempre em banho de gelo. Após centrifugação a 275  $\times$  g, por 5 minutos, o sobrenadante contendo as proteínas totais foi recolhido e estocado sob congelamento em freezer.

#### C. Dosagem de proteínas

De acordo com protocolo estabelecido por Bradford (1976), aos sobrenadantes obtidos nos procedimentos anteriores, adicionou-se 1ml da solução corante I e, após 10 minutos, realizou-se a leitura da absorbância a 595 nm contra um branco contendo água e 1ml do corante. Para a curva padrão, quantidades crescentes (1 a 10  $\mu$ g) de albumina bovina sérica (Sigma) em volumes de 0,1ml de água bidestilada, foram adicionadas a 1ml da solução corante e a leitura da absorbância processada em espectrofotômetro (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech).

#### D. Concentração das proteínas

Quando necessário, um volume de acetona PA (Merck), equivalente a três vezes o

volume de sobrenadante contendo as proteínas totais, foi utilizado para precipitar as proteínas. Após incubação por no mínimo 4 horas sob congelamento em freezer, a mistura de sobrenadante e acetona foi submetida à centrifugação por 275 x g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento submetido à evaporação da acetona restante, ao manter-se o tubo aberto sob temperatura ambiente. Posteriormente, o sedimento foi ressuspensão em volume adequado de tampão TE.

#### E. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Foi utilizado o protocolo descrito por Laemmli (1970) com algumas modificações. Uma alíquota de 500µl de tampão TE 1X contendo as proteínas foi diluída em tampão de amostra (1:1), aquecida a 100°C por 5 minutos e, posteriormente, aproximadamente 15µg de cada preparação protéica foi empregada para determinação do perfil eletroforético, empregando-se a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (“SDS-PAGE”). As proteínas totais foram separadas de acordo com seu peso molecular sob corrente de 200V em gel de empilhamento a 4% e gel de separação a 12%. O padrão de peso molecular “Broad Range Protein Molecular Marker” (Promega) foi utilizado.

F. Coloração do gel: A técnica de coloração por Coomassie coloidal foi empregada para a visualização dos perfis eletroforéticos obtidos. Para tal, o gel foi inicialmente submetido a três lavagens de 30 minutos cada uma na solução 1, posteriormente três lavagens de 20 minutos cada uma na solução 2 e, após a impregnação do gel pela solução 3 por 30 minutos, a solução corante II foi adicionada. Ao final, o gel foi lavado com água destilada até a remoção adequada da coloração do fundo e a sua imagem foi escaneada (DNR Bioimage system - Scorpion SCOR-14SOM). O gel foi, então, submetido à secagem entre duas folhas de celofane, por um período de até 24 horas e, então, a comparação visual dos perfis realizada.

### **3.3.7. Avaliação da patogenicidade bacteriana em modelo de sepse em animais**

#### A. Animais

Foram utilizados camundongos neonatos, da linhagem Balb/c, com 4 ou 8 dias de vida. Estes foram mantidos em caixas de polipropileno juntamente com suas mães e sob condições padrões de água, alimentação e temperatura.

#### B. Inóculo bacteriano

As cepas bacterianas foram cultivadas em ágar sangue por cerca de 18 horas à 37°C e, posteriormente, em caldo THB à 37°C até atingirem turbidez equivalente à 0,4 DO<sub>540</sub>. A cultura foi então diluída para 10<sup>6</sup> UFC/ml em solução de NaCl a 0,9%. Este inóculo foi submetido à diluição decimal seriada e posteriormente semeado em ágar sangue e incubado a 37°C por 18 horas para a contagem das UFC.

#### C. Infecção dos animais:

Um volume de 10µl (10<sup>4</sup> UFC) do inóculo bacteriano padronizado foi injetado, via intraperitoneal, em cada animal. Grupos de animais controle foram inoculados nas mesmas condições com solução de NaCl a 0,9% estéril. Os animais foram avaliados durante 6 dias consecutivos quanto a sua sobrevivência. Foram realizados dois ensaios, totalizando de 12 a 34 animais para cada uma das cepas estudadas.

### **3.3.8. Análises estatísticas**

As diferenças no número de UFC foram analisadas utilizando o teste *t* bicaudal para cepas não pareadas. Nos ensaios de sepse a comparação dos tempos de sobrevivência foi

realizada pelo teste de contingência  $X^2$  log-rank. O nível de significância de 95% foi utilizado para a hipótese nula ( $p$  superior a 0,05).

### **3.4. Objetivo 3: Avaliação da influência do ambiente *in vivo* na patogenicidade de *S. agalactiae*.**

#### **3.4.1. Cepas bacterianas**

Foram estudadas as cepas 80427 e 90356, descritas no item 3.3.1 As cepas submetidas ao cultivo *in vivo* e *in vitro* foram utilizadas como inóculo bacteriano em cada um dos ensaios abaixo descritos como itens 3.4.2 a 3.4.5.

#### **3.4.2. Crescimento *in vivo***

Foi empregado o protocolo estabelecido por Silva Filho (1991).

##### A. Animais

Camundongos da linhagem Balb/c machos, adultos jovens, com 3 a 4 semanas de vida e pesando de 25 a 30 gramas foram utilizados para a obtenção de inóculo para a realização dos ensaios para avaliação da susceptibilidade à ação bactericida de sangue humano total fresco e para sobrevivência em modelo de sepse em camundongos. Para a realização da análise do perfil protéico das cepas bacterianas, foram empregados ratos da linhagem Wistar machos, adultos jovens com cerca de 250 gramas. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno em condições padrão de água, alimentação e temperatura.

## B. Inóculo bacteriano

Colônias das cepas cultivadas em agar sangue a 37°C durante 18 horas foram submetidas a crescimento em caldo THB até atingirem turbidez equivalente à 0,4 DO<sub>540</sub> (1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml). Após duas lavagens com PBS, o sedimento bacteriano foi, então, diluída para 10<sup>4</sup> UFC/ml em meio 199. A fim de calcular a sua contagem real, o inóculo foi submetido à diluição decimal seriada e posteriormente semeado em ágar sangue e incubado a 37°C por 18 horas para a contagem das UFC. Um volume final de 300µl foi acondicionado em cada câmara.

## C. Preparação das câmaras e implantação intra-peritoneal nos animais

Câmaras de polipropileno, semipermeáveis, medindo 16mm de comprimento por 7mm de diâmetro, foram construídas a partir do corpo de seringas de 1ml fixando-se membrana filtrante (Millipore) com poros de 0,45µm de diâmetro nas extremidades e utilizadas para a implantação em camundongos. Para a implantação em ratos, câmaras similares foram contruídas a partir do corpo de seringas de 5ml, permitindo, assim, o acondicionamento de maior volume de inóculo bacteriano. Devido à porosidade das membranas das extremidades das câmaras, pode ocorrer a troca de partículas entre o meio intracâmara e extracâmara. Após esterilização da câmara, o inóculo bacteriano foi cuidadosamente injetado no seu interior através de um orifício de cerca de 1 mm aberto na região proximal a uma das extremidades, o qual foi, então, selado utilizando-se o êmbolo da própria seringa derretida no bico de Bunsen como solda plástica. As câmaras assim preparadas foram então utilizadas para a implantação nos animais. Para isso, os animais foram anestesiados com ketamina (40mg/kg) e tiopental (80mg/kg) e submetidos a uma incisão de aproximadamente 15mm na linha média da parede abdominal, no caso de camundongos, ou 25mm, no caso de ratos, por onde foram introduzidas duas câmaras por animal. Posteriormente, peritônio e parede abdominal foram

suturados. Após 24 horas, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>, as cavidades peritoneais expostas e as câmaras retiradas. O conteúdo das câmaras foi removido por aspiração após perfuração de uma das membranas filtrantes, submetido a duas lavagens com “PBS” e preservado sob congelamento em freezer após extração de proteínas e até o momento de uso, no caso da análise por “SDS-PAGE”, ou imediatamente utilizado, no caso dos demais ensaios. Para esta última finalidade o inóculo foi ressuspenso em solução de NaCl a 0,9% (p/v). A concentração bacteriana foi determinada utilizando-se diluição decimal, semeadura em placas de agar sangue e incubação à 37°C por 24 horas para o inóculo recuperado de cada animal.

### **3.4.3. Crescimento *in vitro***

As cepas bacterianas foram cultivadas em agar sangue por cerca de 18 horas à 37°C e, posteriormente, em caldo THB à 37°C até atingirem turbidez equivalente à 0,4 DO<sub>540</sub> (1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml). Após duas lavagens com “PBS”, o inóculo foi preservado sob congelamento em freezer após extração de proteínas e até o momento de uso, no caso da análise por “SDS-PAGE”, ou imediatamente utilizado, no caso dos demais ensaios. Para esta última finalidade o inóculo foi ressuspenso em solução de NaCl a 0,9% (p/v). A concentração bacteriana foi determinada por diluição decimal, semeadura em placas de ágar sangue e incubação à 37°C por 24h.

### **3.4.4. Susceptibilidade à ação bactericida do sangue humano total fresco**

O protocolo descrito no item 3.3.5 foi empregado. O inóculo bacteriano foi diluído para 10<sup>4</sup> UFC/ml em solução de NaCl a 0,9% e, então, utilizado no ensaio. Foram realizados

dois ensaios independentes em duplicata com sangue coletados de dois doadores. Os dois foram do sexo feminino, sem infecção em curso conhecida e sem uso de medicação antimicrobiana ou anti-inflamatória nos 15 dias anteriores a coleta.

#### **3.4.5. Análise do perfil proteico total**

O protocolo descrito no item 3.3.6 foi empregado.

#### **3.4.5. Avaliação da patogenicidade bacteriana em modelo de sepse em animais**

##### A. Inóculo bacteriano

O inóculo bacteriano obtido a partir do cultivo *in vivo* ou *in vitro* ressuspenso em solução de NaCl a 0,9% foi utilizado no ensaio.

##### B. Animais

Foram utilizados camundongos linhagem Balb/c machos, adultos jovens com 3 a 4 semanas de vida, pesando de 25 - 30 gramas, e mantidos em caixas de polipropileno em condições padrão de água, alimentação e temperatura.

##### C. Infecção dos animais

Um volume de 100µl de inóculo bacteriano ( $10^7$  UFC) foi injetado via intraperitoneal em cada animal. Grupos de animais controle foram inoculados nas mesmas condições com solução da NaCl a 0,9%. Os animais foram analisados durante 6 dias consecutivos quanto à sobrevivência.

### **3.4.7. Análises estatísticas**

As diferenças no número de UFC foram analisadas utilizando o teste  $t$  bicaudal para cepas não pareadas. Nos ensaios de sepse a comparação dos tempos de sobrevivência foi realizada pelo teste de contingência  $X^2$  log-rank. O nível de significância de 95% foi utilizado para a hipótese nula ( $p$  superior a 0,05).

### **3.5. Aprovação no comitê de ética**

A realização de todos os ensaios envolvendo a utilização de animais foi aprovada pelo Comitê de Ética Animal do Centro de Ciências da Saúde, sob o número de protocolo IMPPG 010.

## **4. Resultados**

### **4.1. Caracterização de cepas de *S.agalactiae* de origem humana isoladas no estado do Rio de Janeiro em 2008 quanto à diversidade genética e à suscetibilidade aos antimicrobianos.**

#### **4.1.1. Confirmação da identificação fenotípica**

As 86 cepas analisadas no estudo apresentaram resultado positivo no teste para a detecção do fator CAMP bem como no teste para detecção da degradação do hipurato de sódio. Todas reagiram com o grupo B no teste de sorogrupagem. Assim, todas as cepas tiveram sua identificação confirmada.

#### **4.1.2. Análise do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos**

A fim de avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos em 86 cepas foi utilizada a técnica de difusão da droga em ágar a partir de discos. Foi detectada sensibilidade em todas as cepas à penicilina, vancomicina e levofloxacina. A resistência à clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, rifampicina e tetraciclina foi detectada em 17 (19,8%), 3 (3,5%), 14 (16,3%), 12 (13,9%) e 70 (81,4%) cepas, respectivamente. Na tabela 3 foram descritos o sítio de isolamento, local de isolamento e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de todas as cepas e na figura 1 foi representado o percentual de resistência e sensibilidade das cepas.

### 4.1.3. Análise da diversidade genética

Para a identificação dos padrões de DNA de cepas de *S. agalactiae* foi realizada a análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA, após digestão com a enzima de restrição *SmaI* e separação dos fragmentos gerados empregando-se PFGE. Conforme descrito em “Material e Métodos”, os perfis que apresentaram 100% de similaridade foram considerados indistinguíveis e os perfis que apresentaram similaridade superior a 80% foram considerados relacionados geneticamente e, então, alocados no mesmo padrão de polimorfismo.

Um subgrupo de 65 cepas foi aleatoriamente selecionado para a análise por PFGE. Quatro destas não foram passíveis de restrição pela endonuclease *SmaI*. Quanto aos sítios de isolamento das 61 cepas restantes, uma cepa foi isolada de infecção invasiva (sangue), três de infecção não invasiva (2 de urina e 1 de esperma) e 57 foram isoladas de portadores assintomáticos (52 de secreção vaginal de gestantes e 5 de orofaringe). Foram detectados 58 perfis eletroforéticos distintos e onze destes perfis foram agrupados, com base na sua similaridade, em seis padrões de polimorfismo. Os demais 47 perfis eletroforéticos foram singulares.

As cepas 08256 e 08270, resistentes à tetraciclina e isoladas de secreção vaginal no Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) e de orofaringe no Centro de Instrução Pára-quedista General Penha Brasil (CIPGPB), apresentaram perfis eletroforéticos indistinguíveis. As cepas 08282, 08283 e 08295 (resistentes à tetraciclina), isoladas de secreção vaginal no HNMD apresentaram perfis eletroforéticos indistinguíveis e com similaridade superior a 80% ao perfil detectado na cepa 08281, resistente à tetraciclina, também isolada de secreção vaginal no HNMD. As cepas 08194 (resistente à cefepime, clindamicina, rifampicina e tetraciclina) e 08259 (resistente à tetraciclina), isoladas de secreção vaginal no HNMD apresentaram perfis com similaridade superior a 80%. O mesmo aconteceu com as cepas 08192 e 08258, isoladas

de secreção vaginal no HNMD e com resistência e sensibilidade, respectivamente, à tetraciclina. As cepas 08247 e 08250, resistentes à tetraciclina, bem como 08184 e 08280, com resistência e sensibilidade à tetraciclina, respectivamente, e as 08023 e 08025, resistentes à tetraciclina, apresentaram relação genética. As seis últimas foram isoladas de secreção vaginal no HNMD.

## **4.2. Avaliação e comparação do potencial patogênico de cepas de *S. agalactiae* de origens bovina e humana**

### **4.2.1. Detecção de genes que codificam fatores associados à virulência**

A presença dos genes *hylB*, *bac*, *bca* e *lmb*, associados à virulência de *S. agalactiae*, foi analisada em reações de PCR multiplex que continham adicionalmente iniciadores para a detecção dos genes *stp* ou *stk*. Além dos controles positivos, os genes *hylB* e *lmb* foram detectados nas quatro cepas testadas (80427, humana; 87159, bovina; 87244, bovina; 90356, humana). Os genes *bac* e *bca* foram detectados exclusivamente nas cepas 80427 e 90356, respectivamente. Os dados foram apresentados na tabela 4. A figura 3 apresenta um gel representativo da detecção dos amplicons em gel de eletroforese.

### **4.2.2. Adesão e invasão à cultura de células 16HBe**

Com o objetivo de analisar a capacidade de adesão e invasão à monocamada de células 16HBe, foram realizados três ensaios independentes em quadruplicata com cada uma das cepas. Para todas as cepas, inóculos que variaram de  $1,7 \times 10^6$  UFC/ml a  $9,2 \times 10^6$  UFC/ml foram adicionados à monocamada de células em cada um dos ensaios.

Para a cepa de origem humana 80427, resultados que variaram de 21% a 34% de adesão foram observados, com a média de 26,67 % (E. P. M.  $\pm$  3,84). Para a cepa bovina 87159, relacionada geneticamente à cepa 80427, a adesão variou entre 12% e 57%, com a média de 36,33% (E. P. M.  $\pm$  13,12). Para as cepas controle de origens bovina e humana 87244 e 90356, valores entre 18% e 37%, com média de 27,33% (E. P. M.  $\pm$  5,49) e entre 27% e 87%, com média de 67% (E. P. M.  $\pm$  20,00), respectivamente, foram detectados. Utilizando teste *t* bicaudal para cepas não pareadas foi verificado que em relação ao percentual de aderência não houve diferença significativa entre as cepas. Os dados estão apresentados na figura 4A.

Baixas porcentagens de invasão foram observadas nos experimentos para as cepas 80427 [entre 0 e 0,005%, média 0,002% (E. P. M.  $\pm$  0.0015)], 87159 [entre 0,001 a 0,1%, média 0,034% (E. P. M.  $\pm$  0,032)] e 90365 [entre 0 e 0,002%, média 0,001% (E. P. M.  $\pm$  0,001)]. Para a cepa 87244 não foi detectada invasão. Utilizando teste *t* bicaudal para cepas não pareadas não foi verificado diferença significativa entre as cepas. Os dados estão apresentados na figura 4B.

#### **4.2.3. Sobrevivência intracelular em macrófagos de murinos**

Com o objetivo de analisar a sobrevivência bacteriana intracelular em macrófagos peritoniais de camundongos, foram realizados três ensaios independentes, em triplicata, com cada uma das cepas. Para todas as cepas, inóculos que variaram de  $1,1 \times 10^6$  UFC/ml a  $6,3 \times 10^6$  UFC/ml foram adicionados à monocamada de macrófagos em cada um dos ensaios. Após as incubações para a aderência e invasão aos macrófagos (item 3.3.4, Material e Métodos), a contagem média do tempo zero para as cepas 80427 (humana), 87159 (bovina), 87244 (bovina) e 90356 (humana) foi de  $2,6 \times 10^4$  UFC/ml,  $3,8 \times 10^4$  UFC/ml,  $3,5 \times 10^4$  UFC/ml e

1,5 x 10<sup>4</sup> UFC/ml , respectivamente.

A sobrevivência intracelular nos macrófagos após duas horas para a cepa 80427 foi em média 10% (E. P. M. ± 4,04), enquanto para 87159 foi observada uma sobrevivência média de 13,3% (E. P. M. ± 2,40). Para as cepas 87244 e 90356 foram detectados valores de 21,3% (E. P. M. ± 13,3) e 11,6% (E. P. M. ± 3,18), respectivamente.

A sobrevivência intracelular nos macrófagos após quatro horas para a cepa 80427 foi em média 1,3% (E. P. M. ± 0,67), enquanto para 87159 foi observada uma sobrevivência média de 8,3% (E. P. M. ± 5,84). Para as cepas 87244 e 90356 foram detectados valores de 5,4% (E. P. M. ± 1,91) e 0,67% (E. P. M. ± 0,67), respectivamente.

A sobrevivência intracelular nos macrófagos após seis horas para a cepa 80427 foi em média 0,4% (E. P. M. ± 0,4), enquanto para 87159 foi observada uma sobrevivência média de 0,9% (E. P. M. ± 0,9). Para as cepas 87244 e 90356 foram detectados valores de 0,8% (E. P. M. ± 0,8) e 0,4% (E. P. M. ± 0,4), respectivamente. Utilizando teste *t* bicaudal para cepas não pareadas não foi verificado diferença significativa entre as cepas. Os dados estão apresentados na figura 5.

#### **4.2.4. Susceptibilidade à ação bactericida do sangue humano total fresco**

Com o intuito de avaliar a capacidade de sobrevivência bacteriana à ação bactericida do sangue total humano fresco, foram realizados dois ensaios independentes com cada um dos quatro doadores de sangue. Para a cepa 80427 foi observado um índice de mortalidade médio de 98,5% (E. P. M. ± 0,50), enquanto para a cepa 87159 foi encontrado um valor de 93,5% de morte (E. P. M. ± 1,94). As cepas 87244 e 90356 tiveram valores médios de mortalidade de 92,2% (E. P. M. ± 2,35) e 97,5 % (E. P. M. ± 1,08), respectivamente. Os valores obtidos acima foram analisados empregando-se o teste ANOVA “one way”, sendo

verificada diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,03$ ). Utilizando-se o teste  $t$  bicaudal para cepas não pareadas, foi verificada uma diferença significativa entre as cepas 80427 e 87159 ( $p = 0,03$ ) e 80427 e 87244 ( $p = 0,02$ ), mas não para as demais combinações de cepas. Os dados estão apresentados na figura 6.

#### **4.2.5. Análise do perfil proteico total das cepas de *S. agalactiae***

A análise do perfil protéico total das cepas, após crescimento em meio THB até a fase logarítmica de crescimento, pelo método de SDS-PAGE, não evidenciou diferenças no perfil de proteínas totais entre as cepas. Os perfis eletroforéticos obtidos podem ser observados na figura 7.

#### **4.2.6. Avaliação da patogenicidade bacteriana em modelo de sepse em animais**

A patogenicidade das cepas de *S. agalactiae in vivo* foi avaliada utilizando-se o modelo de sepse experimental em camundongos neonatos com 4 ou 8 dias de vida. A virulência bacteriana foi mensurada a partir da avaliação da capacidade bacteriana em causar a morte dos animais durante o período de 6 dias de ensaio experimental.

Para os animais com 4 dias de vida foram realizados de dois a cinco ensaios independentes para cada cepa de *S. agalactiae*, totalizando 34 animais para a cepa 80427, 30 para a cepa 87159, 11 para cepa 87244 e 22 para a cepa 90356, excetuando-se os animais controle. As duas cepas de origem humana, 80427 e 90356, bem como a cepa isolada de mastite bovina 87159, relacionada geneticamente à cepa 80427, mostraram-se virulentas para os camundongos. A cepa de origem bovina 87244, não relacionada geneticamente às demais, não causou a morte de nenhum animal e foi, por isto, classificada como avirulenta. Todos os

animais utilizados como controle, inoculados com solução de NaCl a 0,9% estéril, sobreviveram sem complicações durante a realização dos ensaios.

Quanto à análise estatística dos dados, comparando-se os tempos de sobrevivência pelo teste de contingência ( $X^2$  log-rank) foi observada diferença significativa entre as curvas de sobrevivência dos animais infectados com as cepas, 80427 e 87159 ( $p = 0,0005$ ), 80427 e 87244 ( $p < 0,0001$ ), 87159 e 87244 ( $p < 0,0001$ ), 87159 e 90356 ( $p < 0,0001$ ), 87244 e 90356 ( $p < 0,0001$ ). As curvas de sobrevivência foram apresentadas na figura 8.

Para os animais com 8 dias de vida foram realizados dois ensaios para cada cepa, totalizando 12 animais para a cepa 80427, 12 para a cepa 87159, 14 para cepa 87244 e 11 para a cepa 90356, excetuando-se os animais controle. As cepas 87159 e 90356 mostraram-se virulentas, enquanto a outra cepa de origem bovina, 87244, não relacionada geneticamente às demais, não causou a morte de nenhum animal e foi, por isto, classificada como avirulenta. A cepa 80427 causou a morte de um único animal no sexto (último) dia de avaliação da sobrevivência. Todos os animais utilizados como controle, inoculados com solução de NaCl a 0,9% estéril, sobreviveram sem complicações durante a realização dos ensaios

Quanto à análise estatística dos dados, comparando-se os tempos de sobrevivência pelo teste de contingência ( $X^2$  log-rank), foi observada diferença significativa entre curvas de sobrevivência dos animais infectados com as cepas 80427 e 87159 ( $p < 0,0001$ ), 80427 e 90356 ( $p < 0,0001$ ), 87159 e 87244 ( $p < 0,0001$ ), 87159 e 90356 ( $p = 0,0007$ ) e 87244 e 90356 ( $p < 0,0001$ ). As curvas de sobrevivência foram apresentadas na figura 9.

Uma outra comparação foi realizada através do teste de contingência ( $X^2$  log-rank), avaliando-se as curvas de sobrevivência para animais com 4 ou 8 dias infectados com as diferentes cepas. Os dados evidenciaram uma diferença significativa entre as curvas geradas após a infecção com a cepa 80427 ( $p < 0,001$ ), mas não para as demais cepas.

### **4.3. Avaliação da influência do ambiente *in vivo* na patogenicidade de *S. agalactiae*.**

#### **4.3.1. Cultivo *in vivo***

O sistema de câmara contendo inóculo bacteriano em meio 199 utilizado neste experimento pode ser visualizado na figura 10. A introdução da câmara na cavidade peritoneal de camundongos adultos Balb/c pode ser observada na figura 11. Em todos os animais analisados, observou-se que, durante o ensaio, a câmara permaneceu localizada entre as alças intestinais e houve a formação de um tecido aderente associado às membranas nas extremidades da câmara, área de troca com o meio devido à porosidade da membrana, mas não ao seu corpo. Este tecido pode ser observado na figura 12. Após a sua remoção, foi observada a alteração da coloração do meio de cultivo, de rosa para amarelado, o que pode ser observado na figura 13. A coloração amarelada também foi observada no conteúdo de câmaras preenchidas com inóculo bacteriano diluído em solução de NaCl a 0,9% (dados não mostrados).

Em ensaios preliminares foi verificado que as cepas 80427 e 90356 atingiam cerca de  $10^8$  UFC/ml dentro da câmara após 24 horas da sua implantação no peritônio. Em todos os ensaios o inóculo bacteriano removido das câmaras, após o implante nos camundongos durante 24 horas, foi submetido à determinação do número de UFC a fim de verificar a concentração bacteriana obtida bem como a sua viabilidade.

#### **4.3.2. Susceptibilidade à ação bactericida do sangue humano total fresco**

Com o intuito de avaliar a sobrevivência bacteriana à ação bactericida do sangue total humano fresco após o crescimento dos microrganismos em ambientes *in vitro* e *in vivo*, foram

realizados dois ensaios independentes em duplicata com sangue coletado de dois doadores.

Para a cepa 80427 cultivada *in vivo* e *in vitro*, foram detectados valores entre 96,3% e 100 % de morte bacteriana, com média de 98,6% (E. M. P.  $\pm$  0,8) e entre 98,3% e 100%, com média de 99,4% de morte (E. M. P.  $\pm$  0,4), respectivamente. Para a cepa 90356, valores entre 94,5% e 100% de morte bacteriana, com média de 98,2% (E. M. P.  $\pm$  1,2) e entre 85,4% e 100%, com média de 94,7% (E. M. P.  $\pm$  3,5) foram detectados quando do crescimento *in vivo* e *in vitro*, respectivamente.

A análise estatística dos dados utilizando o teste *t* bicaudal para cepas não pareadas demonstrou não haver diferença entre o cultivo *in vivo* e *in vitro* das cepas 80427 e 90356. Também não houve diferença entre as cepas cultivadas *in vivo* ou *in vitro* e entre as cepas 80427 cultivada *in vivo* e 90356 cultivada *in vitro*, e 80427 cultivada *in vitro* e 90356 cultivada *in vivo*. Os dados estão representados na figura 14.

#### **4.3.3. Análise do perfil protéico total**

Apenas a cepa 90356 foi analisada quanto ao perfil proteico total por SDS-PAGE, após cultivo em meio THB até a fase logarítmica de crescimento (de 3 a 4 horas a 37°C) e *in vivo* por 24 horas. Foram detectadas diferenças no perfil de proteínas entre as cepas, avaliada visualmente pela presença e localização das bandas no gel. Os perfis eletroforéticos obtidos podem ser observados na figura 15.

#### **4.3.4. Avaliação da patogenicidade bacteriana em modelo de sepse em animais**

A patogenicidade das cepas 80427 e 90356 foi avaliada, ainda, utilizando-se o modelo de sepse experimental em camundongos adultos. A virulência bacteriana foi mensurada a

partir da avaliação da capacidade em causar a morte dos animais. Foram realizados quatro e três ensaios independentes de sepse em camundongos adultos jovens para as cepas 90356 e 80427, respectivamente. Foram utilizados 24 animais para a cepa 90356 cultivada *in vivo*, 25 para a cepa 90356 cultivada *in vitro*, 24 para a cepa 80427 cultivada *in vivo* e 24 para a cepa 80427 cultivada *in vitro* excetuando-se os animais controle. Todos os animais utilizados como controle, inoculados com solução de NaCl a 0,9% estéril, sobreviveram sem complicações durante a realização dos ensaios.

Foi verificado que a cepa 90356, independentemente do modo de cultivo *in vivo* ou *in vitro*, causou a morte de animais. Entretanto, a redução na sobrevivência foi maior quando o inóculo bacteriano foi crescido previamente em câmaras intraperitoneais por 24 horas. Foi observada a sobrevivência de 25% (E. M. P.  $\pm$  5,1) dos animais infectados com a cepa 90356 cultivada *in vitro* e a sobrevivência de 76% (E. M. P.  $\pm$  15,6) dos animais infectados com a cepa 90356 cultivada *in vivo* ao final de seis dias de ensaio. Foi observada a sobrevivência de 95,7% (E. M. P.  $\pm$  4,2) e 100% dos animais infectados com a cepa 80427 cultivada *in vivo* ou *in vitro*, respectivamente.

Quanto à análise estatística dos dados, comparando-se os tempos de sobrevivência pelo teste de contingência ( $X^2$  log-rank) foi observada diferença significativa entre as curvas de sobrevivência dos animais infectados com a cepa 90356 cultivada *in vivo* ou *in vitro* ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferença significativa entre as curvas de sobrevivência dos animais infectados com a cepa 80427 cultivada *in vivo* ou *in vitro*. As curvas de sobrevivência estão apresentadas na figura 16.

**Tabela 3:** Sítio de isolamento, local de isolamento e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de 86 cepas de *S. agalactiae* de origem humana isoladas no estado do Rio de Janeiro em 2008.

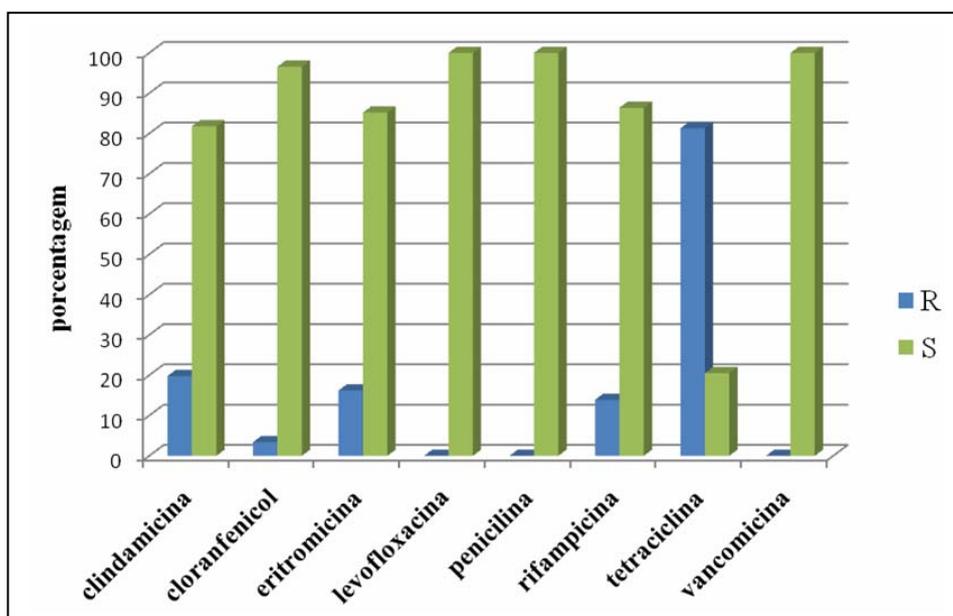
Cepa	Sítio de isolamento	Local de Isolamento	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos							
			cli	clo	eri	lev	pen	rif	tet	van
08011	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08012	Secreção vaginal	HNMD	R	S	R	S	S	R	R	S
08013	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	S	S
08014	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08015	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08016	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08019	Secreção vaginal	HNMD	R	S	R	S	S	S	R	S
08020	Secreção vaginal	HNMD	R	S	R	S	S	S	R	S
08021	Secreção vaginal	HNMD	R	S	R	S	S	S	S	S
02022	Secreção vaginal	HNMD	R	S	S	S	S	R	R	S
08023	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08024	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08025	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08026	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	S	S
08027	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08028	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08029	Secreção vaginal	HNMD	R	S	R	S	S	R	R	S
08103	Secreção vaginal	HNMD	R	R	R	S	S	S	R	S
08104	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	S	S
08105	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S

Cepa	Sítio de isolamento	Local de Isolamento	cli	clo	eri	lev	pen	rif	tet	Van
08106	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	S	S
08107	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08108	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08109	Secreção vaginal	HNMD	R	S	R	S	S	R	R	S
08113	Orofaringe	CIPGPB	S	S	S	S	S	S	R	S
08121	Orofaringe	CIPGPB	S	S	S	S	S	S	S	S
08184	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08185	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08186	Secreção vaginal	HNMD	R	S	S	S	S	R	S	S
08187	Esperma	HNMD	S	S	S	S	S	S	S	S
08190	Secreção vaginal	HNMD	S	R	S	S	S	S	R	S
08191	Secreção vaginal	HNMD	R	S	S	S	S	R	S	S
08192	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08193	Secreção vaginal	HNMD	R	S	R	S	S	R	R	S
08194	Secreção vaginal	HNMD	R	S	S	S	S	R	R	S
08196	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08197	Secreção vaginal	HNMD	R	S	R	S	S	R	R	S
08198	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	S	S
08199	Sangue	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08200	Urina	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08201	Urina	HNMD	S	S	S	S	S	R	R	S
08202	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08203	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08204	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S

Cepa	Sítio de isolamento	Local de Isolamento	cli	clo	eri	lev	pen	rif	tet	Van
08206	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08207	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	S	S
08208	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	S	S
08209	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08210	Secreção vaginal	HNMD	R	S	R	S	S	R	R	S
08245	Secreção vaginal	HNMD	R	S	R	S	S	S	R	S
08246	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08247	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08250	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08251	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08252	Secreção vaginal	HNMD	S	S	R	S	S	S	R	S
08253	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08254	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08255	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08256	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08257	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	S	S
08258	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	S	S
08259	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08261	Secreção vaginal	HNMD	S	R	S	S	S	R	R	S
08262	Secreção vaginal	HNMD	R	S	R	S	S	S	R	S
08263	Orofaringe	CIPGPB	S	S	S	S	S	S	R	S
08270	Orofaringe	CIPGPB	S	S	S	S	S	S	R	S
08271	Orofaringe	CIPGPB	S	S	S	S	S	S	R	S
08272	Orofaringe	CIPGPB	S	S	S	S	S	S	R	S

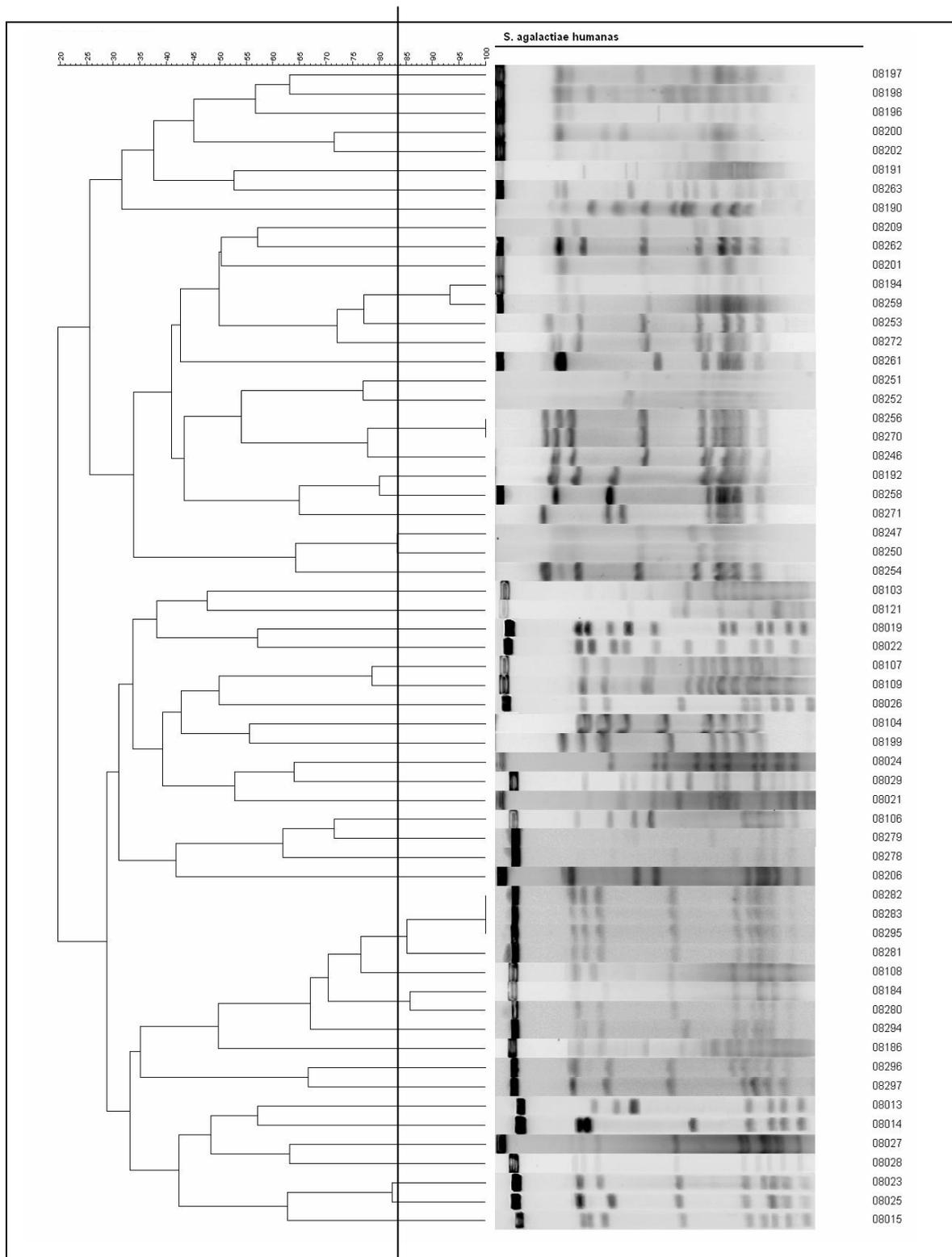
Cepa	Sítio de isolamento	Local de Isolamento	cli	clo	eri	lev	pen	rif	tet	Van
08278	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	S	S
08279	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08280	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	S	S
08281	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08282	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08283	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08285	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08286	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08287	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08288	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08289	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08290	Secreção vaginal	HNMD	R	S	R	S	S	S	R	S
08291	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08292	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08294	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08295	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08299	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S
08300	Secreção vaginal	HNMD	S	S	S	S	S	S	R	S

HNMD, Hospital Naval Marcílio Dias; CIPGPB, Centro de Instrução Pára-quedista General Penha Brasil; cli, clindamicina; clo, cloranfenicol; eri, eritromicina; lev, levofloxacina; pen, penicilina; rif, rifampicina; tet, tetraciclina; van, vancomicina; R, resistência; S, sensibilidade.

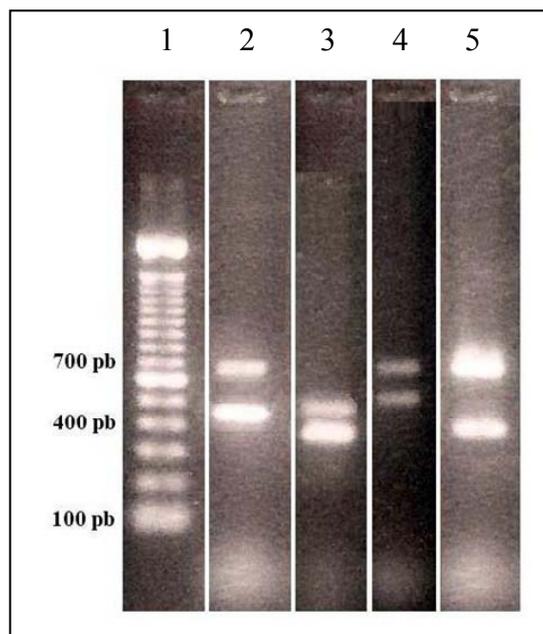


**Figura 1:** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de 86 cepas de *S. agalactiae*

R, resistência; S, sensibilidade.



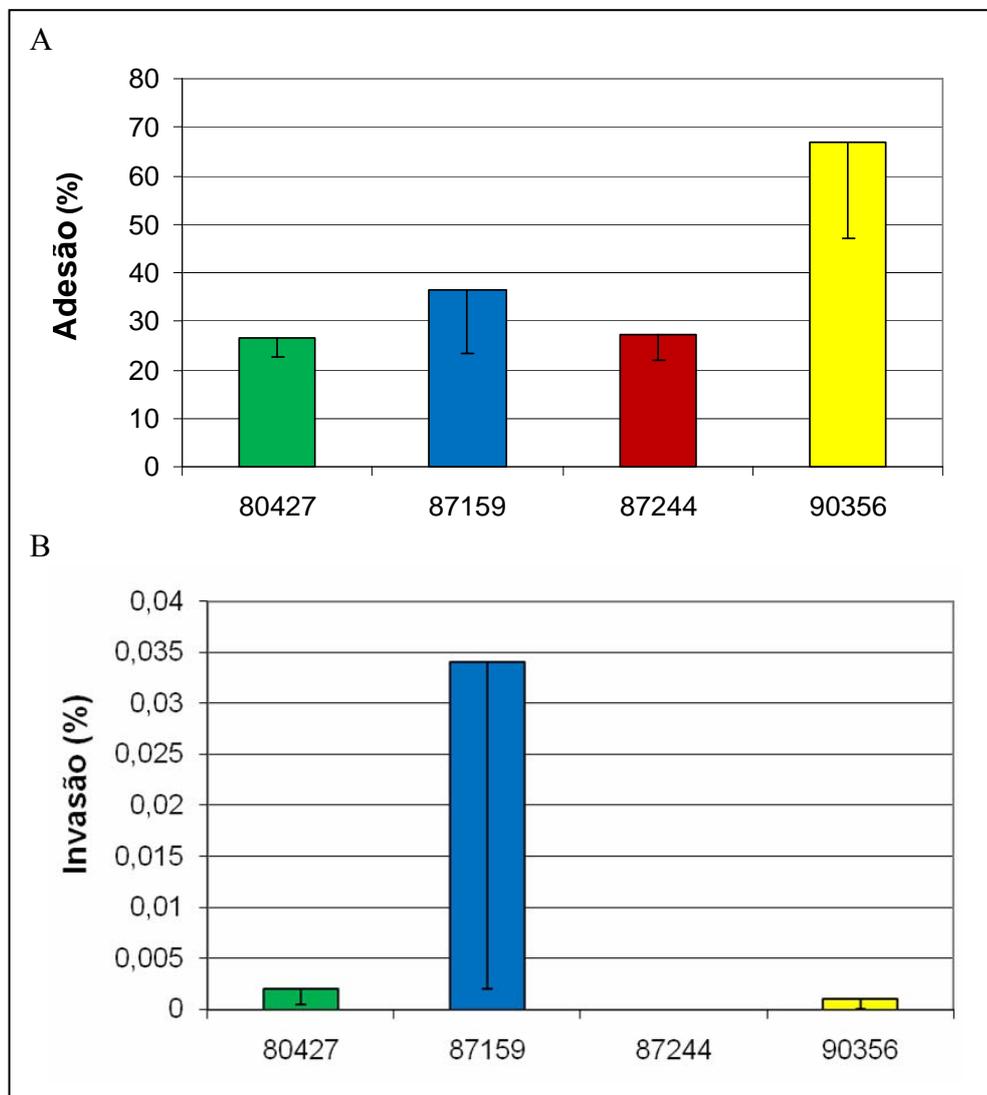
**Figura 2:** Dendrograma construído a partir da análise de similaridade e “clustering”, utilizando coeficiente Dice e UPGMA da imagem digitalizada dos perfis eletroforéticos de 61 cepas de *S. agalactiae*, obtidos empregando-se “PFGE”. Foi empregada a tolerância de 1%. A linha vertical marca o nível de similaridade em 80%.



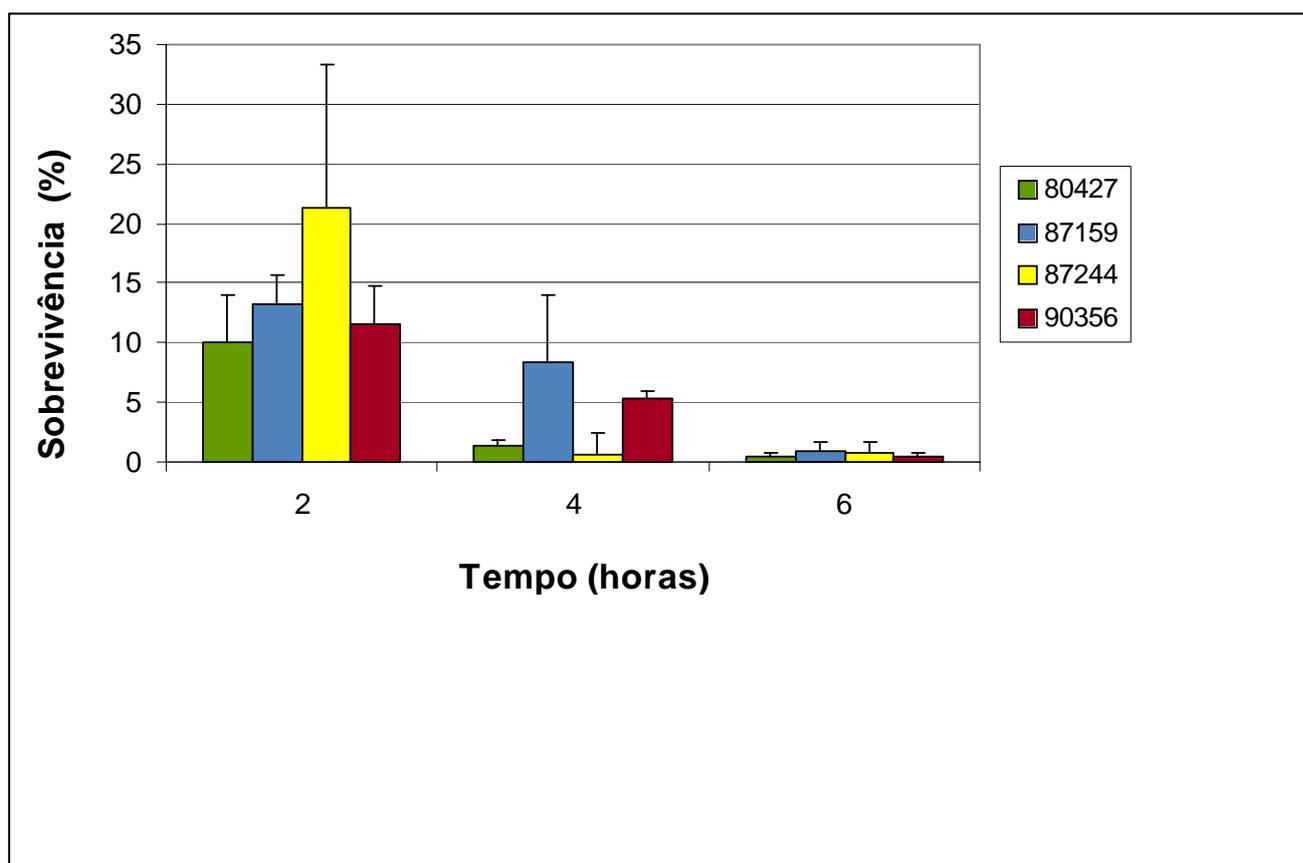
**Figura 3:** Gel representativo da detecção dos genes *hylB*, *lmb*, *bac*, e *bca*, que codificam fatores associados à virulência, e dos genes *stk* e *stp*, que codificam genes metabólicos de *S. agalactiae*. Canaleta 1, padrão de tamanho de DNA 100pb (Invitrogen); canaleta 2, 80427, serina treonina quinase (*stk*, 639pb) e proteína ligadora de laminina (*lmb*, 413pb); canaleta 3, 80427, proteína beta (*bac*, 479pb) e serina treonina fosfatase (*stp*, 327 pb); canaleta 4, 80427, hialuronidase (*hylB*, 444pb) e serina treonina quinase (*stk*, 639pb); canaleta 5, 90356, proteína alfa (*bca*, 376pb) e serina treonina quinase (*stk*, 639pb).

Genes						
Cepa	<i>stp</i>	<i>stk</i>	<i>bca</i>	<i>bac</i>	<i>lmb</i>	<i>hylB</i>
80427	+	+	-	+	+	+
87159	+	+	-	-	+	+
87244	+	+	-	-	+	+
90356	+	+	+	-	+	+

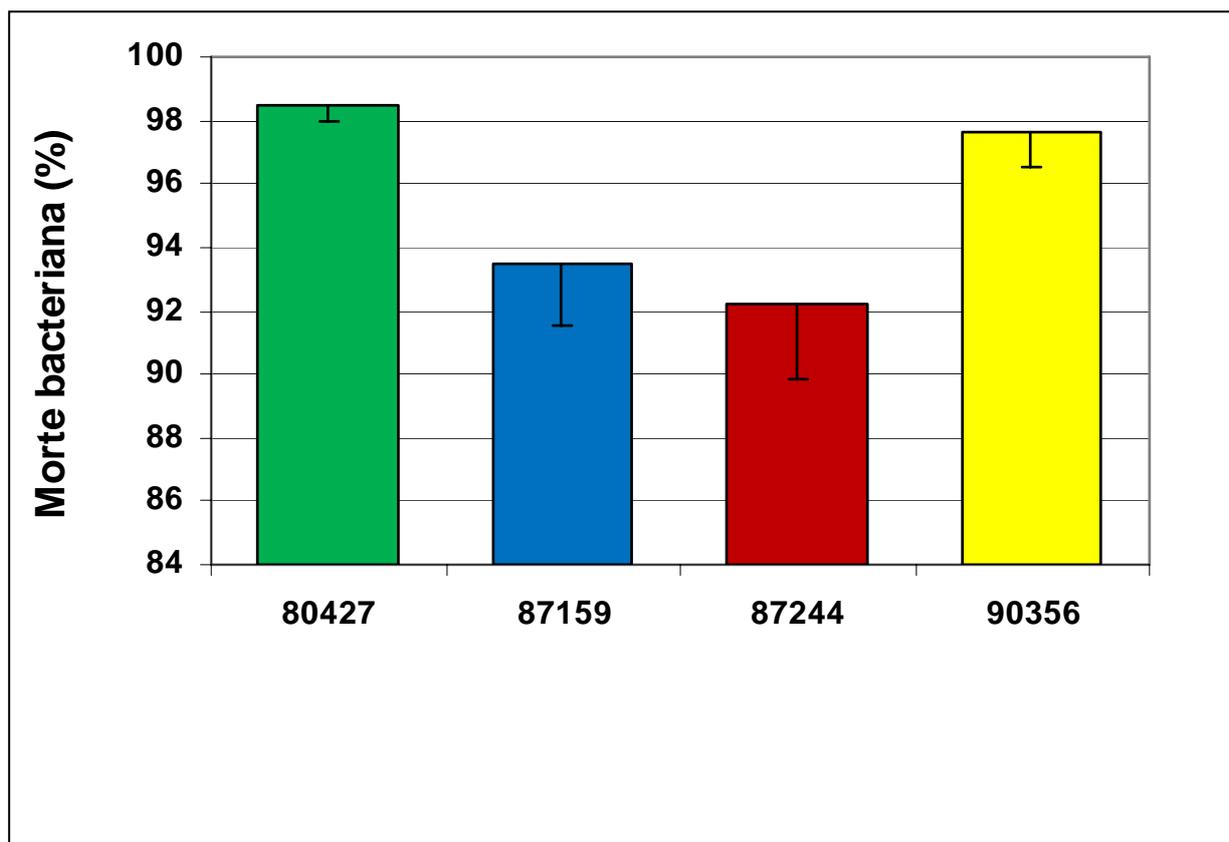
**Tabela 4:** Detecção dos genes *hylB*, *lmb*, *bac*, e *bca*, que codificam fatores associados à virulência, e dos genes *stk* e *stp*, que codificam genes metabólicos de *S. agalactiae*. +, positivo; -, negativo; *stp*, serina treonina fosfatase; *stk*, serina treonina quinase; *bca*, proteína alfa; *bac*, proteína beta, *lmb*, proteína ligadora de laminina; *hylB*, hialuronidase. 80427, origem humana; 87159, bovina; 87244, bovina; 90356, humana.



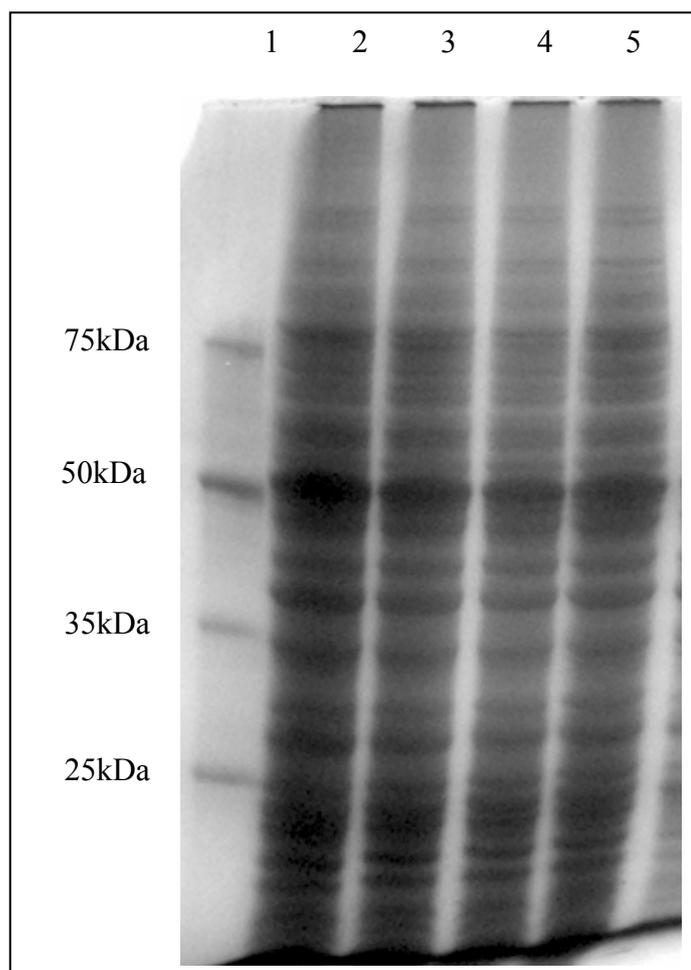
**Figura 4:** Adesão e invasão de *S. agalactiae* a células 16HBe. 4A. Adesão (em porcentagem) a células 16HBe. 4B. Invasão (em porcentagem) a células 16HBe. As caixas representam a média de três ensaios independentes em quadruplicata e as hastes representam o E. M. P. 80427, origem humana; 87159, bovina; 87244, bovina; 90356, humana.



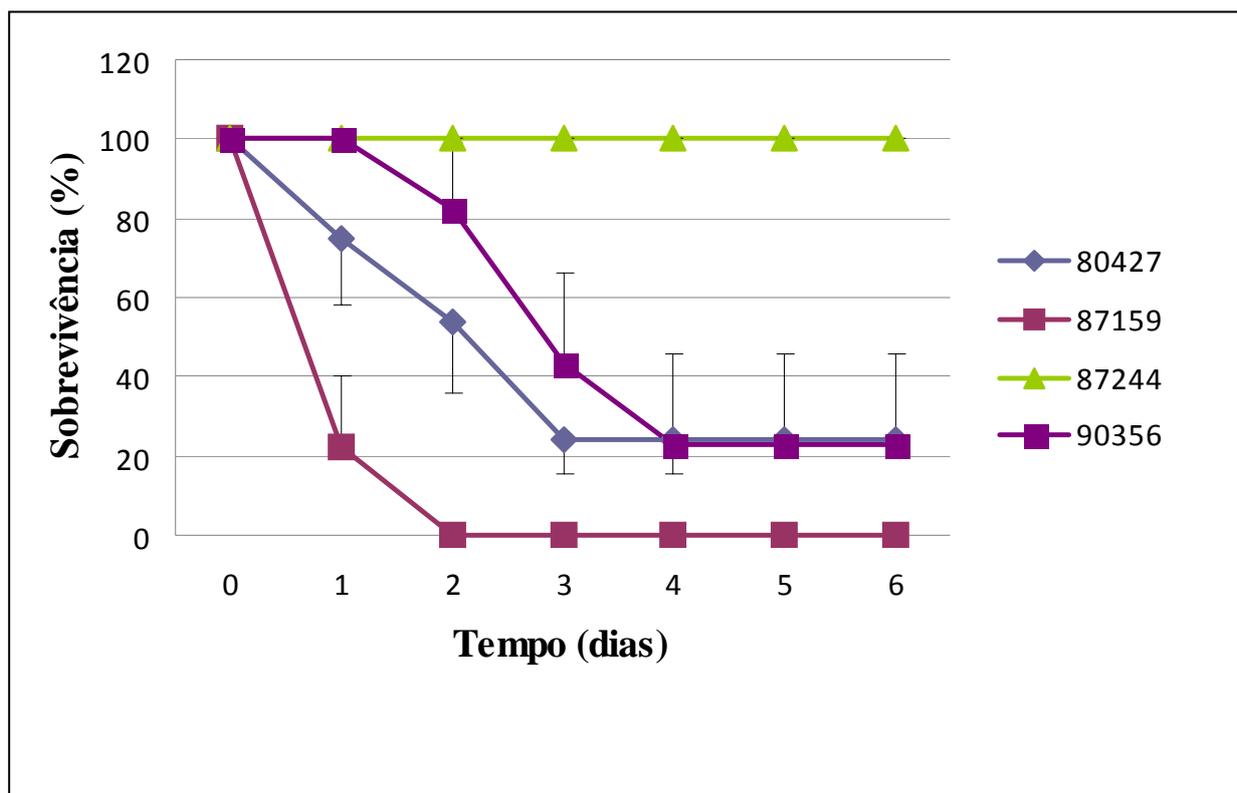
**Figura 5:** Sobrevivência intracelular de *S. agalactiae* em macrófagos murinos estimulados pela presença de tioglicolato a 10%. As caixas representam a média em porcentagem de três ensaios independentes em quadruplicata e as hastes representam o E. M. P. 80427, origem humana; 87159, bovina; 87244, bovina; 90356, humana.



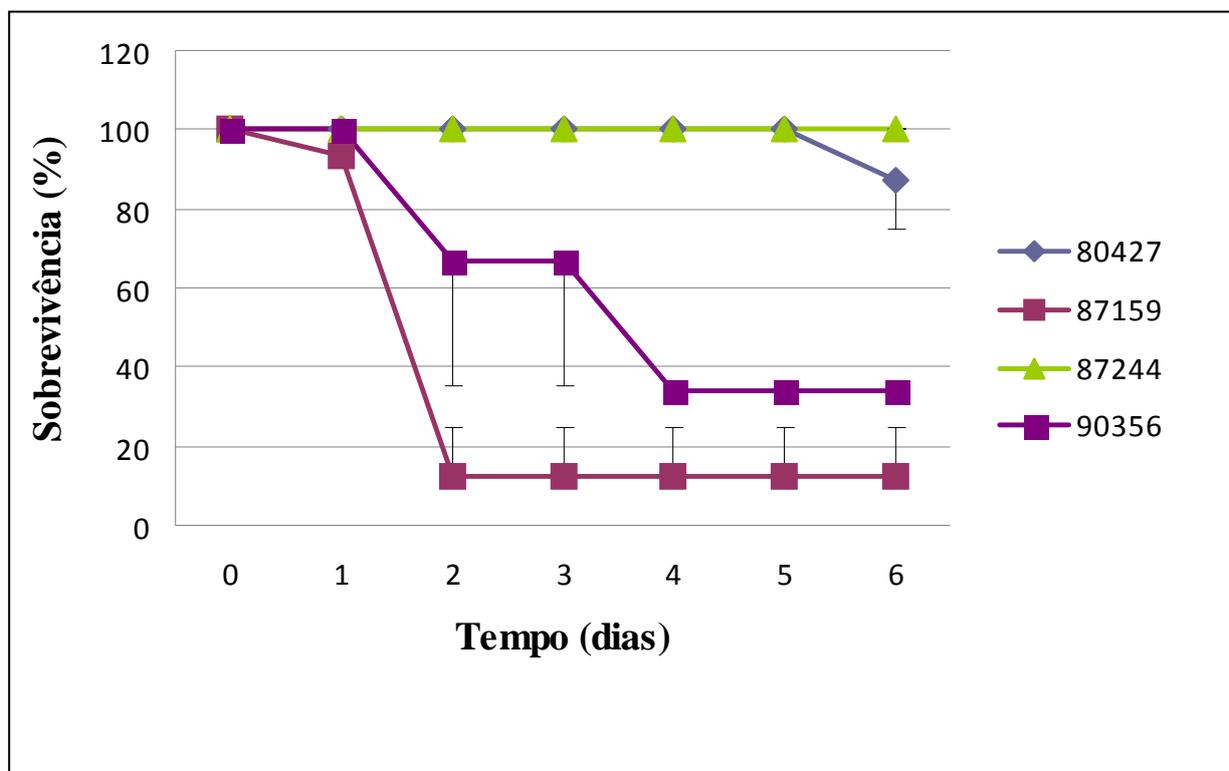
**Figura 6:** Capacidade de sobrevivência de *S. agalactiae* à ação bactericida do sangue total humano fresco. As caixas representam a média de dois ensaios independentes em porcentagem, cada um realizado com quatro doadores de sangue e as hastes representam o E. M. P. 80427, origem humana; 87159, bovina; 87244, bovina; 90356, humana.



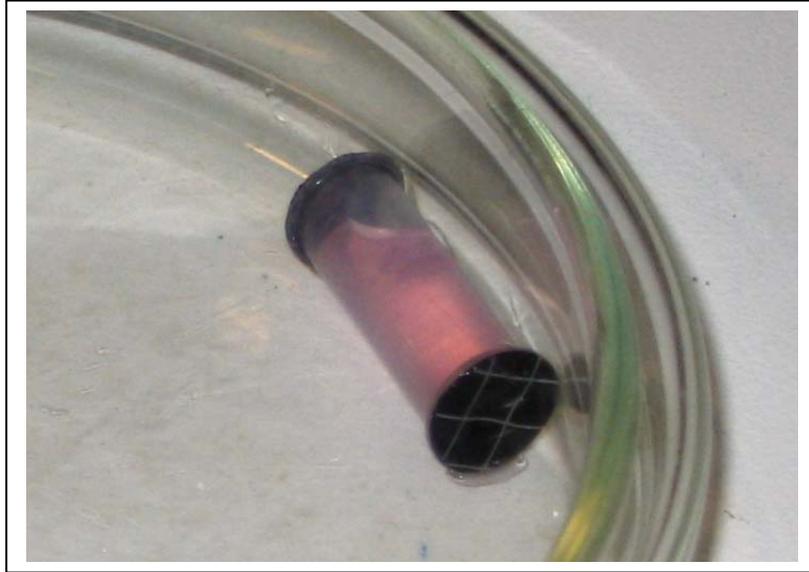
**Figura 7:** Análise do perfil protéico total de *S. agalactiae* empregando a técnica “SDS-PAGE”. Canaleta 1, padrão de tamanho molecular “Broad Range Protein Molecular Marker” (Promega); canaleta 2, 80427; canaleta 3, 87159; canaleta 4, 87244; canaleta 5, 90356.



**Figura 8:** Avaliação da patogenicidade de *S. agalactiae* em modelo de sepse em animais com 4 dias de vida. Curvas construídas a partir da média (em porcentagem) de ao menos 2 ensaios independentes com cada uma das cepas analisadas. As hastes representam o E. M. P. 80427, origem humana; 87159, bovina; 87244, bovina; 90356, humana.



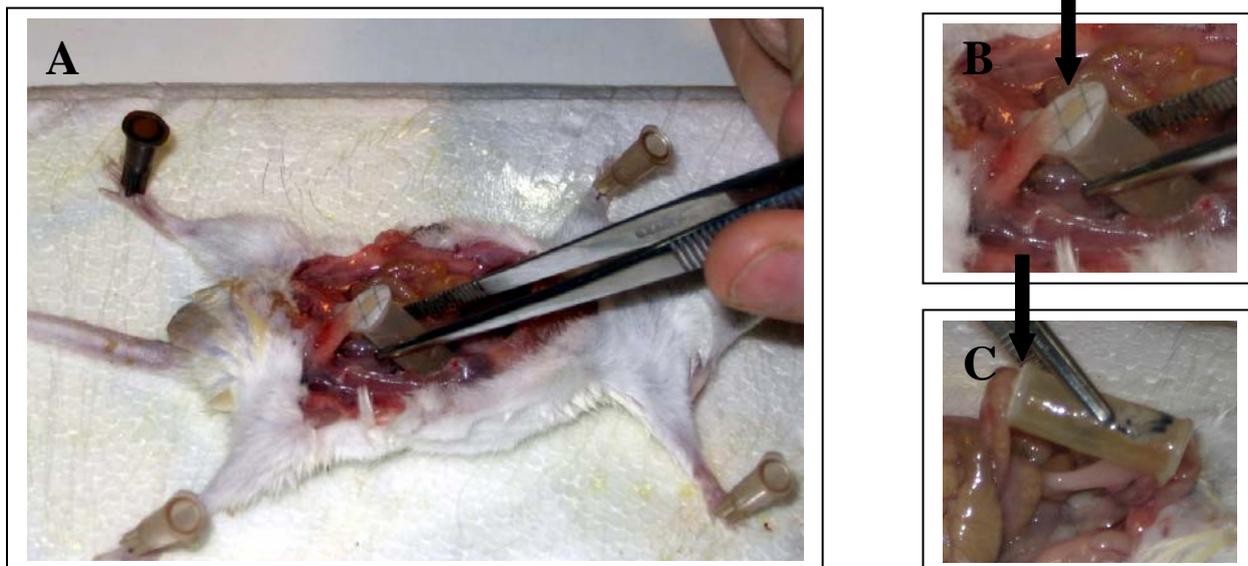
**Figura 9:** Avaliação da patogenicidade de *S. agalactiae* em modelo de sepse em animais com 8 dias de vida. Curvas construídas a partir da média (em porcentagem) de 2 ensaios independentes com cada uma das cepas analisadas. As hastes representam o E. M. P. 80427, origem humana; 87159, bovina; 87244, bovina; 90356, humana.



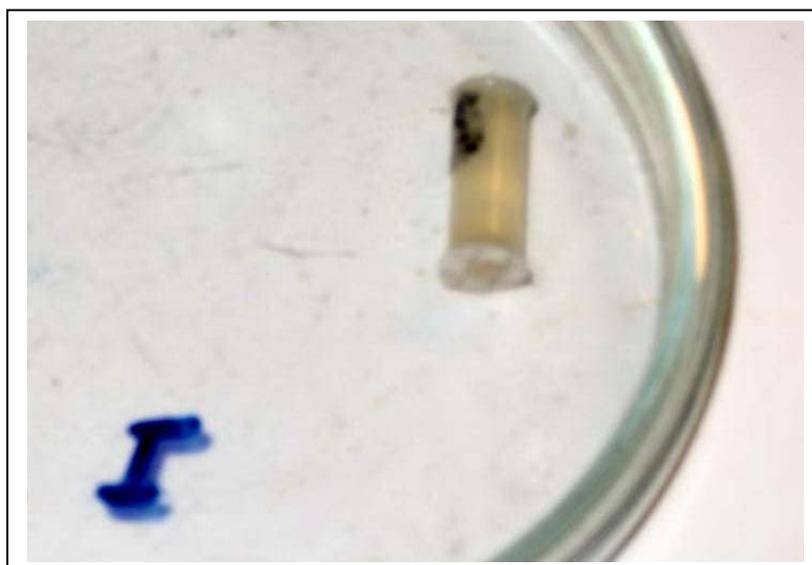
**Figura 10:** Câmara construída a partir do corpo de seringa, contendo inóculo bacteriano diluído no meio 199 e inserido por orifício, que foi, posteriormente à inoculação, selado com solda plástica.



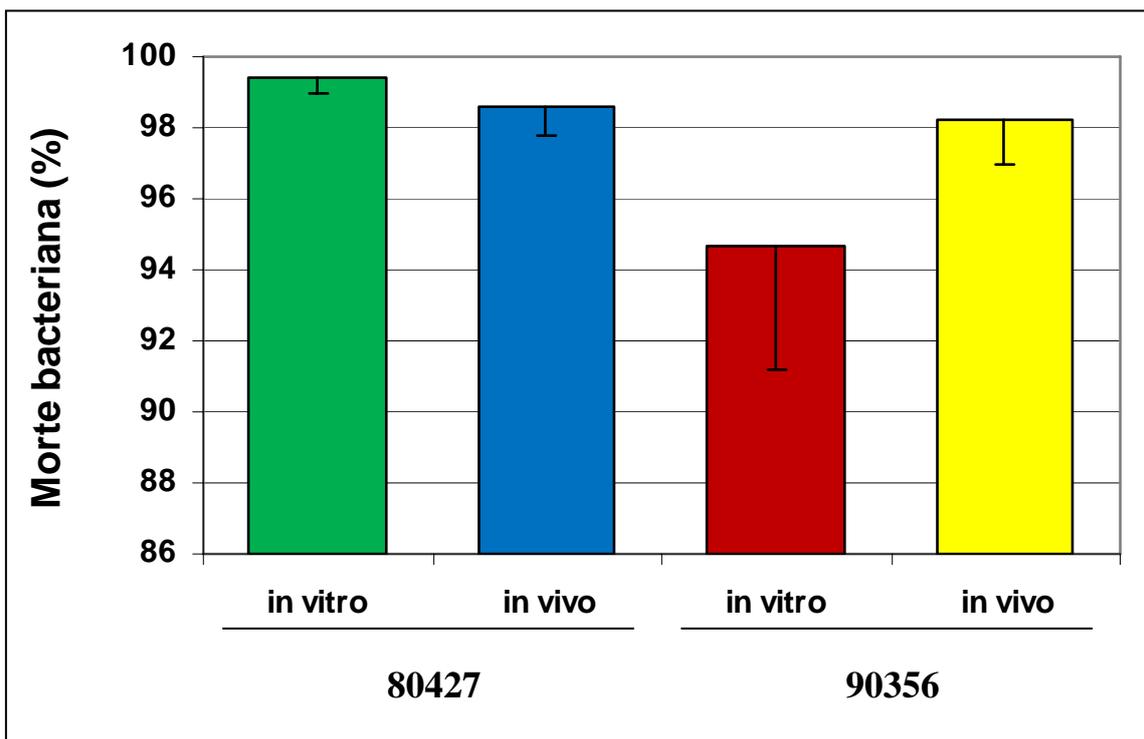
**Figura 11:** Implante cirúrgico da câmara na cavidade peritoneal de um camundongo.



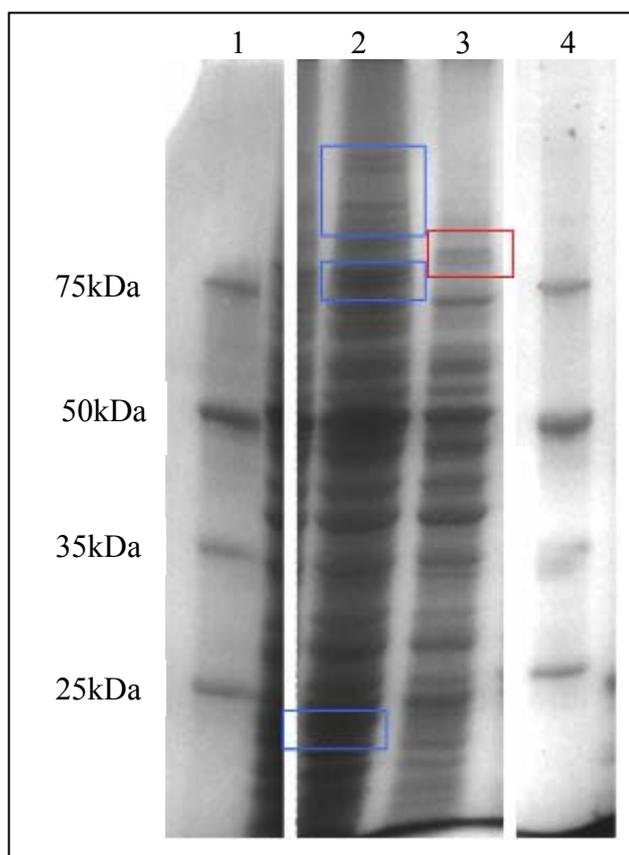
**Figura 12:** Remoção cirúrgica da câmara após 24 horas na cavidade peritoneal do animal A, formação de tecido aderente às membranas das extremidades da câmara, mas não ao seu corpo; B, aproximação da foto A; C, formação do tecido em outro animal, sob as mesmas condições experimentais. O tecido aderente foi indicado nas fotos por setas.



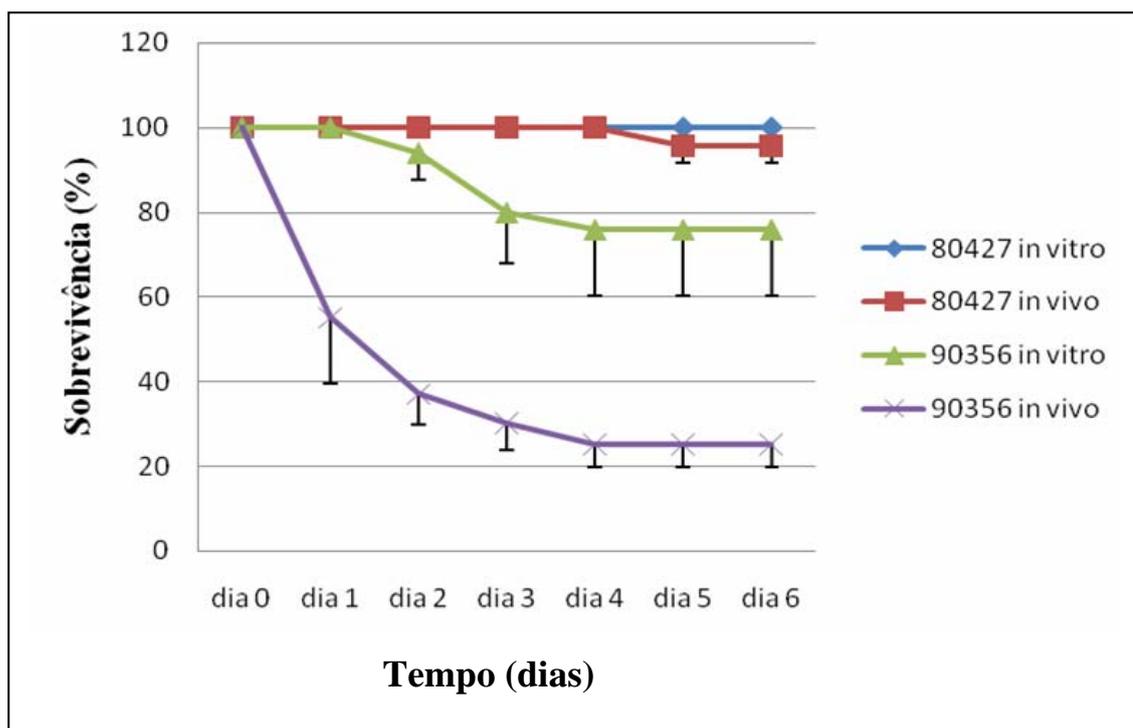
**Figura 13:** Câmara após 24 horas dentro da cavidade peritoneal de um camundongo, evidenciando a coloração amarelada do meio.



**Figura 14:** Sobrevivência de *S. agalactiae* à ação bactericida do sangue total humano fresco. As caixas representam a média em porcentagem de dois ensaios independentes em duplicata, cada um realizado com dois doadores de sangue e as hastes representam o E. M. P. 80427, origem humana; 87159, bovina; 87244, bovina; 90356, humana.



**Figura 15:** Análise do perfil protéico total da cepa 90356 cultivada *in vivo* (em ratos) empregando a técnica “SDS-PAGE”. Canaletas 1 e 4, padrão de tamanho molecular “Broad Range Protein Molecular Marker” (Promega); canaleta 2, 90356 cultivada *in vitro*; canaleta 3, 90356 cultivada *in vivo*. Destacadas em azul as bandas detectadas exclusivamente após cultivo *in vitro* e em vermelho aquelas detectadas exclusivamente após cultivo *in vivo*.



**Figura 16:** Avaliação da patogenicidade de *S. agalactiae* em modelo de sepse em camundongos adultos. Curvas construídas a partir da média (em porcentagem) de ao menos 3 ensaios independentes com cada uma das cepas analisadas. As hastes representam o E. M. P. 80427, origem humana isolada de secreção vaginal de gestante; 90356, humana isolada de líquido de neonato.

## 5. Discussão

### 5.1. Caracterização de cepas de *S. agalactiae* de origem humana isoladas no estado do Rio de Janeiro em 2008 quanto à diversidade genética e à suscetibilidade aos antimicrobianos.

Apesar da reconhecida sensibilidade de *S. agalactiae* à penicilina *in vitro* e da eficácia terapêutica desta droga no tratamento das infecções causadas por este microrganismo, é fundamental o estudo da susceptibilidade também às outras classes de antimicrobianos, particularmente se necessário o emprego de drogas de segunda escolha em pacientes alérgicos aos beta-lactâmicos (BRAUNWALD *et al.*, 2002). Em nossas cepas foi detectada uma resistência expressiva à clindamicina (19,8%), eritromicina (16,2%), rifampicina (13,9%) e tetraciclina (81,3%), mas todas as cepas foram sensíveis à penicilina, vancomicina e levofloxacina.

A elevada resistência à tetraciclina e a sensibilidade à penicilina e vancomicina entre cepas de origem humana foram descritas em estudos realizados em vários países (DE MOUY *et al.*, 2001; LOPARDO *et al.* 2003; FERJANI *et al.*, 2006; GERHARDI *et al.*, 2007; SAVOIA *et al.*, 2008) e também no Brasil (BORGER, 2005; CORRÊA, 2005; DUARTE *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, dados não publicados). A resistência à rifampicina e cloranfenicol, detectada em 13,9% e 3,4%, respectivamente, das nossas cepas, foi previamente descrita em outras cepas de *S. agalactiae* isoladas no Brasil (PINTO *et al.*, dados não publicados). A levofloxacina constitui uma alternativa útil para o tratamento de infecções por *S. agalactiae* em imunocomprometidos, e embora a resistência à droga tenha sido anteriormente descrita (KOWAMURA *et al.*, 2003; MOLLERACH *et al.* 2007), a mesma não foi ainda detectada no Brasil.

Com respeito à resistência aos macrolídeos e lincosamidas, índices menores foram relatados no Brasil. Duarte e colaboradores (2005) descreveram resistência à eritromicina em 8,5% das cepas isoladas de diversos sítios em humanos, entre 2000 e 2001, no estado do Rio de Janeiro. Simões e colaboradores (2007) detectaram sensibilidade total à eritromicina e resistência à clindamicina (17%) entre cepas isoladas de gestantes em Campinas, entre 2003 e 2004, enquanto Borger (2005) descreveu resistência à eritromicina e clindamicina em, respectivamente, 9% e 6% das cepas de *S. agalactiae* isoladas de gestantes em uma maternidade do Rio de Janeiro. Em um estudo realizado com 370 cepas isoladas de carregadores assintomáticos e de quadros infecciosos em humanos nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina, entre 1978 e 2006, a resistência à eritromicina e clindamicina foi de 4% e 2%, respectivamente (Pinto e colaboradores; dados não publicados). Assim, apesar da limitada comparação devido a desenhos experimentais diferentes, podemos sugerir uma tendência de alta na ocorrência de resistência à eritromicina e clindamicina em no estado do Rio de Janeiro.

Índices variáveis de resistência a estes antimicrobianos foram descritos em outros países. Na Itália, a resistência à eritromicina foi descrita em 16% nas cepas isoladas de infecções invasivas e carregadores assintomáticos por Gerhardi e colaboradores (2007) e em 4% das cepas provenientes de carregadores assintomáticos por Savoia e colaboradores (2008), que descreveram, ainda, resistência de 16% à clindamicina. Na Argentina, Tunísia, Estados Unidos e Suécia, a resistência à eritromicina foi descrita, respectivamente, em 27%, 51%, 38% e 2% das cepas e à clindamicina em, respectivamente, 25%, 46%, 21% e 1% das cepas (DENAMIEL *et al.*, 2005; FERJANI *et al.*, 2006; GYGAX *et al.*, 2006; PERSSON *et al.*, 2007). Hsueh e colaboradores (2001) relataram, em Taiwan, o aumento na resistência à eritromicina e à clindamicina em cepas de *S. agalactiae* isoladas de humanos de 19% e 18% em 1994 para 46% e 37% em 1997, respectivamente.

Em nosso trabalho, quando realizamos a análise somente das cepas de *S. agalactiae* isoladas de gestantes no último trimestre de gestação, 17% e 21% apresentaram resistência à eritromicina e clindamicina, respectivamente, além da sensibilidade à penicilina e vancomicina. Assim, conforme esperado, a penicilina poderia ser administrada sem restrições às pacientes não alérgicas aos beta-lactâmicos como profilaxia intraparto ou para o tratamento de infecções causadas pelo microrganismo. Entretanto, para pacientes alérgicas, o tratamento empírico com drogas de segunda escolha como eritromicina ou clindamicina estaria comprometido, reforçando a necessidade de se fazer o antibiograma para *S. agalactiae* nesses casos.

Por outro lado, faz-se também necessário a investigação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dentre as cepas isoladas de quadros invasivos em pacientes do estado do Rio de Janeiro para se verificar se os níveis de resistência à eritromicina e clindamicina são semelhantes aos detectados para as cepas isoladas de carreadores assintomáticos. Esses dados são muito importantes, pois poderão orientar a implantação de esquemas de tratamento empírico nas unidades de saúde, quando se tratar de pacientes com histórico de alergia à penicilina.

A técnica de PFGE é uma ferramenta importante, reprodutível, e amplamente utilizada na caracterização da diversidade genética de cepas de inúmeros microrganismos. Entretanto, a análise dos resultados obtidos não é padronizada, como ocorre com a técnica de MLST (JONES *et al*, 2003). Assim, Martins e colaboradores (2007), por exemplo, descreveram que a similaridade igual ou superior a 80% deve ser utilizada para se estabelecer relação genética entre os perfis eletroforéticos obtidos empregando-se PFGE. Segundo os autores, a escolha deste ponto de corte minimiza classificações incorretas devido à variabilidade inerente à análise. Os autores designaram o termo clone ou padrão de polimorfismo a grupos de três ou

mais cepas que apresentam perfis eletroforéticos com similaridade igual ou superior a 80%. Outros autores, entretanto, classificam como padrão de polimorfismo perfis eletroforéticos que apresentam relação genética (dois ou mais) ou perfis eletroforéticos singulares, sem relação genética com outro perfil (SKJAERVOLD *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; GERHARDI *et al.*, 2007; CORRÊA *et al.*, dados submetidos à publicação). No presente estudo, este último critério foi empregado.

Cinquenta e sete das 61 cepas genotipadas empregando-se PFGE no presente estudo foram isoladas de secreção vaginal de gestantes assintomáticas ou de orofaringe de homens militares assintomáticos. Apenas uma cepa foi isolada de sangue, constituindo uma infecção invasiva. Cinquenta e oito perfis eletroforéticos distintos foram identificados e onze destes foram agrupados, com base na sua similaridade, em seis padrões de polimorfismo. Os demais 47 perfis foram singulares, não apresentando relação genética quando a similaridade acima de 80% foi utilizada como corte. Cada padrão foi constituído por apenas duas ou três cepas. Assim, uma grande heterogeneidade genética foi observada entre as cepas. No presente estudo o DNA de quatro cepas não foi clivado pela enzima *SmaI*, o que está em concordância com dados descritos na literatura (SKJAERVOLD *et al.*, 2004; GERHARDI *et al.*, 2007; VON BOTH *et al.*, 2008).

Gerhardi e colaboradores (2007) utilizaram PFGE para analisar 91 cepas isoladas de quadros invasivos, quadros não invasivos e colonização de adultos e neonatos entre 2002 e 2005 na Itália. Utilizando 80% de similaridade para estabelecer relação genética entre os 57 perfis eletroforéticos obtidos, foram descritos 34 padrões de polimorfismo, incluindo quatro predominantes, nos quais foram agrupados mais de 50% das cepas. Das 31 cepas isoladas de quadros invasivos, 55% foram alocadas num dos quatro padrões de polimorfismo supracitados. Das isoladas de quadros não invasivos e de colonização, 58% e 41%, respectivamente, foram alocadas nos quatro padrões predominantes. Assim, diversidade

genética similar foi observada para os três grupos de cepas. Num estudo realizado com cepas isoladas entre 2000 e 2004 de secreção vaginal de gestantes e neonatos acometidos por quadros invasivos em Portugal, os autores descreveram vinte padrões de polimorfismo utilizando PFGE e similaridade superior a 80% para comparar os perfis obtidos (MARTINS *et al.*, 2007). Das 65 e 161 cepas invasivas e de colonização, 68% e 59%, respectivamente, foram alocadas em um dos quatro padrões predominantes. Em ambos os estudos não houve diferença na diversidade genética detectada entre as cepas isoladas de quadros invasivos quando em comparação com aquelas isoladas de carreadores assintomáticos.

Na Noruega, Skjaervold e colaboradores (2004) analisaram 75 cepas isoladas de infecções invasivas entre 1997 e 2001 e 6 cepas padrão. Os 62 perfis eletroforéticos detectados foram alocados em 50 padrões utilizando 80% de similaridade para analisá-los e destes últimos, apenas três continham mais de 3 cepas. Trinta cepas (37%) apresentaram perfis singulares. Os dados demonstraram uma grande heterogeneidade genética entre as cepas. Por outro lado, Von Both e colaboradores (2008) analisaram 288 cepas isoladas entre 2001 e 2003 de diversas regiões na Alemanha de quadros de síndrome precoce e síndrome tardia e, utilizando 80% de similaridade, verificaram a alocação de 60% das cepas em um dos sete padrões de polimorfismo predominantes. Apenas 18% das cepas apresentaram perfis singulares. Os autores concluíram que as cepas isoladas de quadros invasivos na Alemanha apresentaram uma estrutura clonal, que não foi observada dentre as cepas da Noruega, também isoladas de infecções invasivas. Estes dois trabalhos demonstram a variabilidade na diversidade genética em *S. agalactiae* de acordo com a população estudada.

Outra variável para a análise dos perfis eletroforéticos refere-se ao índice de tolerância de posição. Em nosso estudo foi utilizado um índice a 1%, enquanto outros autores utilizaram índice igual a 1,5% (MARTINS *et al.*, 2007; GERHARDI *et al.*, 2007) ou 2,5% (SKJAERVOLD *et al.*, 2004). A tolerância de posição é a distância que o programa de

computador tolera para considerar que bandas presentes em dois perfis eletroforéticos são iguais. Assim, quanto menor a porcentagem utilizada, maior a especificidade. Utilizando tolerância de posição de 0,5% (dados não mostrados) foram obtidos apenas 3 padrões de polimorfismo, incluindo duas cepas que apresentaram perfis indistinguíveis, em contraposição aos seis padrões, incluindo cinco cepas que dividiram dois perfis, obtidos com a tolerância de posição maior. Assim, analisando-se o dendograma de Gerhardi e colaboradores (2007), pode-se observar que perfis que seriam considerados apenas relacionados de acordo com o critério utilizado no presente estudo, foram reportados como indistinguíveis pelos autores.

Além disto, outro parâmetro utilizado é o grau de similaridade utilizado. Assim como em outros estudos (SKJAERVOLD *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2007; VON BOTH *et al.*, 2008), no presente estudo a similaridade igual ou superior a 80% foi utilizada como “cutoff” para a determinação de relação genética entre as cepas. Savoia e colaboradores (2008) analisaram 73 cepas isoladas de secreção vaginal ou de reto de gestantes em um hospital na Itália, entre 2005 e 2006, utilizando 60% de similaridade. Foram descritos 7 padrões de polimorfismo nos quais todos os perfis eletroforéticos foram alocados. Se este parâmetro de similaridade fosse empregado no presente estudo, apenas 20 perfis eletroforéticos singulares seriam descritos e os demais seriam agrupados em 14 padrões de polimorfismo. Um padrão predominante existiria, composto por 6 perfis e 8 cepas. Mesmo utilizando este cutoff, a heterogeneidade genética do presente estudo seria maior que aquela observada no estudo do grupo italiano, também realizado com gestantes assintomáticas no último trimestre de gestação. Contudo, é importante ressaltar novamente a influência dos parâmetros utilizados para a análise dos perfis obtidos por PFGE nas conclusões acerca da diversidade clonal na população bacteriana.

No presente estudo não foi avaliado o sorotipo das cepas, mas dados prévios produzidos no Brasil corroboram para a provável distribuição dos sorotipos principais na

população (Ia, Ib II– V) (CORRÊA, 2002; DUARTE *et al.*, 2005; SIMÕES *et al.*, 2007). Os estudos anteriormente citados (SKJAERVOLD *et al.*, 2004; GERHARDI *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2007; SAVOIA *et al.*, 2008; VON BOTH *et al.*, 2008) analisaram cepas dos principais sorotipos descritos. Nestes, quando padrões de polimorfismo com mais de cinco cepas foram detectados, em geral, houve a predominância de um sorotipo determinado. Não há na literatura, dados acerca da heterogeneidade genética de cepas isoladas de diversos sorotipos no Brasil. Embora a sorotipagem para estas cepas não tenha sido realizada no presente estudo, a observação de uma população sem estrutura clonal e com grande diversidade genética (47 dos 58 perfis são singulares) impossibilita o estabelecimento de correlação entre o sorotipo, o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e o genótipo.

A investigação da diversidade genética em cepas de *S. agalactiae* possibilita a caracterização mais acurada da epidemiologia do microrganismo. Considerando que as síndromes precoce e tardia associadas à infecção por *S. agalactiae* podem ter sua origem na microbiota vaginal materna, o conhecimento da diversidade genética desta microbiota torna-se relevante.

## **5.2. Avaliação e comparação do potencial patogênico de cepas de *S. agalactiae* de origens bovina e humana.**

A espécie *S. agalactiae* tem uma história epidemiológica dinâmica (ROSS, 1978; BISHARAT *et al.*, 2004). Inicialmente foi caracterizado como um patógeno animal, associado à mastite bovina (anos 1880), e décadas mais tarde sua associação com infecções em humanos foi descrita. Na década de 30, infecções em neonatos eram raramente descritas. Posteriormente, já nos anos 60, alguns trabalhos associaram o microrganismo a síndromes em neonatos e na década seguinte o microrganismo foi reconhecido como um dos principais

patógenos nesta subpopulação. Recentemente, além da reconhecida importância em mastite bovina, tem sido descrita, ainda, a infecção pelo microrganismo em peixes e crocodilos, entre outros animais (BISHOP *et al.*, 2007; EVANS *et al.*, 2008; GARCIA *et al.*, 2008) . Esta diversidade de hospedeiros para o *S.agalactiae* suscita uma especulação sobre a possibilidade de transmissão do microrganismo interespecie, incluindo o homem (POUTREL & DORE, 1985; JENSEN & AARESTRUP, 1996; HÉRY-ARNAUD *et al.*, 2007; EVANS *et al.*, 2008).

Com relação à transmissibilidade entre bovinos e humanos, já na década de 1970 foi descrito que a colonização por *S. agalactiae* foi quarenta vezes maior entre consumidores de leite fresco em comparação com consumidores de leite pasteurizado (HAHN *et al.*, 1974 *apud* POUTREL & DORE, 1985). Mais tarde, diversos estudos detectaram semelhanças genéticas em cepas de *S.agalactiae* isoladas de humanos e bovinos. Musser e colaboradores (1989) utilizando MLEE identificaram o mesmo ET em cepas de origem humana isoladas de neonatos assintomáticos ou acometidos por infecção invasiva nos Estados Unidos e cepas de origem bovina de mastite na França. Noutro estudo, um mesmo perfil de RAPD foi observado em *S. agalactiae* de secreção vaginal de portadora assintomática e de leite bovino, provenientes de regiões distintas de Quebec (MARTINEZ *et al.*, 2000). Num estudo realizado nos Estados Unidos, quatro ribotipos foram compartilhados por 52 cepas humanas, provenientes de quadros invasivos, e cepas de mastite bovina. Em conjunto, os estudos que utilizaram técnicas de biologia molecular (excetuando-se a MLST) concluíram que cepas bovinas e humanas, em sua maioria, formam grupos fenotípicos e moleculares distintos, embora algumas cepas destas duas origens dividam perfis semelhantes, o que sugere algum potencial de transmissão interespecie.

Utilizando MLST, que permite a definição de relação filogenética entre cepas, alguns STs foram detectados em cepas das duas origens, dados que estão em concordância com os dados descritos imediatamente acima (JONES *et al.*, 2003; DAVIES *et al.*, 2004; BISHARAT

*et al.*, 2004). As análises filogenéticas demonstraram que os STs das cepas humanas formaram “clusters” distantes na árvore filogenética daqueles formados pelos STs bovinos, demonstrando, assim, que elas formam populações divergentes. Entretanto, o complexo clonal ST17, previamente caracterizado como altamente virulento em neonatos (JONES *et al.*, 2003), é relacionado com um clone bovino (ST61) e divergente de clones humanos (BISHARAT *et al.*, 2004). No complexo ST23 os autores descreveram cepas de origem bovina e humana, sendo a maior parte das humanas do sorotipo Ia isoladas de infecções invasivas em neonatos. Portanto, os dados obtidos demonstram que o microrganismo ultrapassou a barreira interhospedeiros.

No Brasil, Oliveira e colaboradores (2006) descreveram cepas humana (80427; ST26) e bovina (87159; ST256) relacionadas geneticamente. Esta foi a primeira descrição do ST256. Entretanto, o ST 26 foi descrito em cepas do sorotipo V isoladas em diversos países de carregadores assintomáticos e de quadros invasivos em humanos (BISHARAT *et al.*, 2004; BOHNSACK *et al.*, 2008). Análises de cepas de *S. agalactiae* de origens humana e bovina poderiam prover informações importantes acerca de evolução, transmissibilidade, capacidade de colonização e desenvolvimento de infecção interespecie. Entretanto, com exceção da publicação de Sukhnanand e colaboradores (2005), os estudos publicados até o momento investigaram exclusivamente a patogenicidade das cepas (VAN DEN HEEVER & GIESECKE, 1980; JENSEN, 1982; POUTREL & DORE, 1985) ou exclusivamente o seu genótipo (BISHARAT *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006; BOHNSACK *et al.*, 2008). Diante da carência de dados abordando estas duas informações tão valiosas, o presente estudo avaliou a virulência (*in vitro* e *in vivo*) de duas cepas caracterizadas a nível molecular por nosso grupo (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Duas outras cepas não relacionadas, uma de origem bovina (87244) e outra humana (90356) foram submetidas aos mesmos ensaios como controles.

As duas cepas relacionadas geneticamente (80427 e 87159) apresentaram resultados muito similares, sem diferença estatística significativa, quando analisadas quanto à capacidade de adesão e invasão a células de epitélio brônquico pulmonar humano (16HBe) e sobrevivência intracelular em macrófagos de murinos. De acordo com os dados da literatura, esta é a primeira descrição sobre a capacidade de adesão e invasão de *S. agalactiae* de origem bovina a células 16HBe. Em humanos, as etapas de adesão e invasão ao epitélio pulmonar são etapas essenciais para o estabelecimento de pneumonia e subsequente sepse em neonatos, características da síndrome precoce (SPELLERBERG, 2000). Em bovinos, a infecção por *S. agalactiae* é restrita à glândula mamária, sem complicações sistêmicas (KEEFE, 1997). Outros autores não verificaram diferenças na capacidade de cepas de origens bovina e humana em invadir células do epitélio cervical humano (HeLa) (SUKHNANAND *et al.*, 2005). No presente estudo, as cepas humanas (80427 e 90356) apresentaram resultados similares quanto à capacidade de sobrevivência à ação bactericida de sangue total humano fresco heparinizado e o mesmo foi observado para as cepas bovinas (87159 e 87244). Contudo, as cepas bovinas apresentaram maior resistência à ação bactericida que a cepa humana 80427.

Quanto à detecção dos genes que codificam fatores de virulência em *S. agalactiae*, os genes *hylB* e *lmb*, que codificam a enzima hialuronidase e a proteína ligadora de laminina, respectivamente, foram detectados nas quatro cepas isoladas de bovinos e humanos analisadas. Entretanto, os genes *bca* e *bac*, que codificam proteína alfa e proteína beta, respectivamente, foram detectados apenas nas cepas humanas. Estudos anteriores realizados com cepas isoladas no Brasil relataram a detecção do gene *bca* entre as cepas de origem bovina, mas não a detecção do gene *bac* (DUARTE *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Os dados obtidos no presente estudo sugerem que os genes *bca* e *bac* não desempenham um papel fundamental na virulência da cepa 87159, de origem bovina, em modelo animal.

Adicionalmente, todas as cepas de *S. agalactiae* testadas, quando crescidas em meio de

cultura, apresentaram perfis eletroforéticos das proteínas totais indistinguíveis por SDS-PAGE. Esta técnica não foi discriminatória para separar cepas de *S. agalactiae* humanas de bovinas, e tampouco de diferentes níveis de virulência. Não há dados na literatura comparando perfis totais de proteínas por SDS-PAGE de cepas de *S. agalactiae* isoladas de bovinos e de humanos. Num estudo prévio não foram detectadas diferenças no perfil protéico total avaliado por SDS-PAGE de sete cepas de *S. agalactiae* de origem humana isoladas de quadros clínicos ou de carreadores assintomáticos (PEREIRA, 2005).

Utilizando modelo de sepse em camundongos neonatos, foi observado que a cepa bovina 87244 foi avirulenta. No entanto, a outra cepa bovina, 87159, mostrou-se altamente patogênica *in vivo*, inclusive causando a morte de número maior de animais que a cepa humana 90356, isolada de um caso de meningite, e que a cepa 80427, isolada de gestante assintomática. Estudos anteriores estabeleceram que cepas de *S. agalactiae* de origem bovina são menos patogênicas que cepas de origem humana ou, ainda, avirulentas, em modelo de sepse em camundongos (POUTREL & DORE, 1985; STRAUSS *et al.*, 1982; VAN DER HEEVER & ERASMUS, 1980). Estudos recentes de sepse experimental em camundongos descreveram a morte de ao menos 50% dos animais após a inoculação de  $10^4$  a  $10^8$  UFC/ml via intravenoso ou  $10^5$  UFC/ml via intraperitoneal de cepas de *S. agalactiae* de origem humana (LIU *et al.*, 2004; POYART *et al.*, 2003; SANTI *et al.*, 2007).

No presente estudo, as cepas de origem humana, 80427 e 90356, e a cepa de origem bovina, 87244, apresentaram um perfil de patogenicidade em concordância com os dados disponíveis na literatura e anteriormente exemplificados. Entretanto, a cepa 87159, de origem bovina e relacionada geneticamente à cepa isolada de secreção vaginal humana 80427, exibiu um perfil de patogenicidade condizente aquele esperado para cepas isoladas de humanos. Assim, além de relação genética, as cepas 80427 e 87159 possuem semelhança quanto ao seu potencial patogênico *in vivo*, analisado utilizando-se modelo de sepse em camundongos. É

possível que a semelhança no potencial patogênico também exista em relação ao hospedeiro humano e/ou ao hospedeiro bovino. E é provável que um mesmo comportamento *in vivo* seja também observado em outras cepas isoladas de bovinos e humanos que possuem relação genética.

### **5.3. Investigação da influência do ambiente *in vivo* na patogenicidade de *S. agalactiae*.**

Silva-Filho (1991) utilizou camundongos para a implantação cirúrgica de câmaras intraperitoneais contendo *S. agalactiae*. Nestas câmaras, as células bacterianas foram capazes de intensa multiplicação mas não puderam associar-se às células e tecidos do hospedeiro. Além disto permaneceram restritas ao ambiente da cavidade peritoneal do animal, local de implante das câmaras. Entretanto, apesar destas limitações, o modelo experimental permitiu a troca de fluidos e moléculas entre hospedeiro e o conteúdo intracâmara, devido a porosidade das membranas filtrantes (0,45µm) que compõem as laterais das câmaras de inoculação e, principalmente, resultando na recuperação das células bacterianas crescidas no ambiente *in vivo* para análises subsequentes. Assim, este modelo mostrou-se como uma importante ferramenta em estudos acerca da patogenicidade bacteriana. Utilizando este modelo em nosso estudo, foi demonstrado que as cepas 80427, isolada de gestante assintomática, e 90356, isolada de líquido de neonato, apresentaram contagens de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/ml no interior das câmaras, tanto implantadas em camundongos como em ratos durante 24 horas. Este dado está em acordo com os dados previamente descritos por Silva-Filho (1991).

Para a análise do perfil protéico total empregado-se “SDS-PAGE”, a cepa 90356 foi cultivada *in vivo* implantando-se câmaras em ratos. Este modelo foi utilizado porque não foi obtida quantidade de inóculo bacteriano suficiente para a extração de proteínas em câmaras implantadas em camundongos, uma vez que o peritônio destes comportou duas câmaras com

capacidade de 0,2 - 0,3 mililitros em cada uma. Nos ratos pôde-se introduzir duas câmaras contendo 2 mililitros de inóculo bacteriano cada.

A permeabilidade da membrana utilizada na extremidade das câmaras, permitiu o estabelecimento de um fluxo de fluidos e moléculas de diferentes tamanhos (desde que inferiores à 0,45 $\mu$ m) entre o conteúdo da câmara e o hospedeiro. Assim, pôde-se esperar que proteínas secretadas pela bactéria foram dispersas no peritônio, ao mesmo tempo que proteínas do hospedeiro provavelmente migraram para o interior da câmara. A fim de minimizar a presença destas proteínas no inóculo recuperado, as células bacterianas foram submetidas à lavagens com tampão. O mesmo procedimento foi realizado com a cepa submetida ao cultivo *in vitro* (em meio THB). Mesmo assim, supôs-se que proteínas do hospedeiro ou do meio de cultivo possam ter se associado covalentemente à superfície bacteriana, causando alterações no perfil proteico. Assim, as bandas detectadas exclusivamente após cultivo *in vitro* ou *in vivo* sugerem que houve uma expressão diferenciada do proteoma bacteriano em resposta aos diferentes ambientes. Análises posteriores, empregando a técnica proteoma, por exemplo, poderiam esclarecer algumas características do perfil protéico diferenciado nas duas condições estudadas.

Alterações na virulência bacteriana, mensuradas pela capacidade de resistir à ação bactericida de sangue total humano fresco heparinizado, não foram detectadas para as duas cepas analisadas após cultivo *in vivo* ou *in vitro*. Ensaio de sepse em camundongos com a cepa 80427 (isolada de secreção vaginal humana), crescida em meio de cultivo, demonstraram que a mesma foi avirulenta em camundongos adultos na dose infectante, uma vez que não causou a morte em nenhum dos 24 animais testados. Entretanto, em ensaios similares, a cepa 90356, isolada de líquido humano, causou a morte de 6 dos 25 animais testados. Esses resultados foram incoerentes com aqueles relatados no item 4.2, nos quais ensaios de sepse em camundongos neonatos com 4 ou 8 dias de vida com as cepas cultivadas previamente *in*

vitro foram realizados. De acordo com os resultados obtidos, a patogenicidade da cepa 80427 foi maior que a verificada para a cepa 90356 quando camundongos com 4 dias de vida foram inoculados, entretanto, resultados opostos foram observados nos animais com 8 dias de vida. A comparação das duas curvas de sobrevivência geradas para cada cepa mostrou diferença significativa apenas para a cepa 80427. Assim, o potencial patogênico da cepa isolada de secreção vaginal (80427) sofreu um decaimento conforme ocorreu o amadurecimento dos animais de neonatos para adultos jovens (4 dias, 8 dias e 3 a 4 semanas de vida). Os possíveis fatores bacterianos e/ou do hospedeiro responsáveis por esta diferença de comportamento não foram investigados em nosso trabalho.

O cultivo *in vivo*, utilizando as câmaras intraperitoneais anteriormente descritas, ocasionou um aumento significativo na virulência da cepa 90356 (19 mortes em 24 animais testados), mas não na virulência da cepa 80427 (um animal morto em 24 animais analisados) em animais adultos. Ou seja, os dados apontam para a ocorrência de alterações na expressão de fatores bacterianos após o cultivo *in vivo* que causaram um aumento na virulência da cepa 90356 isolada de um quadro invasivo, mas não para a isolada de secreção vaginal (colonização). Valentin-Weigand e Chhatwal (1995) relataram a maior capacidade de invasão à cultura de células em cepas recém isoladas de quadros infecciosos em comparação com cepas recém isoladas de portadores assintomáticos. Estes autores também verificaram uma diferença estatística significativa na invasividade de cepas isoladas de sangue em comparação com a invasividade de cepas provenientes de infecções não invasivas. Assim, é possível que o sítio clínico das cepas 80427 e 90356 tenham influenciado os resultados obtidos em ensaios de sepse em camundongos, mesmo após as mesmas terem sido mantidas congeladas por 28 e 18 anos, respectivamente, desde o seu isolamento inicial.

Em *S. agalactiae* há diversos estudos que descrevem fatores de virulência, como cápsula polissacarídica, C5a peptidase, beta hemolisina e outros (HERBERT, BEVERIDGE

& SAUNDERS, 2004; HENSLER *et al.*, 2005; SEVERI, HOOD & THOMAS, 2007) que poderiam contribuir com a capacidade do microrganismo em causar doença. Além disto, durante a infecção em neonatos, por exemplo, o microrganismo frequentemente coloniza orofaringe, seguido por colonização e infecção dos pulmões, sobrevivência no sangue periférico, transposição da barreira hemato-encefálica e infecção das meninges, enquanto em mulheres coloniza reto e vagina, principalmente (SPELLERBERG *et al.*, 2000). Adicionalmente, o microrganismo é capaz de colonizar e causar infecção em hospedeiros muito diversos, como peixes, bovinos e humanos, o que aponta para a sua plasticidade (EVANS *et al.*, 2008). A análise do genoma de *S. agalactiae* revelou a ausência de muitas vias de biossíntese de aminoácidos e a presença de um grande número de genes que codificam componentes de transportadores ABC, indicando que a espécie é auxotrófica para múltiplos aminoácidos e depende do transporte de muitos nutrientes do meio ambiente do hospedeiro durante o crescimento (GLASER *et al.*, 2002; SHELVER *et al.*, 2003). Assim, o metabolismo de *S. agalactiae* durante seu crescimento em hospedeiro é direcionado para a obtenção de nutrientes que contribuem tanto para a persistência nos diversos tecidos como na sua habilidade para causar doença. É possível que o ambiente *in vivo*, com a pressão seletiva exercida pela carência nutricional e pela presença da resposta imunológica, inexistentes nos meios de cultivo usualmente utilizados, cause alterações não só na expressão de fatores clássicos de virulência mas também no metabolismo bacteriano. Estas, por sua vez, refletem no aumento da virulência bacteriana, observado no presente estudo para a cepa 90356 em modelo de sepse em camundongos.

Portanto, os dados obtidos em nosso estudo sugerem que ensaios com o objetivo de avaliar a patogenicidade bacteriana devem ser planejados acuradamente, levando-se em consideração o tipo de experimento, o modelo animal adequado (espécie e idade do animal, a via de inoculação, entre outras variáveis) e as condições de preparação do inóculo bacteriano

(células crescidas *in vivo* ou *in vitro*). Dados de outros autores corroboram com a nossa sugestão de que a mimetização da infecção real deve ser realizada do modo mais acurado possível, ou seja, considerando todas as variáveis acima citadas, para que as conclusões obtidas possam ser extrapoladas corretamente (MEDINA, ROHDE & CHHATWAL, 2003; MEDINA *et al.*, 2003; YAMAMOTO *et al.*, 2005, MEREGHETTI *et al.*, 2008).

## 6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e na sua comparação com os dados disponíveis na literatura, pode-se concluir que:

- As cepas de *S. agalactiae* de origem humana e isoladas no estado do Rio de Janeiro em 2008 mantêm uma sensibilidade de 100% à penicilina, vancomicina e levofloxacina.
- A resistência aos macrolídeos e lincosamidas em nestas cepas foi elevada, o que pode comprometer a utilização destes antibióticos como drogas de segunda linha no tratamento de infecções em indivíduos alérgicos à penicilina.
- Uma grande heterogeneidade genética, determinada através de PFGE, foi observada entre as cepas estudadas, isoladas, em sua maioria, de carreadores assintomáticos.
- A cepa 87159, de origem bovina e relacionada geneticamente à cepa de origem humana 80427, apresentou perfil patogênico, mensurado em ensaio *in vivo*, esperado para cepas de origem humana.
- O ambiente *in vivo* influenciou a patogenicidade de *S. agalactiae*, ao menos da cepa 90356, e esta variável deve ser considerada quando do desenho de protocolos para o estudo em modelos animais.

## 7. Referências bibliográficas

AGGER, J.F.; PRIOU, C.; HUDA, A. & AAGAARD, K. **Risk factors for transmission of *Streptococcus agalactiae* infection between Danish dairy herds: a case control study.** Vet. Res., 25, 234-238, 1994.

AL-SWEIH, N.; HAMMOUD, M.; AL-SHIMMIRI, M.; JAMAL, M.; LALITHA, L. & ROTIMI, V. **Serotype distributions and mother-to-baby transmission rate of *Streptococcus agalactiae* among expectant mothers in Kuwait.** Arch. Gynecol. Obstet. 272, 131-135, 2005.

ANTHONY, B.F.; OKADA, D. M. & HOBEL, C. J. **Epidemiology of the group B streptococcus: maternal and nosocomial sources for infant acquisitions.** J. Pediatr. 95, 431-436, 1979.

ARESCOUG, T.; LINSE, S.; STALHAMMAR-CARLEMALM, M.; HEDÉN, L. O. & LINDAHL, G. **A proline-rich region with a highly periodic sequence in streptococcal  $\beta$  protein adopts the polyproline II structure and is exposed on the bacterial surface.** J. Bacteriol. 184, 6376-6383, 2002.

BAKER, C. J. & BARRETT, F. F. **Group B streptococcal infections in infants: the importance of the various serotypes.** JAMA 230, 1158-1160, 1974.

BAKER, C. J.; BARRETT, F. F.; GORDON, R. C. & YOW, M. D. **Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants.** J. Pediatr. 82, 724-729,

1973.

BAKER, C. J. & EDWARDS, M. S. **Group B streptococcal conjugate vaccines.** Arch. Dis. Child.88, 375-378, 2003.

BALTIMORE, R. S. **Consequences of profilaxis for group B streptococcal infections of the neonate.** Semin. Perinatol. 31, 31-38, 2007.

BAR-MOSHE, B.; WEISS, I.; ABUHANNA, F.; HAITIS, N. & SHINE, Y. **A regional program for the eradication of *Streptococcus agalactiae* in Israel dairy herds.** Isr. J. Vet. Med. 43, 236-241, 1987.

BASEGGIO, N.; MANSELL, P.D.; BROWNING, J.W. & BROWNING, G.F. **Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis.** Mol. Cell Probes 11, 349-354, 1997.

BECKMANN, C.; WAGGONER, J. D.; HARRIS, T. O.; TAMURA, G. S. & RUBENS, C. E. **Identification of novel adhesins from group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding.** Infect. Immun. 70, 2869–2876, 2002.

BENCHETRIT, L. C.; FRACALANZZA, S. E. L.; PEREGRINO, H.; CAMELO, A. A. & SANCHES, L. A. L. R. **Carriage of *Streptococcus agalactiae* in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil.** J. Clin. Microbiol. 15, 787-790, 1982.

BENSON, J. A. & FERRIERI, P. **Rapid pulsed-field gel electrophoresis method for group B streptococcus isolates.** J. Clin. Microbiol. 39, 3006-3008, 2001.

BERNER, R.; RUESS, M.; BERESWILL, S. & BRANDIS, M. **Polymorphisms in the cell wall-spanning domain of the C protein  $\beta$ -antigen in clinical *Streptococcus agalactiae* isolates are caused by genetic instability of repeating DNA sequences.** Pediatr. Res. 51, 106-111, 2002.

BEVANGER, L. & IVERSEN, O. J. **The Ibc protein fraction of group B streptococci: characterization of protein antigens extracted by HCl.** Acta Pathol. Microbiol. Scand. 89, 205-209, 1981.

BISHARAT, N.; CROOK, D.W.; LEIGH, J.; HARDING, R.M.; WARD, P.N.; COFFEY, T.J.; MAIDEN, M.C.; PETO, T. & JONES, N. **Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor.** J. Clin. Microbiol. 42, 2161-2167, 2004.

BISHOP, E. J.; SHILTON, C.; BENEDICT, S.; KONG, F.; GILBERT, G. L.; GAL, D.; GODOY, D.; SPRATT, B. G. & CURRIE, B. J. **Necrotizing fasciitis in captive juvenile *Crocodylus porosus* caused by *Streptococcus agalactiae*: an outbreak and review of the animal and human literature.** Epidemiol. Infect. 135, 1248-1255, 2007.

BLANCAS, D.; SANTIN, M.; OLMO, M.; ALCAIDE, F.; CARRATALA, J. & GUDIOL, F. **Group B streptococcal disease in nonpregnant adults: incidence, clinical characteristics, and outcome.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 23, 168-173, 2004.

BLUMBERG, H. M.; STEPHENS, D. S.; MODANSKY, M.; ERWIN, M.; ELLIOT, J.; FACKLAM, R. R.; SCHUCHAT, A.; BAUGHMAN, W. & FARLEY, M. M. **Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V.** J. Infect. Dis. 173, 365-373, 1996.

BOHNSACK, J. F.; TAKAHASHI, S.; HAMMITT, L.; MILLER, D. V.; ALY, A. A. & ADDERSON, E. **Genetic polymorphisms of group B streptococcus *scpB* alter functional activity of a cell-associated peptidase that inactivates C5a.** Infect. Immun. 68, 5018–5025, 2000.

BOHNSACK, J. F.; WHITING, A. A.; GOTTSCHALK, M.; DUNN, D. M.; WEISS, R.; AZIMI, P. H.; PHILLIPS, J. B.; WEISMAN, L. E.; RHOADS, G. G. & LIN, F. Y. C. **Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six US academic centers from 1995–1999.** J. Clin. Microbiol. 46, 1285–1291, 2008.

BOLDUC, G. R.; BARON, M. J.; GRAVEKAMP, C.; LACHENAUER, C. S. & MADOFF, L. C. **The alpha C protein mediates internalization of group B *Streptococcus* within human cervical epithelial cells.** Cell. Microbiol. 4, 751-758, 2002.

BOPP, V. & LÄMMLER, C. **Comparative studies on group B streptococci isolated from bovine milk samples in Thuringia and Hesse.** Zentralbl. Veterinar. Med. 42, 427-433, 1995.

BORGER, I. L. **Estudo da colonização por *Streptococcus agalactiae* em gestantes atendidas na Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia / UFF. 2005.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.** Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976.

BRADLEY, A. **Bovine mastitis: an evolving disease.** Vet. J. 164, 116–128, 2002.

BRAUNWALD, E.; FAUCI, A.; KASPER, D. L.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L. & JAMESON, J. L. **Medicina Interna.** 15<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda. 1, 962, 2002.

BROCHET, M.; COUVE, E.; ZOUINE, M.; VALLAEYS, T.; RUSNIOK, C.; LAMY, M. C.; BUCHRIESER, C.; TRIEU-CUOT, P.; KUNST, F.; POYART, C. & GLASER, P. **Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*.** Microbes Infect. 8, 1227-1243, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Decreasing incidence of perinatal group B streptococcal disease – United States, 1993 – 1995.** Morbid. Mortal. Wkly. Rep. 46, 473-477, 1997.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Prevention of perinatal group B streptococcal Diseases: Revised guidelines from CDC.** Morbid. Mortal. Wkly. Rep. 51, 11, 2002.

CHAFFIN, D. O.; BERES, S. B.; YIM, H. H. & RUBENS, C. E. **The serotype of type Ia and III group B streptococci is determined by the polymerase gene within the**

**polycistronic capsule operon.** J. Bacteriol. 182, 4466-4477, 2000.

CHAFFIN, D. O.; MENTELE, L. M. & RUBENS, C. E. **Sialylation of group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression.** J. Bacteriol. 187, 4615–4626, 2005.

CHATELLIER, S.; HUET, H.; KENZI, S.; ROSENAU, A.; GESLIN, P. & QUENTIN, R. **Genetic diversity of rRNA operons of unrelated *Streptococcus agalactiae* strains isolated from cerebrospinal fluid of neonates suffering from meningitis.** J. Clin. Microbiol. 34, 2741-2747, 1996.

CHATELLIER, S.; RAMANANTSOA, C.; HARRIAU, P.; ROLLAND, K.; ROSENAU, A. & QUENTIN, R. **Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis.** J. Clin. Microbiol. 35, 2573-2579, 1997.

CHENG, Q.; STAFSLIEN, D.; PURUSHOTHAMAN, S. S. & CLEARY, P. P. **The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin.** Infect. Immun. 70, 2408-2413, 2002.

CHRISTIE, R.; ATKINS, N. E. & MUNCH-PETERSEN, E. A. **A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci.** Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 23, 197-200, 1944.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**; approved standard – 8<sup>a</sup> ed. M100 S15. 25, 1 Wayne, PA. USA. 2007.

CORRÊA, A. B. A. **Caracterização molecular de cepas de *Streptococcus agalactiae* pertencentes aos tipos sorológicos Ia e Ia/c**. Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes / UFRJ. 2002.

CORRÊA, A. B. A. **Polimorfismo genético em *Streptococcus agalactiae* Sorotipo Ia** Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes/UFRJ. 2005.

CORRÊA, A. B. A.; OLIVEIRA, I. C. M.; PINTO, T. C. A.; DE MATTOS, M. C.; BENCHETRIT, L. C. **Pulsed-field gel electrophoresis, detection of virulence determinants and antimicrobial susceptibility of type Ia group B streptococci strains isolated in Brazil**. Aceito para a publicação na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

CURTIS, S. N. & KRAUSE, R. M. **Antigenic relationships between groups B and G streptococci**. J. Exp. Med. 120,629-637, 1964.

DAHL, M. S.; TESSIN, I. & TROLLFORS, B. **Invasive group B streptococcal infections in Sweden: incidence, predisposing factors and prognosis**. Int. J. Infect. Dis. 7, 113-119, 2003

DAIGNAULT, D., GUÉVREMONT, E., GUILLEMETTE, J.M., MESSIER, S., GOTTSCHALK, M. & HIGGINS, R. **Serotypes of *Streptococcus agalactiae* cultured from**

**dairy milk samples in Québec.** Can. Vet. J. 44,217-220, 2003.

DAVIES, H. D.; JONES, N.; WHITTAM, T. S.; ELSAYED, S.; BISHARAT, N. & BAKER, C. J. **Multilocus sequence typing of serotype III group B streptococcus and correlation with pathogenic potential.** J. Infect. Dis.189, 1097–102, 2004.

DE MOUY, D.; CAVALLO, J. D.; LECLERCQ, R.; FABRE, R. & AFORCOPI-BIO NETWORK. **Antibiotic susceptibility and mechanisms of erythromycin resistance in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae*: french multicenter study.** Antimicrob. Agents Chemother. 45, 2400-2402, 2001.

DENAMIEL, G.; LLORENTE, P.; CARABELLA, M.; REBUELTO, M. & GENTILINI, E. **Anti-microbial susceptibility of *Streptococcus spp.* isolated from bovine mastitis in Argentina.** J. Vet. Med., 52, 125-128, 2005.

DILLON, H. C. JR.; KHARE, S. & GRAY, B. M. **Group B streptococcal carriage and disease: a 6-year prospective study.** J. Pediatr. 110, 31-36, 1987.

DMITRIEV, A.; HU, Y. Y.; SHEN, A. D.; SUROVOV, A. & YANG, Y. H. **Chromosomal analysis of group B streptococcal clinical strains: bac gene-positive strains are genetically homogeneous.** FEMS Microbiol. Lett. 208, 93-98, 2001.

DMITRIEV, A.; SUVOROV, A.; SHEN, A. D. & YANG, Y. H. **Clinical diagnosis of group B streptococci by scp gene based PCR.** Indian J. Med. Res. 119, 233-236, 2004.

DOGAN, B.; SCHUKKEN, Y.H.; SANTISTEBAN, C. & BOOR, K.J. **Distribution of**

**serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts.** J. Clin. Microbiol., 43, 5899-5906, 2005.

DORAN, K. S.; ENGELSON, E. J.; KHOSRAVIA, A.; MAISEY, H. C.; FEDTKE, I.; EQUILS, O.; MICHELSEN, K. S.; ARDITI, M.; PESCHEL, A. & NIZET, V. **Blood-brain barrier invasion by group B *Streptococcus* depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid.** J. Clin. Invest. 115, 2499–2507, 2005.

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

DORAN, K. S. & NIZET, V. **Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy.** Mol. Microbiol. 54, 23–31, 2004.

DUARTE, R.S.; BELLEI, B.C.; MIRANDA, O.P.; BRITO, M.A.V.P. & TEIXEIRA, L.M. **Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources.** Antimicrob. Agents Chemother. 49, 97-103, 2005.

DUARTE, R. S.; MIRANDA, O. P.; BELLEI, B. C.; BRITO, M. A. V. P. & TEIXEIRA, L. M. **Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil.** J. Clin. Microbiol. 42, 4214-4222, 2004.

EBERHARD, R.J.; HARMON, R.J.; JASPER, D.E.; NATZKE, R.P.; NICKERSON, S.C.;

RENEAU, J.K.; ROW, E.H.; SMITH, K.L. & SPENCER, S.B. **Current concepts of bovine mastitis.** The National Mastitis Council, VA, USA. 1987.

EKIN, I.H. & GURTURK, K. **Characterization of bovine and human group B streptococci isolated in Turkey.** J. Med. Microbiol. 55, 517-521, 2006.

ELLIOTT, J. A.; FARMER, K. D. & FACKLAM, R. R. **Sudden increase in isolation of group B streptococci, serotype V, is not due to emergence of a new pulse-field gel electrophoresis type.** J. Clin. Microbiol. 36, 2115-2116, 1998.

ESTUNINGSIH, S.; SOEDARMANTO, I.; FINK, K.; LAMMLER, C. & WIBAWAN, I.W. **Studies on *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Indonesia.** J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health, 49, 185-187, 2002.

EVANS, J. J.; BOHNSACK, J. F.; KLESIOUS, P. H.; WHITING, A. A.; GARCIA, J. C.; SHOEMAKER, C. A.; & TAKAHASHI, S. **Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan.** J. Med. Microbiol. 57, 1369–1376. 2008.

FARLEY, M. M. **Group B streptococcal disease in nonpregnant adults.** Clin. Infect. Dis. 33, 556-561, 2001.

FASOLA, E.; LIVDAHL, C. & FERRIERI, P. **Molecular analysis of multiple isolates of the major serotypes of group B streptococci.** J. Clin. Microbiol. 31, 2616-2620, 1993.

FERJANI, A., BEN ABDALLAH, H., BEN SAIDA, N., GOZZI, C. & BOUKADIDA, J. **Vaginal colonization of the *Streptococcus agalactiae* in pregnant woman in Tunisia: risk factors and susceptibility of isolates to antibiotics.** Bull. Soc. Pathol. Exot., 99, 99-102, 2006.

FLUEGGE, K.; SUPPER, S.; SIEDLER, A.; BERNER, R. **Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in infants: results from a nationwide active laboratory surveillance study over 2 years in Germany.** Clin. Infect. Dis. 40, 760-763, 2005.

FRANCIOSI, R. A.; KNOSTMAN, J. D. & ZIMMERMAN, R. A. **Group B streptococcal neonatal and infant infections.** J. Pediatr. 82, 707-718, 1973.

FRANKEN, C.; HAASE, G.; BRANDT, C.; WEBER-HEYNEMANN, J.; MARTIN, S.; LÄMMLER, C.; PODBIELSKI, A.; LÜTTICKEN, R. & SPELLERBERG, B. **Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*.** Mol. Microbiol. 41, 925-935, 2001.

FREEDMAN, R. M.; INGRAM, D. L.; GROSS, I.; Ehrenkranz, R. A. Warshaw, J. B. & Baltimore, R. S. **A half century of neonatal sepsis in Yale: 1928 – 1978.** Am. J. Dis. Child 135, 140-144, 1981.

GARCIA, J. C.; KLESIOUS, P. H.; EVANS, J. J. & SHOEMAKER, C. A. **Non-infectivity of cattle *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and channel catfish, *Ictalurus punctatus*.** Aquaculture. 281, 151-154, 2008.

GETAHUN, K.; KELAY, B.; BEKANA, M. & LOBAGO, F. **Bovine mastitis and antibiotic resistance patterns in Selalle smallholder dairy farms, central Ethiopia.** Trop. Anim. Health Prod. 40, 261-268, 2008.

GHERARDI, G.; IMPERI, M.; BALDASSARRI, L.; PATARACCHIA, M.; ALFARONE, G.; RECCHIA, S.; OREFICI, G.; DICUONZO, G. & CRETÌ, R. **Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy.** J. Clin. Microbiol. 45, 2909–2916, 2007.

GINSBURG, I. **Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation.** Lancet Infect. Dis. 2, 172-179, 2002.

GLASER, P.; RUSNIOK, C.; BUCHRIESER, C.; CHEVALIER, F.; FRANGEUL, L.; MSADEK, T.; ZOUINE, M.; COUVE, E.; LALIOUI, L.; POYART, C.; TRIEU-CUOT, P. & KUNST, F. **Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease.** Mol. Microbiol. 45, 1499–1513, 2002.

GORDILLO, M. E.; SINGH, K. V.; BAKER, C. J. & MURRAY, B. E. **Typing of group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis.** J. Clin. Microbiol. 31, 1430-1434, 1993.

GRAVEKAMP, C.; ROSNER, B. & MADOFF, L. C. **Deletion of repeats in the alpha c protein enhances the pathogenicity of group B streptococci in immune mice.** Infect. Immun. 66, 4347-4354, 1998.

GRUET, P.; MAINCENT, P.; BERTHELOT, X. & KALTSATOS, V. **Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives.** Adv. Drug Rev. 50, 245-259, 2001.

GUTEKUNST, H.; EIKMANN, B. J. & REINSCHIED, D. J. **The novel fibrinogen-binding protein fbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells.** Infect. Immun. 72, 3495–3504, 2004.

GYGAX, S. E.; SCHUYLER, J. A.; TRAMA, J. P.; MORDECHAI, E. & ADELSON, M. E. **Detection of erythromycin and clindamycin resistance genes in group B streptococcal clinical isolates and cervicovaginal–rectal swabs.** Microb. Drug Resist. 31, 119-123, 2007.

HAMILTON, A.; POPHAM, D. L.; CARL, D. J.; LAUTH, X.; NIZET, V. & JONES, A. L. **Penicillin-binding protein 1a promotes resistance of group B streptococcus to antimicrobial peptides.** Infect. Immun. 74, 6179–6187, 2006.

HANSEN, S. M.; ULDBJERG, N.; KILIAN, M. & SØRENSEN, U. B. S. **Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants.** J. Clin. Microbiol. 42, 83–89, 2004.

HARRIS, T. O.; SHELVER, D. W.; BOHNSACK, J. F. & RUBENS, C. E. **A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen.** J. Clin. Invest. 111,61–70, 2003.

HEATH, P. T.; BALFOUR, G.; WEISNER, A. M.; EFSTRATIOU, A.; LAMAGNI, T. L.;

TIGHE, H.; O'CONNELL, L. A.; CAFFERKEY, M.; VERLANDER, N. Q.; NICOLL, A. & MCCARTNEY, A. C. **Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days.** Lancet, 363, 292–294, 2004.

HEDÉN, L. O.; FRITZH, E. & LINDAHL, G. **Molecular characterization of an IgA receptor from group B streptococci: sequence of the gene, identification of a proline-rich region with unique structure and isolation of N-terminal fragments with IgA-binding capacity.** Eur. J. Immunol. 21, 1481-1490, 1991.

HENSLER, M. E.; LIU, G. Y.; SOBCZAK, S.; BENIRSCHKE, K.; NIZET, V. & HELDT, G. P. **Virulence role of group B streptococcus beta-hemolysin/cytolysin in a neonatal rabbit model of early-onset pulmonary infection.** J. Infect. Dis. 191, 1287-1291, 2005.

HENSLER, M. E.; MIYAMOTO, S. & NIZET, V. **Group B streptococcal beta hemolysin/cytolysin directly impairs cardiomyocyte viability and function.** PLoS ONE 3, e 2446, 2008.

HENSLER, M. E.; QUACHA, D.; HSIEHA, C. J.; DORAN, K. S. & NIZET, V. **CAMP factor is not essential for systemic virulence of group B streptococcus.** Microb. Pathol. 44, 84–88, 2008.

HERBERT, M. A.; BEVERIDGE, C. J. E. & SAUNDERS, N. J. **Bacterial virulence factors in neonatal sepsis: group B streptococcus.** Curr. Opin. Infect. Dis. 17, 225-229, 2004.

HÉRY-ARNAUD, G.; BRUANT, G.; LANOTTE, P.; BRUN, S.; PICARD, B.; ROSENAU,

A.; VAN DER MEE-MARQUET, N.; RAINARD, P.; QUENTIN, R. & MEREGHETTI, L. **Mobile genetic elements provide evidence for a bovine origin of clonal complex 17 of *Streptococcus agalactiae*.** Applied Environ. Microbiol. 73, 4668-4672, 2007.

HSUEH, P.; TENG, L.; LEE, L.; HO, S.; YANG, P. & LUH, K. **High incidence of erythromycin resistance among clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan.** Antimicrob. Agents Chemother. 45, 3205-3208, 2001.

HULL, J. R.; TAMURA, G. S. & CASTNER, D. G. **Interactions of the streptococcal C5a peptidase with human fibronectin.** Acta Biomater. 4, 504-513, 2008.

JARVA, H.; JOKIRANTA, T. S.; WURZNER, R. & MERI, S. **Complement resistance mechanisms of streptococci.** Mol. Immunol. 40, 95-107, 2003.

JELINKOVÁ, J. & MOTLOVA, J. **Worldwide distribution of two new serotypes of group B streptococci: type IV and provisional type V.** J. Clin. Microbiol. 21, 361-362, 1985.

Jensen, N. E. **Experimental bovine group-B streptococcal mastitis induced by strains of human and bovine origin.** Nord. Vet. Med. 34, 441-450, 1982.

JENSEN, N. E. & AARESTRUP, F. M. **Epidemiological aspects of group B streptococci of bovine and human origin.** Epidemiol. Infect. 117, 417-422, 1996.

JOHRI, A. K.; PAOLETTI, L. C.; GLASER, P.; DUA, M.; SHARMA, P. K.; GRANDI, G. & RAPPUOLI, R. **Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development .**

Nature Reviews. 4, 932-942, 2006.

JONES, A. L.; KNOLL, K. M. & RUBENS, C. E. **Identification of *Streptococcus agalactiae* virulence genes in the neonatal rat sepsis model using signature-tagged mutagenesis.** Mol. Microbiol. 37, 1444-1455, 2000.

JONES, N.; BOHNSACK, J. F.; TAKAHASHI, S.; OLIVER, K. A.; CHAN, M. S.; KUNST, F.; GLASER, P.; RUSNIOK, C.; CROOK, D. W. M.; HARDING, R. M.; BISHARAT, N. & SPRATT, B. G. **Multilocus sequence typing system for group B streptococcus.** J. Clin. Microbiol. 41, 2530-2536, 2003.

JONSSON, I. M.; PIETROCOLA, G.; SPEZIALE, P.; VERDRENGH, M. & TARKOWSKI, A. **Role of fibrinogen-binding adhesin expression in septic arthritis and septicemia caused by *Streptococcus agalactiae*.** J. Infect. Dis. 192, 1456-1464, 2005.

KEEFE, G.P. ***Streptococcus agalactiae* mastitis: a review.** Can. Vet. 38, 429-437, 1997.

KO, W. C.; LEE, H. C.; WANG, L. R.; LEE, C. T.; LIU, A. J. & WU, J. J. **Serotyping and antimicrobial susceptibility of group B streptococcus over an eight-year period in southern Taiwan.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20, 334-339, 2001.

KONG, F.; GOWAN, S.; MARTIN, D.; JAMES, G. & GILBERT, G. L. **Molecular profiles of group B streptococcal surface protein antigen genes: relationship to molecular serotypes.** J. Clin. Microbiol. 40, 620-626, 2002.

KONG, F.; MA, L.; GILBERT, G. L. **Simultaneous detection and serotype identification of *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization.** J. Med. Microbiol. 54, 1133–1138, 2005.

KOTIW, M.; ZHANG, G. W.; DAGGARD, G.; REISS-LEVY, E.; TAPSALL, J. W. & NUMA, A. **Late-onset and recurrent neonatal group B streptococcal disease associated with breast-milk transmission.** Pediatr. Dev. Pathol. 6, 251-256, 2003.

KOWAMURA, Y.; FUJIWARA, H.; MISHIMA, N.; TANAKA, Y.; TANIMATO, A.; IKAWA, S.; ITOH, Y. & EZAKI, T.. **First *Streptococcus agalactiae* isolates highly resistant to quinolones, with point mutations in *gyrA* and *parC*.** Antimicrob. Agents Chemother. 47, 3605-3609, 2003.

LACHENAUER, C. S.; CRETI, R.; MICHEL, J. L. & MADOFF, L. C. **Mosaicism in the alpha-like protein genes of group B streptococci.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 9630-9635, 2000.

LACHENAUER, C. S.; KASPER, D. L.; SHIMADA, J.; ICHIMAN, Y.; OHTSUKA, H.; KAKU, M.; PAOLETTI, L. C.; FERRIERI, P. & MADOFF, L. C. **Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women.** J. Infect. Dis. 179, 1030-1033, 1999.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 15, 680-685, 1970.

LANCEFIELD, R. D. **Serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci.** J. Exp. Med. 57, 571-595, 1933.

LANCEFIELD, R. D. **Serological differentiation of specific types of bovine haemolytic streptococci (group B).** J. Exp. Med. 59, 444-458, 1934.

LANG, S. & PALMER, M. **Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin.** J. Biol.Chem. 278, 38167-38173, 2003.

LE THOMAS-BORIES, I.; FITOUSSI, F.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; RAYMOND, J.; BRAHIMI, N.; BIDET, P.; LEFRANC, V. & BINGEN, E. **Clonal relationship between U.S. and french serotype V group B streptococcus isolates.** J. Clin. Microbiol. 39, 4526-4528, 2001.

LI, J.; KASPER, D. L.; AUSUBEL, F. M.; ROSNER, B. & MICHEL, J. L. **Inactivation of the a C protein antigen gene, bca, by a novel shuttle/suicide vector results in attenuation of virulence and immunity in group B streptococcus.** Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 94, 133251-13256, 1997.

LI, S. & JEDRZEJAS, M. T. **Hyaluronan binding and degradation by *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase.** J. Biol. Chem. 276, 41407-41416, 2001.

LINDAHL, G.; STALHAMMAR-CARLEMALM, M. & ARESCHOUG, T. **Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in others bacterial pathogens.** Clin. Microbiol. Rev. 18, 102-127, 2005.

LIU, G. Y.; DORAN, K. S.; LAWRENCE, T.; TURKSON, N.; PULITI, M.; TISSI, L. & NIZET, V. **Sword and shield: Linked group B streptococcal  $\beta$ -hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 14491-14496, 2004.

LOPARDO, H. A.; VIDAL, P.; JERIC, P.; CENTRON, D.; PAGANINI, H.; FACKLAM, R. R.; THE ARGENTINIAN STREPTOCOCCUS STUDY GROUP & ELLIOTT, J. **Six-month multicenter study on invasive infections due to group B streptococci in Argentina.** J. Clin. Microbiol. 41, 4688-4694, 2003.

LUAN, S. L.; GRANLUND, M.; SELLIN, M.; LAGERGÅRD, T.; SPRATT, B. G. & NORGREN, M. **Multilocus sequence typing of swedish invasive group B streptococcus isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching.** J. Clin. Microbiol. 43, 3727–3733, 2005.

LYYTIKÄINEN, O.; NUORTI, J. P.; HALMESMÄKI, E.; CARLSON, P.; UOTILA, J.; VUENTO, R.; RANTA, T.; SARKKINEN, H.; ÄMMÄLÄ, M.; KOSTIALA, A. & JÄRVENPÄÄ, A. L. **Invasive group B streptococcal infections in Finland: a population-based study.** Emerg. Infect. Dis. 9, 469-473, 2003.

MADOFF, L. C.; MICHEL, J. L.; GONG, E. W.; KLING, D. E. & KASPER, D. L. **Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha c protein.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4131-4136, 1996.

MADOFF, L. C.; PAOLETTI, L. C.; TAI, J. Y. & KASPER, D. L. **Maternal immunization**

**of mice with group B streptococcal type III polysaccharide-beta C protein conjugate elicits protective antibody to multiples serotypes.** J. Clin. Invest. 94, 286-292, 1994.

MARQUES, M. B.; KASPER, D. L.; PANGBURN, M. K. & WESSELS, M. R. **Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci.** Infect. Immun. 60, 3986-3993, 1992.

MARTINEZ, G.; HAREL, J.; HIGGINS, R.; LACOUTURE, S.; DAIGNAULT, D. & GOTTSCHALK, M. **Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis.** J. Clin. Microbiol. 38, 71-78, 2000.

MARTINS, E. R.; PESSANHA, M. A.; RAMIREZ, M.; MELO-CRISTINO, J. & PORTUGUESE GROUP FOR THE STUDY OF STREPTOCOCCAL INFECTIONS. **Analysis of group B streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness** J. Clin. Microbiol. 45, 3224-3229, 2007.

MAISEY, H. C.; DORAN, K. S. & NIZET, V. **Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence.** Expert Rev. Mol. Med. 10, 1-16, 2008.

MAISEY, H. C.; HENSLER, M.; NIZET, V. & DORAN, K. S. **Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells.** J. Bacteriol. 189, 1464–1467, 2007.

MCCRACKEN G. H. JR. **Group B streptococci: the new challenge in neonatal infections.**  
J. Pediatr. 82, 703-706, 1973.

MEDINA, E.; GOLDMANN, O.; TOPPEL, A. W. & CHHATWAL, G. S. **Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion.** J. Infect. Dis. 187, 597–603, 2003.

MEDINA, E.; ROHDE, M. & CHHATWAL, G. S. **Intracellular survival of *Streptococcus pyogenes* in polymorphonuclear cells results in increased bacterial virulence.** Infect. Immun. 71, 5376–5380, 2003.

MEREGHETTI, L.; SITKIEWICZ, I.; GREEN, N. M.; MUSSER, J. M. **Extensive adaptive changes occur in the transcriptome of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus) in response to incubation with human blood.** PLoS ONE 3, e3143, 2008.

MERL, K.; ABDULMAWJOOD, A.; LÄMMLER, C. & ZSCHÖCK, M. **Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis.** FEMS Microbiol. Lett., 226, 87-92, 2003.

MICHEL, J. L.; MADOFF, L. C.; KLING, D. E.; KASPER, D. L. & AUSUBEL, F. M. **Cloned alpha and beta C-protein antigens of group B streptococci elicit protective immunity.** Infect. Immun. 59, 2023-2028, 1991.

MICHEL, J. L.; MADOFF, L. C.; OLSON, K.; KLING, D. E.; KASPER, D. L. & AUSUBEL, F. M. **Large identical, tandem repeating units in the c protein alpha antigen**

**gene, bca, of group B streptococci.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 10060-10064, 1992.

MOLLERACH, A.; MÉNDEZA, E.; MASSAC, R. & CONZAD, J. ***Streptococcus agalactiae* aislados en Santa Fe, Argentina: estudio de la sensibilidad a antibióticos de uso clínico y mecanismos de resistencia a eritromicina y clindamicina.** Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 25, 66-70, 2007.

MOSABI, J.M.; ARIMI, S.M. & KANG'ETHE, E.K. **Isolation and characterization of group B streptococci from human and bovine sources within and around Nairobi.** Epidemiol. Infect., 118, 215-220, 1997.

MOTLOVÁ, J.; STRAKOVÁ, L.; URBÁSKOVÁ, P.; SAK, P. & SEVER, T. **Vaginal & rectal carriage of *Streptococcus agalactiae* in the Czech Republic: incidence, serotypes distribution & susceptibility to antibiotics.** Indian J. Med. Res. 119, 84-87, 2004.

MOYO, S. R.; MAELAND, J. A. & BERGH, K. **Typing of human isolates of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus, GBS) strains from Zimbabwe.** J. Med. Microbiol. 51, 595-600, 2002.

MUSSER, J. M.; MATTINGLY, S. J.; QUENTIN, R.; GOUDEAU, A. & SELANDER, R. K. **Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) causing invasive neonatal disease.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4731-4735, 1989.

NEALON, T.J. & MATTINGLY, S.J. **Association of elevated levels of cellular lipoteichoic**

**acids of group B streptococci with human neonatal disease.** Infect. Immun. 39,1243–1251, 1983.

NEALON, T.J. & MATTINGLY, S.J. **Kinetic and chemical analyses of the biologic significance of lipoteichoic acids in mediating adherence of serotype III group B streptococci.** Infect. Immun. 50, 107–115, 1985.

NIZET, V. **Streptococcal  $\beta$  hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis.** Trends in Microbiology 10, 575-580, 2002.

NIZET, V.; GIBSON, R.L.; CHI, E.Y.; FRAMSON, P.E.; HULSE, M. & RUBENS, C.E. **Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells.** Infect. Immun. 64, 3818-3826, 1996.

OLIVEIRA, I. C. M. **Caracterização genotípica de cepas clínicas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de humanos e bovinos.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes / UFRJ. 2001.

Oliveira, I. C. M. **Caraterização molecular e relacionamento genético de cepas de *Streptococcus agalactiae* de origem humana e bovina.** Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes / UFRJ. 2005.

OLIVEIRA, I. C. M.; DE MATTOS, M. C.; AREAL, M. F. T.; FERREIRA-CARVALHO, B. T.; FIGUEIREDO, A. M. S. & BENCHETRIT, L. C. **Pulsed-field gel electrophoresis of human group B streptococci isolated in Brazil.** J. Chemother. 17, 258-263, 2005.

OLIVEIRA, I. C. M., MATTOS, M. C. DE, PINTO, T. C. A.; FERREIRA-CARVALHO, B. T., BENCHETRIT, L. C., WHITING, A. A., BOHNSACK, J. F., FIGUEIREDO, A. M. S. **Genetic relatedness between group B streptococci originating from bovine mastitis and a human group B streptococcus type V cluster displaying an identical pulsed-field gel electrophoresis pattern.** Clin. Microbiol. Infect. 12, 887 – 893, 2006.

OPAL, S. M.; CROSS, A.; PALMER, M. & ALMAZAN R. **Group B streptococcal sepsis in adults and infants. Contrasts and comparisons.** Arch. Intern. Med. 148, 641-645, 1988.

PAOLETTI, L. J.; BRADFORD, J. & PAOLETTI, L. C. **A serotype VIII strain among colonizing group B streptococcal isolates in Boston, Massachusetts.** J. Clin. Microbiol. 37, 3759-3760, 1999.

PEREIRA, M. P. **Análise de proteínas totais de cepas de *Streptococcus agalactiae* tolerantes e não tolerantes à penicilina.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes / UFRJ. 2005.

PERSSON, E.; BERG, S.; TROLLFORS, B.; LARSSON, P.; EK, E.; BACKHAUS, E.; CLAESSION, B. E. B.; JONSSON, L.; RADBERG, G.; RIPA, T. & JOHANSSON, S. **Serotypes and clinical manifestations of invasive group B streptococcal infections in western Sweden 1998–2001** Clin. Microbiol. Infect. 10, 791–796, 2004.

PHILPOT, W. N. & NICKERSON, S. C. **Mastitis: counter attack.** Naperville: Babson Bros, 1991. 150 p.

PIERNO, M.; MARAVIGNA, L.; PIAZZA, R.; VISAI, L. & SPEZIALE, P. **FbsA-driven fibrinogen polymerization: a bacterial “deceiving strategy”**. Phys. Rev. Lett. 96, 028108, 2006.

PIETROCOLA, G.; SCHUBERT, A.; VISAI, L.; TORTI, M.; FITZGERALD, J. R.; FOSTER, T. J.; REINSCHIED, D. J. & SPEZIALE, P. **FbsA, a fibrinogen-binding protein from *Streptococcus agalactiae*, mediates platelet aggregation**. Blood. 105, 1052-1059, 2005.

PLEASS, R. J.; ARESCHOUG, T.; LINDAHL, G. & WOOF, J. F. **Streptococcal IgA-binding proteins bind in the Ca<sup>2</sup>-Ca<sup>3</sup> interdomain region and inhibit binding of IgA to human CD89**. J. Biol. Chem. 276, 8197–8204, 2001.

POUTREL B. & DORE, J. **Virulence of human and bovine isolates of group B streptococci (types Ia and III) in experimental pregnant mouse models**. Infect. Immun. 47, 94-97, 1985.

POYART, C.; LAMY, M. C.; BOUMAILA, C.; FIEDLER, F. & TRIEU-CUOT, P. **Regulation of D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* involves a novel two-component regulatory system**. J. Bacteriol. 183, 6324–6334, 2001.

POYART, C.; PELLEGRINI, E.; MARCEAU, M.; BAPTISTA, M.; JAUBERT, F.; LAMY, M. C. & TRIEU-CUOT, P. **Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells**. Mol. Microbiol. 49, 1615–1625, 2003.

PULITI, M.; NIZET, V.; VON HUNOLSTEIN, C.; BISTONI, F.; MOSCI, P.; OREFICI, G. & TISSI, L. **Severity of group B streptococcal arthritis is correlated with beta-hemolysin expression.** J. Infect. Dis. 182, 824-832, 2000.

QUENTIN, R.; HUET, H.; WANG, F. S.; GESLIN, P.; GOUDEAU, A. & SELANDER, R. K. **Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by multilocus enzyme genotype and serotype: identification of multiple virulent clone families that cause invasive neonatal disease.** J. Clin. Microbiol. 33, 2576-2581, 1995.

RAJAGOPAL, L.; CLANCY, A.; & RUBENS; C.E. **A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence.** J. Biol. Chem. 278, 14429–14441, 2003.

RAJAGOPAL, L.; VO, A.; SILVESTRONI, A. & RUBENS, C. E. **Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*.** Mol. Microbiol. 56, 1329–1346, 2005.

RING, A.; BRAUN, J.S.; POHL, J.; NIZET, V.; STREMMEL, W. & SHENEP, J.L. **Group B streptococcal beta-hemolysin induces mortality and liver injury in experimental sepsis.** J. Infect. Dis. 185, 1745-1753, 2002.

ROLLAND, K.; MAROIS, C.; SIQUIER, V.; CATTIER, B. & QUENTIN, R. **Genetic features of *Streptococcus agalactiae* strains causing severe neonatal infections, as**

**revealed by pulse-field gel electrophoresis and hylB gene analysis.** J. Clin. Microbiol. 7, 1892-1898, 1999.

ROSS, P. W. **Ecology of group B streptococci.** In: Streptococci. Skinner, F. A. & Quesnel, L. B. (ed). First edition. New York. Academic Press. p. 127, 1978.

SANTI, I.; SCARSELLI, M.; MARIANI, M.; PEZZICOLI, A.; MASIGNANI, V.; TADDEI, A.; GRANDI, G.; TELFORD, J. L. & SORIANI, M. **BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood.** Mol. Microbiol. 63, 754–767, 2007.

SAO JOSE, A. S.; MIYAZAKI, N. H. T.; JUNIOR, R. H.; MATTOS-GUARALDI, A. L. & NAGAO, P. E. **Intracellular viability in human non-polarized respiratory epithelial HBE 14o- cells by group B *Streptococcus* serotype III clinical isolates presenting 162-kb and 183-kb virulence markers.** Inter. J. Mol. Med. 17, 533-538, 2006.

SAVOIA, D.; GOTTIMER, C.; CROCILLA, C.; ZUCCA, M. ***Streptococcus agalactiae* in pregnant women: phenotypic and genotypic characters** J. Infect. 56, 120-125, 2008.

SCHOENING, T. E.; WAGNER, J. & ARVAND, M. **Prevalence of erythromycin and clindamycin resistance among *Streptococcus agalactiae* isolates in Germany.** Clin. Microbiol. Infect. 11, 577 – 596, 2005.

SCHRAG, S. J.; HADLER, J. L. ARNOLD, K. E. MARTELL-CLEARY, P.; REINGOLD, A. & SCHUCHAT, A. **Risk factors for invasive, early-onset *Escherichia coli* infections in**

**the era of widespread intrapartum antibiotic use.** Pediatrics 118, 570-576, 2006.

SCHRAG, S. J.; ZYWICKI, S.; FARLEY, M. M.; REINGOLD, A.; HARRISON, L. H.; LEFKOWITZ, L. B.; HADLER, J. L.; DANILA, R.; CIESLAK, P. R. & SCHUCHAT, A. **Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis.** N. Engl. J. Med. 342, 15-20, 2000.

SCHUBERT, A.; ZAKIKHANY, K.; PIETROCOLA, G.; MEINKE, A.; SPEZIALE, P.; EIKMANN, B. J. & REINSCHIED, D. J. **The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells.** Infect. Immun. 72, 6197–6205, 2004.

SCHUBERT, A.; ZAKIKHANY, K.; SCHREINER, M.; FRANK, R.; SPELLERBERG, B.; EIKMANN, B. J. & REINSCHIED, D. J. **A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligands binding sites.** Mol. Microbiol. 46, 557-569, 2002.

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

SENDI, P.; JOHANSSON, L. & NORRBY-TEGLUND, A. **Invasive group B streptococcal disease in non-pregnant adults a review with emphasis on skin and soft-tissue infections.** Infection, 36, 100–111, 2008.

SEVERI, E.; HOOD, D. W. & THOMAS, G. H. **Sialic acid utilization by bacterial**

**pathogens.** Microbiol., 153, 2817–2822, 2007.

SHAKLEINA, E.; DMITRIEV, A.; TKACIKOVA, L.; SUVOROV, A.; MIKULA, I. & TOTOLIAN, A. **Presence of insertion sequences (IS elements) in group B streptococci of bovine origin.** Indian J. Med. Res., 119, 242-246, 2004.

SHELVER, D.; RAJAGOPAL, L.; HARRIS, T.O. & RUBENS, C.E. **MtaR, a regulator of methionine transport, is critical for survival of group B streptococcus *in vivo*.** J. Bacteriol. 185, 6592–6599, 2003.

SILVA FILHO, R. G. **Propriedades do *Streptococcus* do grupo B crescidos *in vivo* usando câmaras permeáveis intra-peritoneais.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes/UFRJ. 1991.

SILVERMAN, N. S.; MORGAN, M. & NICHOLS, W. S., **Antibiotic resistance patterns of group B streptococcus in antenatal genital cultures.** J. Reprod. Med. 45, 979-982, 2000.

SIMÕES, J. A.; ALVES, V. M. N.; FRACALANZZA, S. E. L.; CAMARGO, R. P. S.; MATHIAS, L.; MILANEZ, H. M. B. P.; BROLAZO, E.M. **Phenotypical characteristics of group B streptococcus in parturients.** Braz. J. Infect. Dis. 11, 261-266, 2007.

SINGH, A.; GOERING, R. V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S. T. & ZERVOS, M. J. **Application of molecular techniques to the study of hospital infection.** Clin. Microbiol. Rev. 19, 512-530, 2006.

SKJAERVOLD, N. K.; BERGH, K. & BEVANGER, L. **Distribution of PFGE types of invasive Norwegian group B streptococci in relation to serotypes.** Indian J. Med. Res. 119, 201 – 204, 2004.

SLOTVED, H. C.; KONG, F.; LAMBERTSEN, L.; SAUER, S.; GILBERT, G. L. **Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype.** J. Clin. Microbiol. 45, 2929 – 2936, 2007.

SMÂNIA, A. J. **Isolamento de estreptococos do grupo B, de gestantes e neonatos, em Florianópolis (SC).** Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes / UFRJ. 1986.

SPELLERBERG, B. **Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections.** Microbiol. Infect. 2, 1733-1742, 2000.

SPELLERBERG, B.; MARTIN, S.; BRANDT, C. & LUTTICKEN, R. **The *cyl* genes of *Streptococcus agalactiae* are involved in the production of pigment.** FEMS Microbiol. Lett. 188, 122-125, 2000.

SPELLERBERG, B.; ROZDZINSKI, E.; MARTIN, S.; WEBER-HEYNEMANN, J.; SCHNITZLER, N.; LUTTICKEN, R. & PODBIELSKI, A. **Lmb, a protein with similarities to the *LraI* adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin.** Infect. Immun. 67, 871-878, 1999.

STRAUS, D. C.; YEUNG, M. K.; DURHAM, D. L. & MATTINGLY, S. J. **Lack of**

**virulence of bovine type III *Streptococcus agalactiae* strains for mice correlates with reduced *in vitro* production of extracellular type-specific antigen.** *Curr. Microbiol.* 7, 251-256, 1982.

SUKHANANAND, S.; DOGAM, B.; AYODELE, M. O.; ZADOKS, R. N.; GRAVER, M. P. J.; DUMAS, N. B.; SCHUKKEN, Y. H.; BOOR, K. J. & WIEDMANN, M. **Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates.** *J. Clin. Microbiol.* 43, 1177-1186, 2005.

TELFORD, J.L.; BAROCCHI, M. A.; MARGARIT, I.; RAPPUOLI, R.; AND GRANDI, G. **Pili in gram-positive pathogens.** *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 509–519, 2006.

TENENBAUM, T.; SPELLERBERG, B.; ADAM, R.; VOGEL, M.; KIM, K. S.; SCHROTEN, H. ***Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb.** *Microbes Infect.* 9, 714-720, 2007.

TSOLIA, M.; PSOMA, M.; GAVRILI, S.; PETROCHILOU, V.; MICHALAS, S.; LEGAKIS, N.; KARPATIOS TH. **Group B streptococcus colonization of Greek pregnant women and neonates: prevalence, risk factors and serotypes.** *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 832–838, 2003.

TYRRELL, G. J.; SENZILET, L. D.; SPIKA, J. S.; KERTESZ, D. A.; ALAGARATNAM, M.; LOVGREN, M.; TALBOT, J. A. & SENTINELHEALTH UNIT SURVEILLANCE SYSTEM SITE COORDINATORS. **Invasive disease due to group B streptococcal**

**infection in adults: results from a Canadian, population-based, active laboratory surveillance study – 1996.** J. Infect. Dis. 182, 168-173, 2000.

UH, Y.; JANG, I. H.; YOON, K. J. & SONG, W. **Emerging erythromycin resistance among group B streptococci in Korea.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20, 52-54, 2001.

VALENTIN-WEIGAND, P. & CHHATWAL, G. S. **Correlation of epithelial cell invasiveness of group B streptococci with clinical source of isolation.** Microb. Pathog. 19, 83–91, 1995.

VAN DEN HEEVER, L. W. & ERASMUS, M. **Group B streptococcus. Comparison of *Streptococcus agalactiae* isolated from humans and cows in the Republic of South Africa.** J. S. Afr. Vet. Assoc. 51, 93-100, 1980.

VAN DEN HEEVER, L. W. & GIESECKE, W. H. **Experimental induction of bovine mastitis with human strains of group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*).** J. S. Afr. Vet. Assoc. 51, 107-109, 1980.

VON BOTH, U.; JOHN, A.; FLUEGGE, K.; SIEDLER, A. & BERNER, R. **Molecular epidemiology of invasive neonatal *Streptococcus agalactiae* isolates in Germany.** Pediatr. Infect. Dis. J. 27, 903–906, 2008.

WASTFELT, M.; STALHAMMAR-CARLEMALM, M.; DELISSE, A. M.; CABEZON, T. & LINDAHL, G. **Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure.** J. Biol. Chem. 271, 18892-18897, 1996.

WASTFELT, M.; STALHAMMAR-CARLEMALM, M.; DELISSE, A. M.; CABEZON, T. & LINDAHL, G. **The Rib and alpha proteins define a family of group B streptococcal surface proteins that confer protective immunity.** *Adv. Exp. Med. Biol.* 418, 619-622, 1997.

WEISNER, A. M.; JOHNSON, A. P.; LAMAGNI, T. L.; ARNOLD, E.; WARNER, M.; HEATH, P. T. & EFSTRATIOU, A. **Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales.** *Clin. Infect. Dis.* 38, 1203–1208, 2004.

WILLIAMSON, M. P. **The structure and function of proline-rich regions in proteins.** *Biochem. J.* 297, 249-260, 1994.

WILKINSON, H. W. **Group B streptococcal infections in humans.** *Ann. Rev. Microbiol.* 32, 41-57, 1978.

WILKINSON, H. W. & EAGON, R. G. **Type-specific antigens of group B type Ic streptococci.** *Infect. Immun.* 4, 596-604, 1971.

YAMAMOTO, Y.; POYART, C.; TRIEU-CUOT, P.; LAMBERET, G.; GRUSS, A. & GAUDU, P. **Respiration metabolism of group B streptococcus is activated by environmental haem and quinone and contributes to virulence.** *Mol. Microbiol.* 56, 525–534, 2005.

ZALEZNIK, D. F.; RENCH, M. A.; HILLIER, S.; KROHN, M. A.; PLATT, R.; LEE, M. T.;

FLORES, A. E.; FERRIERI, P. & BAKER, C. J. **Invasive disease due group B streptococcus in pregnant women and neonates from diverse population groups.** Clin. Infect. Dis. 30, 276-281, 2000.

ZHAO, Z.; KONG, F.; ZENG, X.; GIDDING, H. F.; MORGAN, J. & GILBERT, G. L. **Distribution of genotypes and antibiotic resistance genes among invasive *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus) isolates from Australasian patients belonging to different age groups.** Clin. Microbiol. Infect. 14, 260 – 267, 2008.

**Artigo submetido à publicação na revista Veterinary Microbiology**

**Virulence characteristics of bovine and human genetically related isolates of group B streptococci**

**Corrêa, A.B.A.; Américo, M. A.; Oliveira, I. C. M.; Silva, L. G; de Mattos, M. C.;  
Ferreira, A. M. M.; Couceiro, J. N. S. S.; Fracalanza, S. E. L.; Benchetrit, L. C.**

Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
RJ 21941-590, Brazil

**ABSTRACT**

GBS have been recognized as an etiological agent of bovine infections for various decades. Then it became obvious that this bacterial species was also the cause of different human diseases. Many authors studied this possible transmission of GBS using molecular approaches to analyze the bacterial genome. In a previous study we showed a genetic relatedness between two isolates from bovine and human origin in Brazil, but there is no data about the virulence attributes of these isolates. The present study aimed to evaluate the pathogenic potential of genetically related strains 80427 and 87159 using different approaches and to compare the results with other two strains, isolated from bovine mastitis and human invasive infection without epidemiologic or genetic relatedness. Virulence genes *hylB* and *lmb* genes were detected in all strains and *bac* and *bca* were detected only in humans strains. Protein profile obtained by SDS-PAGE indicated no difference between strains. No significant differences among human and bovine isolates in adherence and invasiveness to 16HBe cells or resistance

capacity to bactericidal effect of murine macrophage were detected. However, the bovine strain 87159 showed a higher survival in human blood ( $p = 0.03$ ) and was more virulent in neonatal mice ( $p < 0,0001$ ) than the human strain 80427. As expected, isolate 87244 (bovine) was avirulent in mice. The present study shows that strains 80427 and 87159 presented human infection pattern, suggesting that isolates from human and bovine origin can express similar virulence attributes and that a limited dissemination can occur.

Keywords: group B streptococci, pathogenicity, virulence, bovine and human strains.

## **INTRODUCTION**

Group B streptococci (GBS) are the leading cause of neonatal and maternal infections and an opportunistic pathogen in immunocompromised patients and adults with underlying disease (Farley 2001, Weisner et al. 2004). The group B streptococcus was initially described in 1887 as an animal pathogen causing bovine mastitis (Colebrook & Purdie, 1937 & Fry, 1938 apud Ross, 1978). In dairy cows this organism is a major cause of mastitis, which is currently considered the economically most important disease affecting the dairy industry (Bradley, 2002).

Human infections caused by this bacteria and its presence at the human microbiota were only reported later, in the 1930s, but neonatal infections were uncommon. However, since the 1960s, numerous reports linked neonatal infections with this organism and by the 1970s GBS had become a major neonatal pathogen in different countries (Ross et al, 1978). The reasons behind the emergence of GBS neonatal disease is motive of controversy and have not been elucidated. A possible explanation has been the acquisition by humans of bovine GBS, or vice-versa. In reality, the isolation of GBS from different animal species and from humans brings interesting speculation about the virulence of these isolates from different

sources and their capacity of interspecies colonization and transmission.

A link between bovine and human has been proposed (Poutrel & Dore, 1985; Jensen & AArestrup, 1996; Héry-Arnaud et al., 2007). At 1970 some authors concluded that carriage of GBS was 40 times as high in consumers of raw milk as in those who consumed pasteurized milk (Hahn *et al.*, 1974 apud Poutrel & Dore, 1985). Brglez (1981) reported identical GBS serotypes in farms in which infected cows and humans were detected (apud Poutrel & Dore, 1985).

Later, molecular analyses were carried out in GBS isolates of these two hosts still to verify the possible interspecies transmission. Musser and colleagues (1989) studied human isolates from asymptomatic and severe ill neonates in USA and bovine isolates from mastitis in France using MLEE (multi locus enzyme electrophoresis). They detected ET-11 among serotypes III and Ia and ET-12 among serotypes III and II of both hosts. The same ribotype was detected among three bovine isolates and one human strain that was isolated from tonsils of a farm worker (Jensen & AArestrup, 1996). The same RAPD (randomly amplified of polymorphic DNA) profile was identified in a serotype V human strain and in a non typable strain, isolated from bovine milk. (Martinez et al., 2000).

Studies focusing on virulence analysis of bovine and human strains are rare. Bramley & Hogben (1982) reported the same ability of adhesion on mammary epithelial bovine gland cells in strains of both origins. After experimental inoculation, human isolates infect and cause clinical mastitis in bovine cattle (Van Den Heever & Giesecke, 1980; Jensen, 1982).

Recently, in a study conducted in Brazil, an indistinguishable PFGE (pulsed field gel electrophoresis) profile and ribotype were detected in a human strain isolated in 1980 in Rio de Janeiro and in a bovine strain isolated in 1987 in São Paulo (Oliveira et al., 2006). Using MLST (multi locus sequence typing), the authors verified a single nucleotide sequence difference in one of seven housekeeping genes studied, which assigned the bovine isolate as

ST256 and the human isolate as ST26, but both were classified at the same clonal complex. Authors still showed total homology at the analysis of partial sequencing of nine other housekeeping genes (not published data). It is important to note that these two strains have no epidemiologic relationship, were isolated from distant cities (400 kilometers) and within a seven years interval.

This study aimed to evaluate the pathogenic potential of two genetically related GBS strains, 80427 and 87159, using different approaches and to compare the results with two other strains, isolated from bovine mastitis and human invasive infection and without epidemiologic or genetic relationship.

## **METHODOLOGY**

### *Bacterial strains*

Four GBS strains previously analyzed by serotyping, PFGE and MLST (Oliveira et al., 2006) were studied. Two of them are genetically related: 80427 (isolate from human cervix in Rio de Janeiro in 1980, serotype V, PFGE profile P1 and ST 26) and 87159 (isolate from bovine mastitis in Sao Paulo in 1987, serotype V, PFGE profile A2 and ST 256). The two others strains have no epidemiologic neither genetic relationship with previously cited strains and are: 87244 (isolate from bovine mastitis in Rio de Janeiro in 1987, serotype II, PFGE profile B) and 90356 (isolate from cerebrospinal fluid in Rio de Janeiro in 1990, serotype III, PFGE profile G2). All strains belong to the culture collection of the Laboratory of Pathogenic Cocci and are kept in the frozen state in broth containing 12,5% of glycerol.

### *Polymerase chain reaction for detection of virulence genes*

DNA extraction was performed as described previously (Sambrook, Fritsh & Maniatis; 1989). DNA in the supernatant was used as the template for PCR. Fifty microliter

reaction mixtures contained 2 mM MgCl<sub>2</sub> in reaction buffer (75mM Tris-HCl, 50mM KCl, 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MgCl, pH 9,0), 1,0 unit of Taq polymerase (Biotools B&M Labs, SA), 5 µL of template DNA, 0,2nM each of dATP, dCTP, dGTP, dGTP, 20 pM of each primer and sterile water up to 50 µL. The reaction was carried out in a PCR thermocycler (Applied Systems), as follows: 94 °C for 5 min; 30 cycles each of 94°C for 30s, 53°C for 30s and 72°C for 1 min; 72°C for 4 min, for final extension. PCR amplified products were run on agarose gels (1,5 %) in buffer (8,9mM tris, 8,9 mM boric acid, 1mM EDTA, pH 8,0) and gels were stained with ethidium bromide for visualization of amplicons The 100 bp lambda ladder kit (Invitrogen) was used as a DNA size marker. Primers previously described by Corrêa et al. (unpublished data) were used for amplification of *hylB*, *lmb*, *bca* e *bac* genes (hyaluronate lyase, C5a peptidase, laminin binding protein, alfa protein and beta protein, respectively)

#### *Adherence and invasion assays*

Adherence and invasion to bronchial epithelial cells 16HBe assay were done using the protocol described by Schubert and colleagues (2004), with 3 modifications. Briefly, 16HBe (instead of A549) cells were transferred to 24-well tissue culture plates at approximately 4 x 10<sup>5</sup> cells per well and cultivated overnight in the 199 ( instead of RPMI) tissue culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). After replacement of the medium with 1 ml of fresh medium, the cells were infected with GBS strains at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 10 and incubated at 37°C for 2 h. The infected cells were subsequently washed three times with PBS. The number of cell-adhering bacteria was determined by lysis of the eukaryotic cells with triton X-100 at a final concentration of 0.01% (v/v) and subsequent determination of the number of CFU by plating appropriate dilutions of the lysates on sheep blood agar (instead of THY agar). Intracellular bacteria were determined after a further incubation of the infected cells for 2 h with 199 medium containing penicillin G (10

U) and gentamicin (100µg/ml) to kill extracellular bacteria. After three washes with PBS, the epithelial cells were lysed in triton X-100 at a final concentration of 0.01% (v/v) and the number of intracellular bacteria was determined by plating serial dilutions of the lysate onto blood agar plates. All samples were tested in triplicate, and each experiment carried out 3 times.

#### *Macrophage survival assay*

Survival inside murine macrophages after phagocytosis was evaluated using the protocol described by Poyart and colleagues (2003) with 3 modifications. Eight-week old Balb/c mice were injected intraperitoneally with 1 ml of a 10% sodium thioglycolate solution (instead bone-marrow macrophages). After 96 h, peritoneal exudate cells were harvested by washing with 199 tissue culture medium containing 10% FBS and penicillin G (10 U/ml). The cells were counted in a hemocytometer and plated into 24-well tissue culture plates. After 1h, nonadherent cells were removed by washing with medium, and adherent cells were incubated again. After 24 h cell confluent monolayers were infected with streptococci (m.o.i. of 10) in 199 medium supplemented with 10% FBS. The mixture was incubated for 15 min at 4°C to allow for bacterial adherence and then for 30 min at 37°C for bacterial invasion. After this incubation (time zero of the assay), penicillin G (10 U/ml) and gentamicin (100µg/ml; instead only gentamicin) were added to kill extracellular bacteria. To determine the number of intracellular streptococci at different times after infection, the supernatants were removed, cells were washed 3 times with PBS and then lysed with Triton X-100 at a final concentration of 0.1% (v/v). Serial dilutions of lysate from each well were plated onto sheep blood agar (instead TH agar). The number of CFU was determined after 24 h of incubation at 37°C. Three independent assays each in triplicate were carried out for each bacterial strain.

### *Human whole blood killing assay*

The assay was carried out according to protocol described by Liu and colleagues (2004) with 1 modification. GBS was grown to early logarithmic phase, washed, and resuspended in PBS. Inocula of  $10^4$  CFU in 0,3 ml were mixed with 0,6 ml of freshly drawn human blood in heparinized tubes, incubated for 3 h with agitation at 37°C, and dilutions were plated on sheep blood agar (instead TH agar) for determination for the number of CFU.

### *In vivo virulence studies*

Neonatal Balb/c murine pups (4 days old) were used for virulence studies. Animal groups were inoculated intraperitoneally with 0.01 ml of each strain in sterile saline containing  $10^4$  CFU. All animals were kept in isolated cages with their mothers during the period of the study. The number of living mice was then determined each day during a 6-day period. All animal experiments were carried out in accordance with the policies of the Animal Welfare Committee of the Federal University of Rio de Janeiro.

### *Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis*

Bacterial strains were grown up to an optical density of 0.4 at 540 nm in 5ml of Todd-Hewitt broth at 37°C, washed, and resuspended in TE buffer (Tris - HCl 10 mM pH 8.0; EDTA disodium 1 mM pH 8,0). Total proteins contents were sonicated at maximum output for 4 ½ minutes in Ultrasonic High Intensity Processor-Sigma) and centrifugated at 275 x g for 20 min. The resulting supernatant was removed and total protein content of this fraction used for electrophoretic analysis. The SDS-PAGE protocol was performed according Laemmli (1970). The supernatant fraction was mixed 1:1 with the sample buffer and 50 µl of the samples were applied onto 4–12% polyacrilamide gels and separated by electrophoresis at 200 V. Broad Range Protein Molecular Marker (Promega) was used as size marker. After

electrophoresis, proteins were stained with Coomassie brilliant blue.

### *Statistical analyses*

Differences in murine mortality after GBS inoculation were analyzed by  $\chi^2$  test. Differences in the numbers of CFU were evaluated by the Student's *t* test.

## **RESULTS**

### *Molecular characterization of strains*

The detection of genes associated to virulence of GBS *hylB*, *bac*, *bca*, and *lmb* was evaluated in multiplex reactions. In addition, detection of genes *stp* or *stk* (serine-threonine phosphatase and serine-threonine kinase, respectively) was employed as positive controls of reactions. *hylB* and *lmb* were detected in four strains while *bac* and *bca* were detected only in 80427 or 90356, respectively. SDS-PAGE indicated no banding differences between the fractions from the four different strains (Figure 1).

### *Analysis of bacterial pathogenicity.*

Adherence and invasion of GBS to mucosal surfaces (as lung) constitutes an essential step of the infectious process. To investigate the virulence for host cell adherence and invasion of GBS, strains were tested in tissue culture experiments utilizing a human lung epithelial cell line 16HBe. Data obtained showed no significant difference in relative adherence and invasiveness among human and bovine isolates ( $p > 0.5$ ; Figures 2A and 2B).

Phagocytic clearance by macrophages constitutes a major host defense mechanism encountered by GBS infecting the lung. To analyze the resistance of GBS against the microbicidal mechanisms of macrophages, bacterial survival of the strains isolated from bovine and human origin was studied in thioglycolate-elicited murine macrophages. Cell

monolayers were infected with 1 to  $5 \times 10^6$  CFU of these strains and the number of intracellular bacteria was estimated on cell lysates at selected intervals by quantitative plating on blood agar. The uptake at time zero of assay varied from  $5 \times 10^2$  CFU to  $7 \times 10^4$  CFU for the 80427 strain, from  $5 \times 10^2$  CFU to  $1 \times 10^5$  CFU for the 87159 strain, from 2 to  $6 \times 10^3$  CFU for the 87244 strain and from  $4 \times 10^3$  CFU to  $2 \times 10^4$  CFU for the 90356 strain. There was no significant difference in surviving inside murine macrophages among human and bovine isolates ( $p > 0.5$ ; Figure 2C).

Strains were also compared for the capacity to survive in freshly drawn whole human blood. Strains of the same origin (bovine or human) showed no significant statistical difference. However, bovine strain 87159 showed a more prominent survival than human strain 80427 ( $p = 0.03$ ; Figure 3A).

Except for 80427, all GBS strains are infectious isolates belonging to common serotypes usually associated to invasive neonatal infections. The capacity of the strains to induce sepsis was tested in a neonatal murine i.p. infection model. Bovine strain 87159 caused significantly higher mortality than was seen with the human strain 80427 ( $p < 0,0001$ ), causing death of all 30 mice by 48 h. All strains exhibited different Kaplan-Meier plots ( $p < 0,0001$ ). The bovine strain 87244 was avirulent in mice. (Figure 3B).

## **DISCUSSION**

Changing in GBS infections pattern was observed in last decades. Since 1970 decade the human infections were added to bovine infections (clinical and subclinical mastitis) that predominated up to then. (Ross, 1978; McCracken, 1973; Duarte et al., 2004; Héry-Arnaud et al., 2007). A point is still not answered: do strains causing disease in cattle have the same virulence potential in humans and vice versa? A link among bovine and human niches has been proposed by some authors (Poutrel & Dore, 1985; Jensen & Aarestrup, 1996; Héry-

Arnaud et al., 2007; Garcia et al., 2008).

Analysis of GBS strains of bovine and human origin could provide important information about evolution, transmission, colonization capacity and development of disease interspecies. Unfortunately studies focused on strains isolated in different regions, countries or continent and/or along different periods of time and this make them limited. (Bisharat et al, 2004). Previously studies suggested human and bovine strains belong to different genetic populations with limited interspecies transmission (Bisharat et al, 2004; Dogan et al., 2005; Sukhnanand et al., 2005).

However published studies up to now do not investigated epidemiologic and molecular characteristics of analyzed strains and this impairs the comparative analysis among those strains (Van Den Heever & Giesecke, 1980; Jensen, 1982; Poutrel & Dore, 1985; Sukhnanand et al., 2005). The present study analyzes virulence characters of strains 87159 (bovine origin) and 80427 (human origin), two GBS isolates without epidemiologic relatedness but exhibiting indistinguishable PFGE profiles, ribotypes and partial sequence of housekeeping genes and related STs. Strains 87244 (bovine origin) and 90356 (human origin) were submitted to same experimental procedures as a control. Additionally, the previously cited studies used exclusively techniques of bacterial DNA analysis to examine strains of distinct origin and then the virulence expression was neglected. The pathogenicity expression was the aim of the present study.

The two related strains showed similar results, with no statistical significant difference, when tested by adhesion and invasiveness to pulmonary epithelial cells (16HBe) assay and intracellular survival in murine macrophages. According to literature data, present study is the first analysis of adhesion and invasiveness to 16HBe cells, originated from bronchial pulmonary epithelia, by GBS isolates from cattle and human. In humans, adhesion and invasion to pulmonary epithelia steps are essential to establishment of pneumonia and

subsequent sepsis in neonates, characteristics of early onset disease (Spellerberg, 2000). In bovines GBS infection concentrates in mammary glands without systemic complications (Keefe, 1997). Others authors found no significant difference in invasion to cervix epithelial cells (HeLa) among bovine and human isolates (Sukhnanand et al., 2005).

Human strains showed equal results in human whole blood killing assay and this also happens to bovine isolates. However, the last strains showed increased resistance to killing than 80427 human isolate. Bovine isolate 87244 was avirulent in neonatal murine infection assay, as showed by other authors (Poutrel & Dore, 1985). In contrast, 87159 (bovine origin) was the most virulent in neonatal murine infection assay, including 90356 strains, isolated from a human meningitis. Together the results of present study suggest 87159 has a virulence profile expected to a human isolate.

*hylB* and *lmb* genes were detected in all strains and *bca* and *bac* genes, encoding surface proteins, were detected just in human isolates. Additionally, all isolates displayed indistinguishable protein profile after culture medium growth and SDS-PAGE analysis. This technique is not discriminatory to GBS, even testing genetically heterogeneous strains isolated from diverse hosts. Hence, the molecular analysis results do not justify the results obtained in virulence assays.

## **CONCLUSION**

The present study showed that 2 genetically related human and bovine GBS isolates were potentially virulent as expected for human strains. In addition an animal model, *in vivo* assays and molecular techniques for the study of bacterial pathogenicity are evidently complementary.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no competing financial interests.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq, FAPERJ and PRONEX. We would like to thank FAPERJ, CAPES and CNPq for the student fellowships and Dr Louis Barrucand for help in the statistical analysis.

## REFERENCES

- Bisharat, N., Crook, D. W., Leigh, J., Harding, R. M., Ward, P. N., Coffey, T. J., Maiden, M. C., Peto, T., Jones, N., 2004. Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2161–2167.
- Bradley, A., 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164, 116–128.
- Bramley, A. J., Hogben, E. M., 1982. The adhesion of human and bovine isolates of *Streptococcus agalactiae* (group B) to bovine mammary gland epithelial cells. *J. Comp. Pathol.* 92, 131–137.
- Dogan, B., Schukken, Y. H., Santisteban, C., Boor, K. J., 2005. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. *J. clin. Microbiol.* 43, 5899–5906.
- Duarte, R. S., Miranda, O. P., Bellei, B. C., Brito, M. A. V. P., teixeira, L. M., 2004. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4214–4222.
- Farley, M. M., 2001. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin. Infect. Dis.* 33, 556–561.
- Garcia, J. C., Klesius, P. H., Evans, J. J., Shoemaker, C. A., 2008. Non-infectivity of cattle *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and channel catfish, *Ictalurus*

*punctatus*. *Aquaculture*. 281,151–154.

Héry-Arnaud, G., Bruant, G., Lanotte, P., Brun, S., Picard, B., Rosenau, A., van der Meer-Marquet, N., Rainard, P., Quentin, R., Mereghetti, L., 2007. Mobile genetic elements provide evidence for a bovine origin of clonal complex 17 of *Streptococcus agalactiae*. *Applied Environ. Microbiol.* 73, 4668–4672.

Jensen, N. E., 1982. Experimental bovine group-B streptococcal mastitis induced by strains of human and bovine origin. *Nord. Vet. Med.* 34, 441–450.

Jensen, N. E., AArestrup, F. M., 1996. Epidemiological aspects of group B streptococci of bovine and human origin. *Epidemiol. Infect.* 117, 417–422.

Keefe, G.P., 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can. Vet. J.*, 38, 429–437.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680–685.

Liu, G. Y., Doran, K. S., Lawrence, T., Turkson, N., Puliti, M., Tissi, L., Nizet, V., 2004. Sword and shield: Linked group B streptococcal  $\beta$ -hemolysin\_cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14491–14496.

Martinez, G., Harel, J., Higgins, R., Lacouture, S., Daignault, D., Gottschalk, M., 2000. Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 71–78.

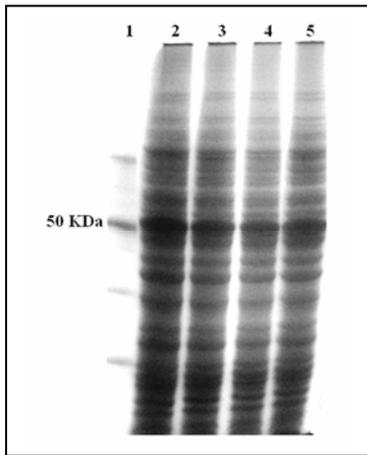
McCracken, G. H. Jr., 1973. Group B streptococci: the new challenge in neonatal infections. *J. Pediatr.* 82, 703–706.

Musser, J. M., Mattingly, S. J., Quentin, R., Goudeau, A., Selander, R. K., 1989. Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) causing invasive neonatal disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4731–4735.

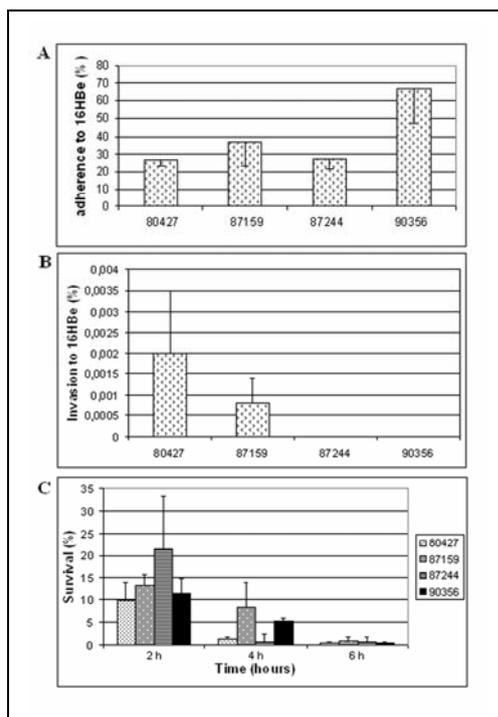
- Oliveira, I. C. M., Mattos, M. C. de, Ferreira-Carvalho, B. T., Benchetrit, L. C., Whiting, A. A., Bohnsack, J. F., Figueiredo, A. M. S., 2006. Genetic relatedness between group B streptococci originating from bovine mastitis and a human group B streptococcus type V cluster displaying an identical pulsed-field gel electrophoresis pattern. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 887–893.
- Poutrel B., Dore, J., 1985. Virulence of human and bovine isolates of group B streptococci (types Ia and III) in experimental pregnant mouse models. *Infect. Immun.* 47, 94–97.
- Poyart, C., Pellegrini, E., Marceau, M., Baptista, M., Jaubert, F., Lamy, M. C., Trieu-Cuot, P., 2003. Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol. Microbiol.* 49, 1615–1625.
- Ross, P. W., 1978. Ecology of Group B Streptococci. In: Skinner, F. A., Quesnel, L. B. (Eds.), *Streptococci*, Academic Press, New York, pp. 127.
- Sambrook, J., Fritsh, E. F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York
- Schubert, A., Zakikhany, K., Pietrocola, G., Meinke, A., Speziale, P., Eikmanns, B. J., Reinscheid, D. J., 2004. The Fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. *Infect. Immun.* 72, 6197–6205.
- Spellerberg, B., 2000. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbiol. Infect.* 2, 1733–1742.
- Sukhananand, S., Dogam, B., Ayodele, M. O., Zadoks, R. N., Graver, M. P. J., Dumas, N. B., Schukken, Y. H., Boor, K. J., Wiedmann, M., 2005. Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1177–1186.
- Van Den Heever, L. W. Giesecke, W. H., 1980. Experimental induction of bovine mastitis

with human strains of group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*). J. S. Afr. Vet. Assoc. 51, 107–109.

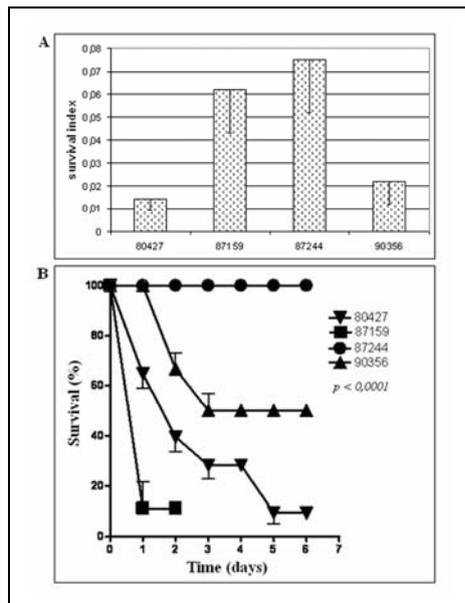
Weisner, A. M., Johnson, A. P., Lamagni, T. L., Arnold, E., Warner, M., Heath, P. T., 2004. Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales Clin. Infect. Dis. 38, 1203–1208.



**Figure 1.** SDS-PAGE banding of total products from GBS. Lane 1, molecular size marker; lane 2, 80427 human strain; lane 3, 87159 bovine strain; lane 4, 87244 bovine strain; line 5, 90356 human strain



**Figure 2.** Virulence analysis of GBS in culture cell assays. (A) Adherence to lung epithelial cell line 16HBe (3 experiments each in quadruplicate). (B) Invasion of lung epithelial cell line 16HBe (3 experiments each in quadruplicate) (C) Intracellular survival. into thioglycolate-elicited murine macrophages (3 experiments each in triplicate). Error bars indicate standard errors of the means.



**Figure 3.** Virulence analysis of GBS in human blood and in *in vivo* assay. (A) Human whole blood killing assay (2 experiments with four donors each one). Survival index = (cfu at end of assay)/(cfu at time 0). (B) Kaplan–Meier survival plot of neonatal murine infection model (at least 10 animals were used in each experimental group).

**Artigo aceito à publicação na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**

**Pulsed-field gel electrophoresis, detection of virulence determinants and antimicrobial susceptibility of type Ia group B streptococci strains isolated in Brazil**

**Ana Beatriz de A Corrêa, Ivi Cristina M de Oliveira, Tatiana de C A Pinto, Marcos C de Mattos, Leslie C Benchetrit \***

**Summary:** Group B streptococci (GBS) infections occur worldwide. Although serotyping has been used for epidemiologic purposes, it does not characterize accurately enough members of a genetically heterogeneous bacterial population. The aim of the work was to verify the genetic diversity of 45 type Ia GBS strains isolated in Brazil by using the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). 24 strains were assigned to one cluster A. All strains carried the *hylB* and *scpB* genes. The *bca* gene was detected in only 10 strains and none of the streptococci carried *bac*. 39 strains were resistant to tetracycline

**Key words:** Group B streptococci; Pulsed-field gel electrophoresis; Polymerase chain reaction

**Introduction**

Group B streptococci (GBS) are responsible for a large variety of human infections and have been recognized over the last few decades as a leading cause of perinatal disease worldwide (Farley 2001, Weisner et al. 2004). GBS are classified in serotypes (Ia, Ib, and II to VIII), which may occur in combination with the protein antigens (alpha, beta, rib; Dmitriev, 2001). Nowadays serotypes Ia, III and V are the most common in many countries

(Duarte et al., 2004; Fluegge et al., 2005; Bergseng et al., 2008; Poyart et al., 2008; von Both et al., 2008).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) used to examine GBS strains is a powerful technique for classification of the microorganisms after digestion of the genomic DNA by restriction enzymes (Benson & Ferrieri 2001, Oliveira et al. 2005, 2006; von Both et al., 2008). Franken et al. (2001) suggested that *scpB* and *lmb* genes (encoding c5a peptidase and laminin binding protein) must occur in human GBS. The *hylB* gene is frequently detected in these strains (Dore et al., 2003).

The lack of information on Ia Brazilian strains and the availability of DNA techniques led us to investigate the genetic make-up of type Ia GBS isolated in distinct regions of Brazil. Additionally, the antimicrobial susceptibility was tested to better characterize these isolates.

## **Materials and Methods**

**Bacterial strains.** Forty five human type Ia GBS strains derived from clinical specimens were obtained in Florianopolis (n = 3), a city located in the southern region of Brazil, and in São Paulo (n = 1) and Rio de Janeiro (n = 40), in the southeast of the country. Isolates were obtained from 1981 to 2002 from public health laboratories, gynecological clinics, hospitals, universities. The clinical sources included urine (n = 16), oropharynx (n = 9), vagina (n = 5), anus (n = 2), lung (n = 2), placenta (n = 1), external ear canal (n = 1) and perineum (n = 1). The source of 8 specimens remained unknown. A confirmatory identification of serotypes was carried out again by immunoprecipitation in agarose using sera produced in the research facilities of the authors and HCl antigenic extracts from the streptococci (Benchetrit et al., 1982).

**Pulsed field gel electrophoresis studies.** PFGE was performed as previously described (Oliveira et al. 2005). DNA was digested with *SmaI* restriction enzyme (Amersham) and

submitted to electrophoresis with a program as follows: switch time of 1 to 30s, 23 hrs, 120° angle at 11,3°C and a voltage gradient of 6 V/cm. The lambda ladder PFGE marker kit (New England Biolabs) was used as a DNA size marker. Gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV light. Criteria for analysis of the PFGE patterns were those suggested by Tenover et al (1995) and used in our previous studies (Oliveira et al. 2005, 2006).

**Polymerase chain reaction.** DNA extraction was performed according to Sambrook, Fritsh & Maniatis (1989). DNA fragments of the different GBS genes were amplified at a temperature of 53°C. PCR amplified products were run on agarose gels and stained with ethidium bromide. The 123 bp lambda ladder kit (Invitrogen) was used as a DNA size marker. A metabolic gene encoding the glucose 6 phosphate isomerase 1 was employed as a positive control in all reactions. Primers were designed by the authors and prepared by Promicro (São Paulo) as follows: 5' – GTACCTTGGTGCAAAGCAG – 3' and 5'– GAGAAGTTTGCTGATGTAGG – 3' (gene encoding the glucose 6 phosphate isomerase 1); 5' – CTACAATTCCAGGGAGTGCA – 3' and 5' – ACTTTCTTCCGTCCACTTAG – 3' (*bca*, encodes alpha protein); 5' – AAGCAACTAGAAGAGGAAGC – 3' and 5' – TTCTGCTCTGGTGTTTTAGG – 3' (*bac*, encodes beta protein); 5' – CCTGCTAAGACTGCTGATAC – 3' and 5' – CATAAGCATAGTCGTAAGCC – 3' (*scpB*, encodes C5a peptidase); 5' – CACCAATCCCCACTCTACTA – 3' and 5' – TGTGTCAAACCATCTATCAG– 3' (*hylB*, encodes hyaluronate lyase). One strain of *Streptococcus pyogenes* and a bovine GBS were used as negative controls. Two human GBS strains provided by Dr. Lucia Martins Teixeira (UFRJ) were used as positive controls.

**Antimicrobial susceptibility testing:** Susceptibility to 7 antimicrobial agents was examined by using the single-disk diffusion method and Clinical Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2006).

## Results

After digestion with *Sma*I, 34 electrophoretic profiles belonging to 8 clusters (A - H) were observed for the 45 strains (Figure 1). Twenty four of the strains displayed the A cluster (A1 to A16 profiles). Five isolates belonged to the B cluster (B1 to B3 profiles), 3 to the C cluster (C1 and C2 profiles), 9 to the D cluster (D1 to D9 profiles), and each of the remaining 4 strains to the E, F, G and H clusters. All strains were *bac* negative, *hylB* and *scpB* positive and 35 were *bca* negative. As expected, virulence genes were detected in control strains and the metabolic gene was detected in all reactions (Figure 2). In addition, all strains were sensitive to penicillin, vancomycin, clindamycin, erythromycin, and chloramphenicol. Resistance to tetracycline was seen in 39 isolates and sensitivity in 5 strains. Forty three GBS were sensitive to rifampin. Intermediate susceptibilities to tetracycline and rifampin were observed for 1 and 2 strains, respectively. PFGE and virulence profiles, antimicrobial susceptibilities and clinical source of strains are showed on Table 1.

## Discussion

Our data describing the molecular epidemiology of 45 Ia GBS strains isolated in Brazil show a remarkable clustering, with 24 of isolates in one cluster A. Noteworthy is the fact that the strains were collected over a period of 21 years. There was no specific local or time clustering, as clusters were spread over the 21-year time period and all the sources. Others researchers verified a more enhanced genetic heterogeneity in strains of serotype Ia isolated yet during a shorter period of time. Skjaervold et al. (2004) identified 10 different electrophoretic profiles among 12 strains isolated in 1999 and 2000 in Norway. Savoia et al. (2008) recognized 7 clusters among 16 strains isolated in 2005 and 2006 in Italy and 6 of these were allocated in one single cluster. Martins et al. (2007) however, reported that 59 of 60 serotype Ia strains isolated between 2000 and 2004 in Portugal belonged to a single cluster.

There were no data about the genetic diversity among serotype Ia Brazilian strains. A similar study was conducted by our research group to analyze types II, III and V human strains isolated in the same geographic areas and period of time (Oliveira et al., 2005). A predominant profile was clearly defined for each of these serotypes but was not identified in our Ia isolates which rather displayed a slightly higher genetic heterogeneity than others.

The *hylB* and *scpB* genes were detected in all isolates. According to the literature the *hylB* gene is uncommon in bovine GBS but is very often present in human strains. Some authors even suggest as mandatory the presence of the *scpB* gene in human isolates from infections (Franken et al. 2001, Dmitriev et al. 2001, 2004). However, Duarte et al (2005) detected *scpB* in 97% of human isolates and Dore et al (2003) described one *hylB* negative human strain. Ten of our strains carried the *bca* gene. According to the literature, between 30 and 55% of serotype Ia GBS human strains carry this *bca* gene (Dore et al., 2003; Duarte et al., 2005). In the present study the *bac* gene was not identified as it was not by Duarte et al (2005) in Brazilian isolates.

Variable susceptibilities of GBS to erythromycin and clindamycin (from 4 to 40%) are described in the literature (Uh et al. 2001, Hsueh et al. 2001; Díaz, Sánchez & Martín, 2008). Simões et al. (2007) did not detect resistance to erythromycin and clindamycin among Ia isolates collected between 2003 and 2004 in Sao Paulo. We did not either. Duarte et al. (2005) described resistance to erythromycin (5%) among Ia strains collected between 2000 and 2001 in Rio de Janeiro. In the present report susceptibility to other antimicrobials is in agreement with data of the literature (Uh et al. 2001, Hsueh et al. 2001, Simões et al., 2007).

In conclusion, a predominant cluster called the A cluster was observed among our isolates of type Ia GBS. In this cluster strains from distinct geographic areas were isolated during a long period of time. The A1 profile was identified in a strain isolated in 1984 in the southern city of Florianopolis and 18 years later in Rio de Janeiro city, that is to say a 1.150

kilometers distance between them. Our data may suggest a relevant perpetuation and dissemination capacity of this A cluster in Brazil, a country of continental dimensions and could point the way to further studies on this serotype of GBS in geographical areas of the southern hemisphere, namely, in developing countries.

### **Acknowledgments**

This investigation was supported by research grants from CNPq, FAPERJ, FINEP, MCT and The Thrasher Research Fund .We thank Dr. R. R. Facklam (CDC, Atlanta, USA) and P. Ferrieri (University of Minnesota, USA) for help in the typing program.

### **References**

Benchetrit LC, Fracalanza SEL, Peregrino H, Camelo AA, Sanches LALR 1982. Carriage of *Streptococcus agalactiae* in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil. *J Clin Microbiol* 15: 787-790.

Benson JA, Ferrieri P 2001. Rapid pulsed-field gel electrophoresis method for group B streptococcus isolates. *J Clin Microbiol* 39: 3006-3008.

Berseng H, Rygg M, Bevanger L, Bergh K 2008. Invasive group B streptococcus (GBS) disease in Norway 1996–2006. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:1193–1199.

Clinical and Laboratory Standards Institute 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 16<sup>th</sup> informational supplement. M100-S16, vol 26.

Díaz LM, Sánchez MJT, Martín, JA 2008. Prevalence and mechanisms of erythromycin and clindamycin resistance in clinical isolates of  $\beta$ -haemolytic streptococci of Lancefield groups A, B, C and G in Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect* 14: 85–87.

Dmitriev A, Hu YY, Shen AD, Surovov A, Yang YH 2001. Chromosomal analysis of group B streptococcal clinical strains: bac gene-positive strains are genetically homogeneous. *FEMS Microbiol Lett* 208: 93-98.

Dmitriev A, Surovov A, Shen AD, Yang YH 2004. Clinical diagnosis of group B streptococci

by scp gene based PCR. *Indian J Med Res* 119: 233-236.

Dore N, Bennett D, Kaliszer M, Cafferkey M, Smyth CJ 2003. Molecular epidemiology of group B streptococci in Ireland: associations between serotype, invasive status and presence of genes encoding putative virulence factors. *Epidemiol Infect* 131: 823-833.

Duarte RS, Bellei BC, Miranda OP, Brito MAVP, Teixeira LM 2005. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources. *Antimicrobial Agents Chemother* 49: 97-103.

Farley MM 2001. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin Infect Dis* 43: 556-561.

Fluegge K, Supper S, Siedler A, Berner R 2005. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in infants: results from a nationwide active laboratory surveillance study over 2 years in Germany. *Clin Infect Dis* 40:760–763.

Franken C, Haase G, Brandt C, Weber-Heynemann J, Martin S, Lämmeler C, Podbielski A, Lütticken R, Spellerberg B 2001. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. *Mol Microbiol* 41: 925-935.

Hsueh P, Teng L, Lee L, Ho S, Yang P, Luh K 2001. High incidence of erythromycin resistance among clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3205-3208.

Martins ER, Pessanha MA, Ramirez M, Melo-Cristino J, Portuguese Group for the Study of Streptococcal Infections 2007. Analysis of group B streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness. *J Clin Microbiol* 45:3224-3229.

Oliveira ICM, de Mattos MC, Areal MFT, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AMS, Benchetrit LC 2005. Pulsed-field gel electrophoresis of human group B streptococci isolated

in Brazil. *J Chemother* 17: 258-263.

Oliveira ICM, de Mattos MC, Pinto TCA, Ferreira-Carvalho BT, Benchetrit LC, Whiting AA, Bohnsack JF, Figueiredo MAS 2006. Genetic relatedness between group B streptococci originating from bovine mastitis and a human group B streptococcus type V cluster displaying an identical pulsed-field gel electrophoresis pattern. *Clin Microbiol Infect* 12: 887-893.

Poyart C, Réglier-Poupet H, Tazi A, Billoët A, Dmytruk N, Bidet P, Bingen E, Raymond J, trieu-Cuot P 2008. Invasive group B streptococcal infections in infants, France. *Emerg Infect Dis* 14:1647-1649.

Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York

Savoia D, Gottimer C, Crocilla C, Zucca M 2008. *Streptococcus agalactiae* in pregnant women: phenotypic and genotypic characters. *J Infect* 56: 120-125.

Simões JA, Alves VMN, Fracalanza SEL, Camargo RPS, Mathias L, Milanez HMBP, Brolazo EM 2007. Phenotypical characteristics of group B streptococcus in parturients. *Braz J Infect Dis* 11: 261-266

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

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Cli. Microbiol* 33: 2233-2239.

Uh Y, Jang IH, Yoon KJ, Song W 2001. Emerging erythromycin resistance among group B streptococci in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 52-54.

von Both U, John A, Fluegge K, Siedler A, Berner R 2008. Molecular epidemiology of invasive neonatal *Streptococcus agalactiae* isolates in Germany. *Pediatr Infect Dis J* 27: 903–

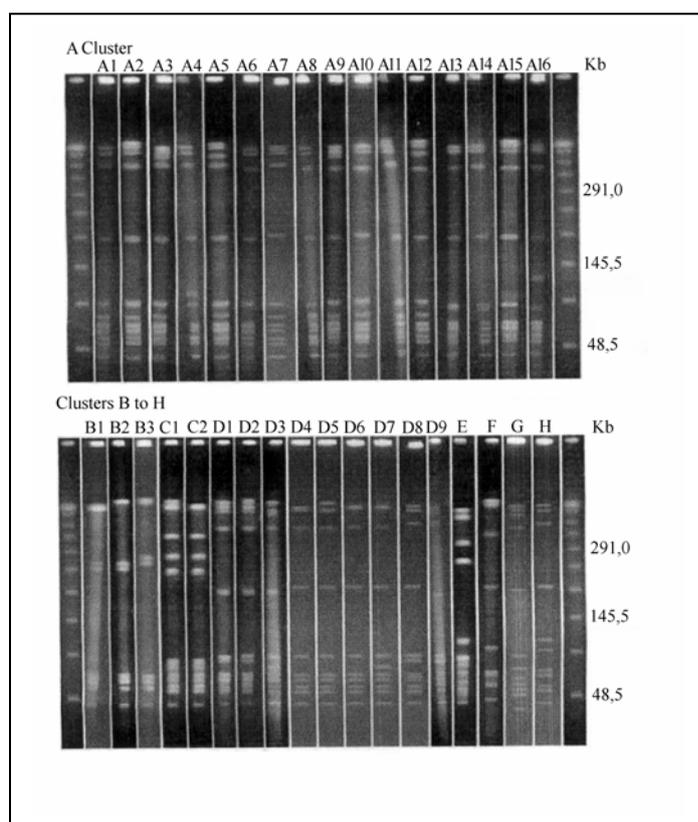
Weisner A, Johnson A, Lamegni T, Arnold E, Warner M, Heath PT, Efstratiou A 2004. Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. *Clin Infect Dis* 43: 1203-1208.

**Table 1.** PFGE, virulence profiles, antimicrobial susceptibilities and clinical sources of the Ia GBS strains

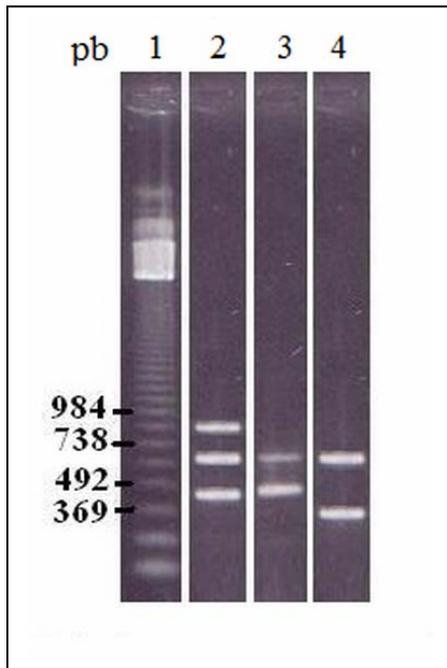
<i>PFGE profile</i>	<i>Strain</i>	<i>Year</i>	<i>Body site</i>	<i>State<sup>a</sup></i>	<i>bca</i>	<i>Tet<sup>b</sup></i>	<i>Rif<sup>c</sup></i>
A1	01019	2001	Urine	RJ	+	R	S
A1	02022	2002	Urine	RJ	-	R	S
A1	01015	2001	Urine	RJ	-	R	S
A1	84127	1984	Ear canal	SC	+	R	S
A2	89311	1989	Vagina	RJ	-	R	S
A3	85418	1985	Pharynx	Unknown	-	R	S
A3	83154	1983	Anus	SC	-	R	I
A4	01020	2001	Urine	RJ	-	R	S
A4	01016	2001	Unknown	RJ	-	R	S
A5	88606	1988	Vagina	RJ	-	R	S
A5	90351	1990	Lung	RJ	+	R	S
A6	02057	1002	Urine	RJ	+	R	S
A7	02029	2002	Unknown	RJ	-	R	S
A8	01022	2001	Urine	RJ	+	R	S
A9	81779	1981	Pharynx	SP	-	S	S
A10	90177	1990	Vagina	RJ	-	R	S
A11	01008	2001	Unknown	RJ	-	R	S
A12	88686	1988	Vagina	RJ	-	R	S
A13	02053	2002	Urine	RJ	-	R	S
A14	01009	2001	Urine	RJ	-	R	S
A14	01028	2001	Vagina	RJ	-	R	S
A14	01029	2001	Urine	RJ	-	R	I
A15	96027	1996	Urine	RJ	-	R	S
A16	02068	2002	Unknown	RJ	-	R	S
B1	90218	1990	Lung	RJ	-	S	S
B1	90220	1990	Perineum	RJ	-	R	S
B2	90222	1990	Urine	RJ	-	R	S
B3	85427	1985	Pharynx	RJ	-	I	S
B3	85685	1985	Pharynx	RJ	-	R	S
C1	91239	1991	Pharynx	RJ	+	R	S
C1	91402	1991	Pharynx	RJ	+	S	S
C2	91199	1991	Pharynx	RJ	+	R	S
D1	90096	1990	Pharynx	RJ	+	R	S
D2	02044	2002	Urine	RJ	-	R	S
D3	90352	1990	Placenta	RJ	-	S	S

D4	02008	2002	Unknown	RJ	-	R	S
D5	02016	2002	Unknown	RJ	-	R	S
D6	02035	2002	Unknown	RJ	+	R	S
D7	01017	2001	Urine	RJ	-	S	S
D8	02067	2002	Urine	RJ	-	R	S
D9	02023	2002	Urine	RJ	-	R	S
E	89496	1989	Pharynx	RJ	-	R	S
F	90194	1990	Urine	RJ	-	R	S
G	83093	1983	Anus	SC	-	S	S
H	96028	1996	Unknown	RJ	-	R	S

a, RJ, State of Rio de Janeiro; SC, State of Santa Catarina; SP, State of Sao Paulo; b, tetracycline; c, rifampin. S, sensitive; R, resistant; I, intermediate susceptibility. The genes *hylB* and *scpB* were detected in all strains; all isolates were sensitive to penicillin, vancomycin, clindamycin, erythromycin and chloramphenicol.



**Figure 1.** PFGE profiles displayed by the Ia GBS strains. Cluster A. Lanes 1 and 18, lambda ladder PFGE marker; lanes 2 to 17, A1 to A16 profiles. Clusters B to H. Lanes 1 and 20, lambda ladder marker; lanes 2 to 4, B1 to B3 profiles; lanes 5 and 6, C1 and C2 profiles; lanes 7 to 15, D1 to D9 profiles; lanes 16 to 19, E to H profiles.



**Figure 2.** PCR amplified products of a GBS positive control strain in an agarose gel. Lane 1, 123pb marker; lane 2, *scpB* (853pb), housekeeping gene (669pb) and *hylB* (444pb); lane 3, housekeeping gene and *bac* (479pb); lane 4, housekeeping gene and *bca* (376pb)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)