

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
INSTITUTO BIOMÉDICO  
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA  
HABILITAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

**FERNANDA BAPTISTA DE OLIVEIRA LUIZ**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *Streptococcus agalactiae*  
RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS**

**NITERÓI**

**2016**

**FERNANDA BAPTISTA DE OLIVEIRA LUIZ**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *Streptococcus agalactiae*  
RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal Fluminense, como requisito para a obtenção do Grau de Bacharel em Biomedicina com habilitação em Análises Clínicas.

**ORIENTADORA: PROF. DRA. ROSANA ROCHA BARROS**

**NITERÓI**

**2016**

**FERNANDA BAPTISTA DE OLIVEIRA LUIZ**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *Streptococcus agalactiae*  
RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal Fluminense, como requisito para a obtenção do Grau de Bacharel em Biomedicina com habilitação em Análises Clínicas.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dra. Rosana Rocha Barros – Orientadora**

Universidade Federal Fluminense

**Prof. Dra. Júlia Peixoto de Albuquerque**

Universidade Federal Fluminense

**Prof. Dra. Helena Rodrigues Lopes**

Universidade Federal Fluminense

**Niterói**

**2016**

Dedico este trabalho às minhas avós Lucia e Maria e ao meu pai Antônio.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus por todas as bênçãos em minha vida, por me guiar e ser minha fortaleza.

À minha orientadora, Rosana, por ser a profissional que respeito e admiro e ser um grande exemplo pra mim. Obrigada por ter me recebido, pelo carinho e por ter me ensinado tanto nesses anos, muito além da organização.

Às mulheres da minha vida: minha mãe por ter me ensinado tudo o que sou hoje, pelo caráter, força, incentivo e por ter tantas vezes colocado às minhas vontades antes da dela; minha madrinha, que também é mãe, por cuidar de mim, e sempre me incentivar; minha irmã por todas as nossas conversas, conselhos e por todo apoio.

Ao meu padrinho, Ana, Ananda e Sheila por todo incentivo, ajuda e por fazerem parte de todos os momentos da minha vida.

Aos meus amigos da faculdade Eduardo, Laís, Aylana, Higor, Manu e Matheus pelas conversas e tornarem os dias mais agradáveis; ao melhor grupo de Zueiros que formamos ao longo desses quatro anos: Pam, Sil, Gilli, Fink, Douglas, Fred, Yuri, Vane, Egon, Yago. Obrigada pelos trabalhos, seminários, churrascos, por tudo que a gente compartilhou dentro e fora da faculdade e por terem tornado cada momento único, leve e mais divertido. Agradeço a minha amiga e irmã, Érica, por estar comigo em todos os momentos e por cada palavra nos momentos que mais precisei.

À todos do laboratório que sempre me ajudaram quando precisei e pelos momentos de descontração enquanto esperávamos algum experimento. Em especial, a Andréa que me ensinou muito quando cheguei.

À coordenação e aos professores do curso de Biomedicina que contribuíram para o meu crescimento, formação e sempre estiveram dispostos a ajudar. Em especial, às professoras Márcia e Julia pelos conselhos e conversas fora da sala de aula.

Àqueles que passaram por minha vida e deixaram alguma palavra ou ensinamento. Obrigada!

## RESUMO

*Streptococcus agalactiae* (estreptococo do grupo B - EGB) é membro da microbiota dos tratos genital e gastrointestinal de humanos e a colonização vaginal de gestantes é fator de risco para ocorrência de infecções em recém-nascidos. EGB também está associado à infecção em adultos com alguma morbidade. A cápsula de EGB, composta por polissacarídeos é considerada importante fator de virulência e marcador epidemiológico, sendo descritos dez tipos (Ia, Ib, II-IX). Penicilina é a droga de escolha para profilaxia e tratamento das infecções por EGB, mas existem relatos de suscetibilidade reduzida. Macrolídeos, lincosamidas e fluoroquinolonas são alternativas terapêuticas aos pacientes alérgicos aos beta-lactâmicos, porém, o aumento de resistência a estes antimicrobianos tem sido relatado em diversas regiões. Ao longo de nossos estudos, foram detectadas 59 amostras resistentes às alternativas terapêuticas dentre 499 submetidas ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos por difusão em ágar. As amostras foram submetidas à determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de eritromicina e levofloxacina, investigação do fenótipo e genótipo de resistência aos macrolídeos, caracterização das mutações pontuais nos genes de resistência a fluoroquinolonas, tipagem capsular e avaliação da diversidade genética pela análise dos perfis de restrição do DNA, por PFGE. Onze de 12 amostras intermediárias a eritromicina por difusão em ágar apresentaram MIC  $\geq$  1  $\mu$ g/ml. Assim, 55 amostras foram resistentes a este agente e uma intermediária. Foram encontrados os seguintes fenótipos e genótipos de resistência: M e *mefA/E* (9), MLS<sub>Bc</sub> (20) com *ermA* (5), *ermB* (15); MLS<sub>Bi</sub> (27) com *ermA* (24), *ermA/ermB* (1), *ermA/mefA/E* (1) e *ermB* (1). O tipo capsular predominante foi o V (30) seguido dos tipos Ia (10) e III (9). Quatro amostras resistentes a levofloxacina, por difusão em ágar, apresentaram MIC variando de 4 >32  $\mu$ g/ml, assim, uma amostra foi intermediária e três resistentes. Por dedução das sequências nucleotídicas dos genes *gyrA* e *parC*, as amostras resistentes e intermediárias tiveram substituição em Ser-81→Leu na DNA girase. Na Topoisomerase IV, a substituição Ser-79→Phe foi observada em todas as amostras resistentes, enquanto que na amostra intermediária, foi detectada Ser-80→Pro. Foram observados 38 perfis de restrição do DNA dentre 50 amostras analisadas. Trinta e duas amostras foram alocadas em 10 grupos clonais. A maioria dos grupos foi formada por amostras do mesmo tipo capsular. A caracterização das amostras é importante para entender a disseminação da resistência aos antimicrobianos e aprimorar estratégias para o tratamento de infecções por EGB.

**Palavras-chave:** *Streptococcus agalactiae*, resistência aos antimicrobianos, diversidade genética.

## ABSTRACT

*Streptococcus agalactiae* (group B streptococci - GBS) is a member of the genital and gastrointestinal tract microbiota of humans. Vaginal colonization of pregnant women is a risk factor for the occurrence of infections in newborns. GBS is also associated with infection in adults with comorbidities. GBS capsule, composed by polysaccharides, is considered a major virulence factor and epidemiological marker, with ten types described (Ia, Ib, II-IX). Penicillin is the drug of choice for prophylaxis and treatment of GBS infections, but there are reports of reduced susceptibility. Macrolides, lincosamides and fluoroquinolones are therapeutic alternatives for patients allergic to beta-lactams, however, increased resistance rates to these antimicrobials have been reported in several regions. Along our studies, 59 isolates resistant to therapeutic alternatives were detected, among 499 submitted to antimicrobial susceptibility testing by the agar diffusion technique. These isolates were submitted to determination of erythromycin and levofloxacin minimal inhibitory concentration (MIC), macrolide resistance phenotype and genotype investigation, characterization of punctual mutations in fluoroquinolone resistance genes, capsular typing and evaluation of genetic diversity by analysis DNA restriction profiles by PFGE. Eleven of 12 erythromycin intermediate isolates by disk diffusion showed MIC  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$ . Thus, 55 isolates were resistant to this agent and one was intermediate. The following phenotypes and genotypes were found: M and *mefA/E* (9), *cMLS<sub>B</sub>* (20) with *ermA* (5), *ermB* (15); *iMLS<sub>B</sub>* (27) with *ermA* (24), *ermA/ermB* (1), *ermA/mefA/E* (1) and *ermB* (1). Capsular type V predominated (30 isolates), followed by Ia (10) and III (9). Four isolates resistant to levofloxacin, by disk diffusion, showed MIC ranging from 4 to 32  $\mu\text{g/ml}$ , thus, one isolate was intermediate and three was resistant to this agent. By deduction of the nucleotide sequences of *gyrA* and *parC* genes, resistant and intermediate isolates were replaced on Ser-81→Leu in DNA gyrase. In topoisomerase IV, Ser-79→Phe substitution was observed in all resistant isolates, while Ser-80→Pro was detected in the intermediate isolate. A total of 38 DNA profiles per PFGE were observed among 50 isolates analyzed. Thirty-two isolates were clustered in 10 clonal groups. Most of them were formed by isolates of the same capsular type. The characterization of the isolates is important to understand the spread of antimicrobial resistance and to improve strategies for the treatment of GBS infections.

**Keywords:** *Streptococcus agalactiae*, antimicrobial resistance, genetic diversity.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ala: Alanina

CDC: "Centers for Disease Control and Prevention"

CAMP: Christie, Atkins e Munch-Petersen

CLSI: "Clinical and Laboratory Standards and Prevention"

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxirribionucleotídeos fosfatados

EGB: Estreptococo do grupo B

*erm*: "erythromycin ribossomal methylase"

*gyrA*: gene que codifica a DNA girase

Glu: Glutamato

Ig: Imunoglobulina

Leu: Leucina

Lys: Lisina

M: fenótipo de resistência a macrolídeos

*mef*: "macrolide efflux"

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio

MIC: Concentração Inibitória Mínima

min: minuto

ml: mililitro

MLS<sub>B</sub>: fenótipo de resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B

MLS<sub>B</sub>C: fenótipo MLS<sub>B</sub> constitutivo

MLS<sub>B</sub>i: fenótipo MLS<sub>B</sub> indutivo

μl: microlitro

μg: micrograma

*parC*: gene que codifica topoisomerase IV

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

Phe: Fenilalanina

PFGE: Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

RNA: Ácido ribonucleico

Ser: Serina

Sec. Vag: secreção vaginal



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1) O gênero <i>Streptococcus</i> .....	11
1.2) <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	11
1.3) Fatores de virulência .....	13
1.4) Antibioticoterapia e resistência aos antimicrobianos .....	14
1.4.1) Resistência a macrolídeos .....	14
1.4.2) Resistência a fluoroquinolonas .....	16
1.4.3) Análise da diversidade genética de populações de EGB .....	17
2. OBJETIVOS .....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1) Amostras bacterianas .....	18
3.2) Reativação das amostras .....	19
3.3) Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de eritromicina e levofloxacina .....	19
3.4.2) Detecção de determinantes genéticos de resistência a macrolídeos .....	20
3.4.3) Detecção de determinantes genéticos de resistência a fluoroquinolonas .....	20
3.5) Tipificação capsular .....	21
3.6) Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) .....	22
4. RESULTADOS .....	23
5. DISCUSSÃO .....	28
6. CONCLUSÃO .....	31
7. REFERÊNCIAS .....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração dos reagentes na reação de amplificação dos genes <i>ermA</i> , <i>ermB</i> e <i>mefA/E</i> .....	20
Tabela 2: Concentração dos reagentes na reação de amplificação dos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i> .....	21
Tabela 3: Concentração dos reagentes na reação de amplificação dos genes capsulares.....	22
Tabela 4: Distribuição dos tipos capsulares e fenótipos de resistência em amostras não suscetíveis a eritromicina.....	23
Tabela 5: Mutações pontuais na região determinante de resistência a fluoroquinolonas.....	25

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos tipos capsulares das amostras não suscetíveis a eritromicina e total de amostras submetidas ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos no período de 2014 a 2013.....	24
Figura 2: Dendrograma obtido a partir da análise computacional dos perfis de restrição do DNA cromossômico.....	27

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1) O gênero *Streptococcus*

O gênero *Streptococcus* compreende cocos Gram-positivos, catalase negativos com tendência de crescimento aos pares ou em cadeias. São anaeróbios facultativos e o produto proveniente da fermentação da glicose é o ácido láctico, sendo então chamados homofermentadores. São nutricionalmente exigentes e crescem bem em ágar sangue ou em meio contendo glicose (Koneman et al., 2008; Teixeira, Merquior e Trabulsi, 2008).

A identificação dos estreptococos é baseada em alguns sistemas de classificação, como o padrão hemolítico das amostras, quando cultivados em ágar sangue. Podem ser beta-hemolíticos (lise total das hemácias), alfa-hemolíticos (lise parcial das hemácias) e não hemolíticos. As espécies podem ainda ser identificadas de acordo com características fisiológicas e antigênicas. (Teixeira, Merquior e Trabulsi, 2008). A classificação antigênica está relacionada à presença de um polissacarídeo, presente na parede celular e de composição variável, denominado carboidrato C, que pode ser determinado por técnicas imunológicas. Desta forma, os estreptococos foram divididos em grupos sorológicos (grupos de Lancefield) nomeados por letras maiúsculas do alfabeto (A, B, C, D) (Teixeira, Merquior e Trabulsi 2008).

*Streptococcus agalactiae* apresenta o antígeno do grupo B pela classificação de Lancefield, sendo, portanto chamado de estreptococo do grupo B ou EGB (Teixeira, Duarte e Trabulsi, 2008).

### 1.2) *Streptococcus agalactiae*

*Streptococcus agalactiae* foi reconhecido como agente da mastite bovina em 1887. Na década de 1930, foi descrita sua presença em secreções vaginais de pacientes assintomáticas estando associado à sepse e pneumonia puerperal. Apenas na década de 1970, foi confirmado como patógeno humano causador de bacteremia, meningite e sepse em crianças até o terceiro mês de vida com altas

taxas de mortalidade nos Estados Unidos, bem como infecções em adultos não grávidos (*apud* Teixeira, Duarte e Trabulsi, 2008)

EGB é um patógeno residente dos tratos geniturinário e gastrintestinal de pessoas saudáveis, no entanto a colonização urogenital de gestantes é um fator de risco para o recém-nascido. *S. agalactiae* é causa importante de pneumonia, sepse e meningite durante os primeiros dias de vida (Rojo-Bezares et al., 2015). A colonização vaginal/anal por EGB ocorre em 5-35% das mulheres durante a gestação e até 60% delas são portadoras intermitentes do microrganismo. O recém-nascido pode ser colonizado por transmissão vertical no útero ou no momento do parto e esta colonização pode resultar na infecção neonatal (Koneman et al., 2008). Infecções que ocorrem na primeira semana são chamadas de doença de início precoce e aquelas que ocorrem a partir da primeira semana até o terceiro mês de vida são designadas doença de início tardio (CDC, 2010).

A doença de início precoce acomete 1% a 2% dos recém-nascidos expostos ao EGB e se manifesta por pneumonia e sepse e em menor frequência por meningite (Kiss et al., 2013; CDC, 2010). Além da colonização materna durante o parto, o parto prematuro, ruptura de membrana antes do trabalho de parto e corioamnionite são alguns fatores de risco comumente associados à doença perinatal (Bastos et al., 2012; CDC, 2010).

As manifestações da doença de início tardio podem ser meningite, infecção de tecidos moles, ossos ou ainda articulações. Sua transmissão dá-se por vias horizontal e nosocomial, raramente é vertical (Juncosa-Morros et al., 2013). Foi relatado por Edwards e colaboradores (2015) incidência de 0,25 por 1000 nascimentos nos Estados Unidos.

Considerando-se que a colonização materna é o principal fator de risco para desenvolvimento das infecções neonatais, é recomendado o rastreamento das gestantes colonizadas, baseado em cultura de secreção vaginal/anal, entre as 35<sup>a</sup> a 37<sup>a</sup> semanas de gestação. Aquelas que são colonizadas devem receber quimioprofilaxia intraparto, o que tem mostrado significativa eficácia na prevenção da doença estreptocócica neonatal. (Palmeiro et al., 2010; Koneman et al., 2008; CDC 2010).

Além de sua importância como agente de infecções neonatais, *S. agalactiae* está relacionado a infecções em gestantes e adultos não grávidos. As principais são infecção do trato urinário, infecções de pele e de tecidos moles e bacteremia sem foco (Camuset et al., 2015). A prevalência de colonização vaginal/anal descrita em idosas é semelhante à de mulheres em idade fértil (20-25%) (Moltó- Garcia et al., 2016). Mulheres, idosos e pacientes imunocomprometidos estão entre o grupo de indivíduos mais suscetíveis para desenvolver infecções urinárias por EGB, especialmente mulheres na pré ou pós-menopausa, pacientes hospitalizados e indivíduos diabéticos (Schuab et al., 2015).

### **1.3) Fatores de virulência**

EGB apresenta diversos fatores de virulência que contribuem para sua capacidade de causar doenças por estarem envolvidos na adesão e invasão à célula hospedeira, danos celulares e teciduais, indução da resposta inflamatória e evasão do sistema imune. Dentre os determinantes de virulência conhecidos, destaca-se a cápsula polissacarídica (Jiang et al., 2016).

A cápsula polissacarídica é um importante fator de virulência e modulador da resposta imune humoral. A cápsula de EGB é classificada de acordo com a sua diversidade química e antigênica em dez tipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX), composta por uma combinação de polissacarídeos e com predominância de ácido siálico (Teixeira, Duarte e Trabulsi, 2008). A prevalência dos sorotipos varia conforme as regiões geográficas. Da mesma forma, alguns sorotipos predominam entre os processos infecciosos. Assim, a determinação do tipo capsular tem importância epidemiológica (Yoon et al., 2015; Koneman et al., 2008). Segundo Jiang e colaboradores (2016) os tipos Ia, Ib, II, III e V são responsáveis por 96% das infecções invasivas em neonatos e 88% das infecções em adultos.

O conhecimento sobre a prevalência global e/ou regional dos sorotipos é pré-requisito para estratégias de prevenção baseadas no desenvolvimento de uma vacina glicoconjugada, ainda em fase de estudo, e que deve conter os cinco tipos capsulares prevalentes. A vacina em teoria poderá prevenir as infecções causadas

pelos tipos mais comuns, associados a infecções neonatais, em gestantes e em adultos não grávidos (Wang et al., 2015; Moltó-García et al., 2016).

De acordo com Edwards e colaboradores (2015), as atuais estratégias de prevenção não reduziram os casos da doença de início tardio, e quando associadas à meningite, frequentemente levam à morte. A vacinação materna durante o último trimestre de gestação poderia reduzir em 85% a manifestação tardia da doença e garantiria que os anticorpos passassem para o recém-nascido em concentração suficiente para manter os níveis de proteção.

O fator CAMP também é de relevância em EGB devido à capacidade de ligação a IgG e IgM, via fração Fc e formação de pequenos poros na membrana (Lang e Palmer, 2003) e também é de auxílio na identificação laboratorial da espécie. O teste de CAMP é baseado na detecção do fator que possui ação hemolítica com a  $\beta$ -lisina produzida por *Staphylococcus aureus*, com formação de área sinérgica em forma de meia lua quando as estrias das EGB e *S.aureus* são semeadas perpendicularmente numa placa de ágar sangue (Teixeira, Duarte e Trabulsi, 2008).

#### **1.4) Antibioticoterapia e resistência aos antimicrobianos**

Penicilina é a droga de escolha para prevenção e tratamento das infecções por EGB, que permanece suscetível a este antimicrobiano (Palmeiro et al., 2010), mas relatos de suscetibilidade reduzida existem desde 2008 (Kimura et al., 2008). Tem sido relatada resistência a macrolídeos, lincosamidas e fluoroquinolonas, alternativas recomendadas aos pacientes alérgicos aos beta-lactâmicos, em diferentes áreas geográficas, inclusive em nosso meio (Phares et al., 2010; Nakamura et al., 2011; Barros et al., 2012; Campelo et al., 2012; Schuab et al., 2015; Yoon et al., 2015).

##### **1.4.1) Resistência a macrolídeos**

Os macrolídeos são conhecidos há pelo menos 50 anos, e desde que foram introduzidos para a terapêutica, representam a principal alternativa à penicilina e

cefalosporinas para o tratamento das infecções causadas por gram-positivos, especialmente por estreptococos beta-hemolíticos e pneumococos (Leclercq, 2002).

Os macrolídeos têm em sua composição dois açúcares ligados a um anel de lactona de tamanho variável, podendo conter 14 carbonos (eritromicina, claritromicina), 15 carbonos (azitromicina) ou ainda 16 carbonos (josamicina). As lincosamidas não apresentam anel de lactona em sua composição. (Leclercq, 2002).

Ainda que sejam quimicamente distintos, macrolídeos, lincosamídeos e estreptograminas B apresentam mecanismos de ação semelhantes na inibição da síntese proteica devido à ligação à fração 23S, componente da unidade 50S do ribossomo bacteriano (Amorim et al., 2009).

Um dos mecanismos de resistência a macrolídeos está relacionado a uma classe de genes denominados *erm* que sintetizam uma metilase que altera a subunidade 23S do ribossomo. Como consequência, a afinidade do antimicrobiano ao seu sítio alvo é reduzida. Este mecanismo confere resistência cruzada a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (Weisblum, 1995; Leclercq, 2002).

Os genes que codificam as metilases levam à expressão de  $MLS_B$  de forma indutiva ou constitutiva. A resistência induzível ocorre na presença de um indutor que ativa o RNAm, inicialmente inativo, e este produz a metilase. Na resistência constitutiva, o RNAm da metilase é ativo, não sendo necessária a atividade de um agente indutor (Amorim et al., 2009).

Outro mecanismo comum está relacionado ao gene *mef* que codifica uma bomba de efluxo que expulsa macrolídeos de 14 e 15 carbonos (Gygax et al., 2006) responsável pela resistência à eritromicina e sensibilidade à clindamicina (fenótipo M) (Campelo et al., 2012).

A resistência aos macrolídeos tem sido observada há algumas décadas. Inicialmente, em índices baixos e posterior aumento, como relatado em um estudo conduzido nos Estados Unidos, onde evoluiu de 1%, no período de 1980 a 1993, para 18% em 1998 (Morales et al., 1999). Desde então, variação nas taxas atuais de resistência tem sido relatadas em diferentes áreas geográficas, como os 50% em

Taiwan (Lee e Lai, 2015), 14,3% na Alemanha (Reinheimer et al., 2016) e 6,5% na Etiópia (Mengist, Kannan e Abdissa, 2016).

Houve aumento significativo das taxas de resistência de EGB aos macrolídeos no Brasil ao longo dos anos. Estudos realizados na região sudeste e sul, mostram um avanço de 4,3% em 2003, 8,5% em 2005, 14% em 2011 a 19,3% em 2013 (d'Oliveira et al., 2003; Duarte et al., 2005; Nakamura et al., 2011; Otaguiri et al., 2013).

#### **1.4.2) Resistência a fluoroquinolonas**

As quinolonas foram introduzidas em meados dos anos 80 para tratamento das infecções causadas principalmente por bactérias gram-negativas e pouca atividade por patógenos gram-positivos (Ki et al., 2012). Entretanto, as fluoroquinolonas de geração mais recente, como moxifloxacina e levofloxacina, têm sido eficazes no tratamento das infecções estreptocócicas devido às propriedades farmacológicas superiores à ciprofloxacina e norfloxacina (Malhotra-Kumar et al., 2005; Ki et al., 2012).

Considerando a crescente resistência a macrolídeos e lincosamidas, as fluoroquinolonas são importantes alternativas terapêuticas (Piccinelli et al., 2015). Estas, por sua vez, atuam nas enzimas DNA girase e topoisomerase IV da bactéria, responsáveis pela replicação, recombinação e reparo do DNA (Jacoby et al., 2005).

Em 2003, foi descrita a primeira cepa de *S. agalactiae* resistente a esta classe de antimicrobianos por Kawamura e colaboradores (2003) e, desde então, a resistência a fluoroquinolonas é um problema em expansão em amostras de *S. agalactiae* e outros patógenos humanos. Amostras resistentes têm sido identificadas em regiões distintas, com baixa incidência, como os 2,5% nos Estados Unidos, 1,5% na Itália, 0,9% na Argentina e 9,5% na Coreia do Sul (Wehbeh et al., 2005; Savoia et al., 2008; Faccione et al., 2010; Ki et al., 2012). A caracterização das primeiras amostras de EGB resistentes às fluoroquinolonas no Brasil foi feita em 2012 por Barros e colaboradores, que observaram 0,6% de resistência na região metropolitana do Rio de Janeiro. O mecanismo de resistência às fluoroquinolonas



está relacionado a mutações pontuais de *gyrA* ou *parC* na região determinante de resistência a quinolonas (QRDR) (Kawamura et al., 2003). Mutações pontuais que levam à substituição de aminoácidos, tanto no gene *gyrA* (Ser-81→Leu; Glu-85→Ala ou Lys) quanto em *parC* (Ser-79→Phe, Ala ou Tyr) tem sido apontadas como as principais responsáveis pela resistência observada. Estas substituições diminuem a afinidade do antibiótico pela enzima devido às alterações no sítio de ligação (Miró et al., 2006).

### **1.4.3) Análise da diversidade genética de populações de EGB**

À medida que ferramentas moleculares foram desenvolvidas e aprimoradas, foi permitido aplicá-las a estudos de caracterização genética de EGB, a fim de se conhecer a estrutura da população bacteriana em diferentes contextos epidemiológicos, como por exemplo, aquelas amostras envolvidas em infecções invasivas ou associadas à resistência a antimicrobianos (Usein et al., 2014).

Dentre estas ferramentas, destaca-se a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) que é considerada padrão ouro em estudos de epidemiologia molecular, com alto poder discriminatório de linhagens bacterianas de uma mesma espécie. Esta técnica consiste na separação de grandes fragmentos de DNA, digeridos por enzimas de restrição, reorientados em gel mediante ação de campo elétrico alternado (Herschleb, Ananiev e Scharz, 2007).

As análises moleculares por muitas vezes superam os métodos fenotípicos, que em alguns momentos podem ter sua precisão limitada. A análise dos perfis de fragmentação do DNA por PFGE, em especial, tem sido uma metodologia para identificar surgimento e disseminação dos clones e traçar particularidades entre as amostras de EGB (Savoia et al., 2008). Para a análise da diversidade genética de EGB, muitos estudos utilizaram a PFGE para a separação dos fragmentos de DNA gerados pelo tratamento com a enzima de restrição *SmaI* (Faccone et al., 2010; Martins et al., 2012., Schuab et al., 2015., Jiang et al., 2015).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1) Objetivo geral**

Investigar, de forma integrada, a diversidade genética de amostras de EGB resistentes aos antimicrobianos macrolídeos, lincosamídeos e fluoroquinolonas, detectadas em estudos prévios realizados por nosso grupo.

### **2.2) Objetivos específicos**

- Determinar a concentração inibitória mínima (MIC) de eritromicina e levofloxacina das amostras não suscetíveis a estes antimicrobianos, detectadas pela técnica de difusão em ágar;
- Investigar os determinantes genéticos de resistência de aos antimicrobianos;
- Investigar a diversidade das amostras por determinação dos genes que codificam os tipos capsulares e avaliação dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após tratamento com enzimas de restrição.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1) Amostras bacterianas**

Foram selecionadas 59 amostras de EGB, dentre as 499 submetidas ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pela técnica de difusão em ágar. Desta forma, 11,8% das amostras analisadas foram não suscetíveis a pelo menos um dos seguintes antimicrobianos: clindamicina (47 resistentes), eritromicina (44 resistentes e 12 intermediárias) e levofloxacina (4 resistentes). As amostras foram obtidas no período de abril de 2004 a fevereiro de 2013 de pacientes ambulatoriais, que residem na área metropolitana do Rio de Janeiro e fizeram parte de estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa (Nakamura et al., 2011; Barros et al., 2012; Souza et al., 2013; Schuab et al., 2015; Barros, Souza e Luiz, 2016). As amostras encontram-se estocadas a -20°C. As amostras bacterianas foram obtidas de

pacientes de ambos os sexos com idades variando de 15 a 83 anos e de um recém-nascido sem informação sobre o sexo. Os espécimes clínicos foram esperma (2), sangue (1), secreção uretral (1), secreção vaginal (12) e urina (43). As amostras obtidas de mulheres foram provenientes de gestantes (18), não grávidas (25) e de mulheres sem informação de gestação (6).

### **3.2) Reativação das amostras**

As amostras foram reativadas semeando-as em ágar (Blood Agar Base, BBL, BD, Sparks, MD, EUA) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (ágar sangue, AS).

### **3.3) Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de eritromicina e levofloxacina**

As amostras não suscetíveis à eritromicina e à levofloxacina pela técnica de difusão em ágar foram submetidas à determinação do MIC pela técnica de difusão de gradiente segundo recomendações do fabricante (M.I.C Evaluators, Oxoid, Basingstoke, Hants, Reino Unido). A partir de uma cultura recente, uma suspensão bacteriana foi preparada com turvação correspondente à escala 0,5 de McFarland e foi semeada em ágar Mueller Hinton acrescido com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Sobre a superfície do ágar foi depositada uma fita do antibiótico a ser testado. As placas foram incubadas a 35°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 18-24 horas. A leitura foi realizada a partir da observação da menor concentração de antimicrobiano que inibiu o crescimento bacteriano. A interpretação do teste foi realizada segundo recomendações do CLSI (2014).

### **3.4) Investigação dos determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos**

#### **3.4.1) Extração do DNA bacteriano**

Para as investigações moleculares, a obtenção do DNA bacteriano seguiu protocolos previamente descritos Dmitriev e colaboradores (2002) e de Beall e colaboradores (1996), ambos utilizando a lise térmica.

### 3.4.2) Detecção de determinantes genéticos de resistência a macrolídeos

O DNA bacteriano foi utilizado como molde em reações de amplificação dos genes que conferem resistência a macrolídeos, *ermA*, *ermB* e *mefA/E* (Sutcliffe et al., 1996; Pérez-Trallero et al., 2007). Os reagentes (Thermo Scientific Waltham, MA, EUA) foram utilizados nas concentrações descritas na tabela 1. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 3 min a 94°C, 35 ciclos (94°C, 53°C, 72°C por 1min cada) e extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% a 100V e 40mA. Os fragmentos correspondentes aos produtos foram visualizados após coloração com solução de brometo de etídio sob luz UV.

Tabela 1: Concentração dos reagentes na reação de amplificação dos genes *ermA*, *ermB* e *mefA/E*

Reagente	Concentração na Reação	Volume 1 Reação
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	2,4
Tampão	1 x	3
Iniciadores	1 mM	3 (x2)
dNTP	0,2 mM	3
Taq	1 U	0,2
H <sub>2</sub> O	-	12,4
DNA	3 µl	3 µl

### 3.4.3) Detecção de determinantes genéticos de resistência a fluoroquinolonas

O DNA bacteriano foi utilizado como molde nas reações de amplificação dos genes que conferem resistência a fluoroquinolonas (*gyrA* e *parC*). Os reagentes (Thermo Scientific) foram utilizados nas concentrações descritas na tabela 2. As

condições de amplificação foram: 94°C por 2 min seguidas por 30 ciclos (94°C, 52°C e 72°C por 1 min cada) e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos foram purificados (GFX PCR DNA Gel Band purification kit Illustra™, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA) e submetidos ao sistema de sequenciamento automatizado Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) na plataforma de sequenciamento da Universidade Federal Fluminense (UFF). As sequências obtidas foram editadas no software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) e a análise das sequências dos aminoácidos foi feita pelo software CLC Sequence Viewer (CLC BioA/S).

Tabela 2: Concentração dos reagentes na reação de amplificação dos genes *gyrA* e *parC*

Reagente	Concentração na Reação	Volume 1 Reação
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	2,5 µl
Tampão	1x	5 µl
dNTP	0,2 mM	5 µl
Iniciadores	0,5 mM	2,5 µl (x2)
Taq	1u	0,2 µl
H <sub>2</sub> O	-	27,3 µl
DNA	5 µl	5 µl

### 3.5) Tipificação capsular

O DNA bacteriano também foi utilizado em PCR multiplex e uniplex para a determinação dos tipos capsulares conforme o protocolo de Poyart e colaboradores (2007) e Murayama e colaboradores (2009). Os reagentes (Thermo Scientific) foram utilizados nas concentrações descritas na tabela 3. As reações foram feitas com a seguinte ordem: II+*dltS*, Ia+Ib+III, V, IV+VII e VI+VIII. Tendo na primeira reação os iniciadores do gene *dltS*, comum a todas as amostras de *S. agalactiae* (controle positivo interno). A reação se deu em 40 ciclos (94°C por 1 min, 52°C por 2 min, 72°C por 2 min). A eletroforese em gel foi realizada com as mesmas especificações na detecção de genes de resistência a macrolídeos.

Tabela 3: Concentração dos reagentes na reação de amplificação dos genes capsulares

Reagente	Concentração na Reação	Volume 1 Reação
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	2,5
Tampão	1 x	2,5
Dntp	0,2 mM	2,5
Iniciadores	0,8 mM	2 (x2)
Taq	0,625 U	0,12
H <sub>2</sub> O	-	2,38
DNA	3 µl	3 µl

### 3.6) Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A diversidade genética das amostras foi analisada por PFGE a partir da digestão das amostras com *Sma*I de acordo com protocolo descrito previamente com modificações (Teixeira et al., 1997). A partir de cultura recente, foi preparado inóculo bacteriano em 300 µl de solução PIV (1M NaCl, 10mM Tris-HCl) que foi misturado a um volume igual de solução de agarose *low melting pointing* 2% (6 µM Tris-HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% de Brij 58, 0,2% de sódio desoxicolato, 0,5% lauril sarcosinato de sódio) para o preparo dos blocos de DNA. Os blocos foram transferidos para 1,5 ml de solução de lise com 5mg/ml de lisozima (Amresco, Solon, OH) e incubados a 37°C por 24 horas. Após a remoção da solução de lise, foi adicionado 1 ml de solução ES (0,5 M de EDTA, 1% lauril sarcosinato de sódio) com 5 µl de proteinase K (USB, Cleveland, OH) incubados a 50°C por 24 horas. Esta etapa foi repetida no dia seguinte. Após sucessivas lavagens com o tampão TE, os blocos contendo DNA foram tratados com a enzima de restrição *Sma*I de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Scientific). Os fragmentos foram separados em gel de agarose 1,2% no CHEF DR III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os parâmetros estabelecidos para a corrida foram 22 horas a 12°C com pulso inicial de 2 segundos e final de 30 segundos. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta. As análises foram feitas, inicialmente, por inspeção visual e, posteriormente pelo software GelJ versão 2.0 (Heras et al., 2015).

#### 4. RESULTADOS

As amostras não suscetíveis às alternativas terapêuticas recomendadas, eritromicina e levofloxacina, pela técnica de difusão em ágar, foram submetidas à determinação da concentração inibitória mínima (MIC). A MIC de eritromicina variou de 0,5 a > 256 µg/ml. Assim, considerando que as metodologias de referência são aquelas em que se obtém a MIC, uma amostra foi considerada intermediária e 55 resistentes à eritromicina. Foram observados os seguintes fenótipos e genótipos de resistência aos macrolídeos: M e *mefA/E* (9); MLS<sub>Bi</sub> (26) sendo este associado a *ermA* (23), *ermB* (1), *ermA/ermB* (1) e *ermA/mefA/E* (1); MLS<sub>BC</sub> (20) associado a *ermA* (5) e *ermB* (15). A amostra intermediária a eritromicina apresentou o fenótipo MLS<sub>Bi</sub> associado ao *ermA*. Seis tipos capsulares foram encontrados, com predominância do tipo capsular V. Duas amostras foram consideradas não tipáveis pela metodologia usada. A distribuição dos tipos capsulares em função dos fenótipos de resistência aos macrolídeos é mostrada na tabela 4.

Tabela 4: Distribuição dos tipos capsulares e fenótipo de resistência em amostras não suscetíveis a eritromicina (n = 56).

Fenótipo	Tipo capsular						
	Ia	Ib	II	III	V	VII	NT
MLS <sub>Bi</sub> (n=27)	2	0	0	2	21	1	1
MLS <sub>BC</sub> (n=20)	4	1	5	5	4	0	1
M (n=9)	3	1	0	1	4	0	0
Total	9	2	5	8	29	1	2

O tipo capsular V foi encontrado durante todo o período de isolamento das amostras, mas a partir de 2008 foi observado aumento na distribuição dos tipos capsulares (figura 1).

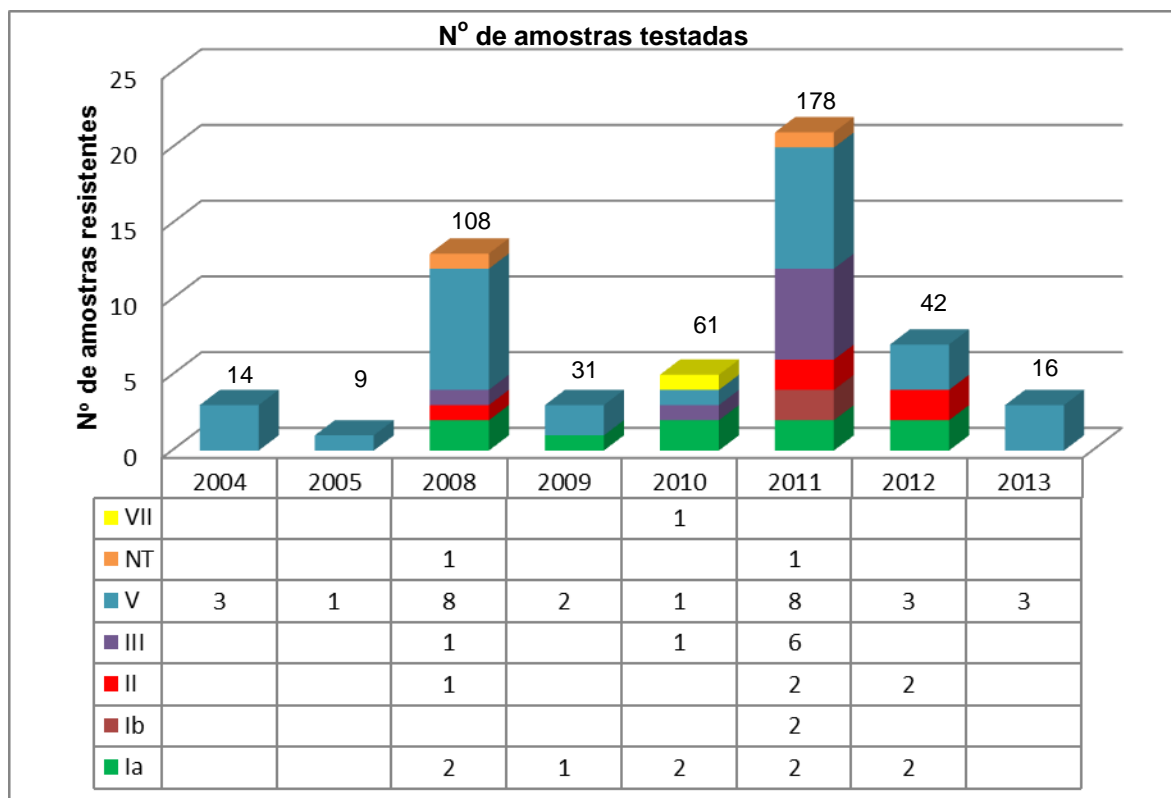


Figura 1: Distribuição dos tipos capsulares das amostras não suscetíveis a eritromicina e total de amostras submetidas ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos no período de 2004 a 2013.

A resistência à clindamicina, observada entre 47 amostras, foi associada à não suscetibilidade à eritromicina (fenótipo  $MLS_B$ ). Não foram observadas amostras resistentes a clindamicina e suscetíveis à eritromicina.

Foram observadas quatro amostras resistentes à levofloxacina, com uma delas resistentes também à eritromicina e à clindamicina (fenótipo  $MLS_{BC}$ ), sendo considerada multirresistente. O MIC de levofloxacina variou de 4 a  $>32 \mu\text{g/ml}$ , sendo assim, uma amostra foi considerada intermediária e três resistentes a este agente. A amostra intermediária apresentou o tipo capsular Ia e as resistentes os tipos capsulares Ia, III e V.

Foram encontradas mutações pontuais nos genes de resistência a fluoroquinolonas. Em *gyrA* ocorreu substituição em Ser81→Leu e em *parC* a



mutação ocorreu em Ser79→Phe. Além disto, outras mutações foram detectadas em *parC*, Gli128→Asp e Ser80→Pro, sendo esta encontrada na única amostra intermediária ao antimicrobiano. As mutações detectadas em cada amostra são listadas na tabela 5.

Tabela 5: Mutações pontuais na região determinante de resistência a fluoroquinolonas (QRDR)

Amostra	Tipo capsular	Fenótipo/ MIC (µg/ml)	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>
CF 21	V	R/32	Ser81→Leu	Ser79→Phe
CR 221	III	R/32	Ser81→Leu	Ser79→Phe Gli128→Asp
CR 450	Ia	I/4	Ser81→Leu	Ser80→Pro
804	Ia	R/32	Ser81→Leu	Ser79→Phe

Foram analisados os perfis de fragmentação do DNA cromossômico de 50 amostras por PFGE e 38 perfis diferentes foram gerados. Considerando que as amostras geneticamente relacionadas apresentam perfis com similaridade mínima de 80%, a análise destes indicou a presença de dez grupos clonais, englobando 32 amostras, como mostra a figura 2.

Dezoito perfis apresentaram similaridade inferior a 80%, incluindo as amostras não suscetíveis a levofloxacina. O número de amostras em cada grupo clonal variou de duas a sete e o tipo capsular V foi dominante entre esses grupos. A maioria dos grupos foi formada por amostras do mesmo tipo capsular, exceto dois grupos, formados por amostras dos tipos Ia/III e III/V.

O grupo clonal A alocou duas amostras, provenientes de urina de pacientes do sexo masculino e feminino não grávida. As amostras apresentaram os genótipos *ermA* e *mefA/E*, respectivamente e o tipo capsular Ia. O grupo B alocou duas amostras obtidas de urina e secreção vaginal de pacientes não grávidas. As amostras pertenciam a tipos capsulares diferentes (Ia e III) e albergavam os genes *ermB* e *ermA/mefA/E*. O grupo C alocou sete amostras obtidas de urina e secreção vaginal, seis delas foram obtidas de pacientes não grávidas e uma de gestante. Foi formado exclusivamente por amostras do tipo V com os genótipos *ermA* (5) e *mefA/E* (2). O grupo D alocou três amostras oriundas de urina de pacientes não grávidas, pertencentes aos tipos capsulares Ia (1) e III (2) e albergavam o gene *ermB*. As três amostras do grupo E foram isoladas de esperma e urina de pacientes do sexo masculino, do tipo capsular V e genótipos *ermA* (2) e *mefA/E* (1). O grupo F alocou três amostras provenientes de urina de gestantes, tipo capsular V e genótipo *ermA*. Seis amostras foram alocadas no grupo G, isoladas de secreção vaginal e urina de gestantes, além da única amostra oriunda de sangue de recém-nato. Elas apresentaram tipo capsular V e os genótipos *ermA* (5) e *ermB* (1). Três pares de amostras com 100% de similaridade foram alocadas em três grupos clonais apresentados na figura 2. O grupo I alocou duas amostras isoladas de mulheres, que apresentavam o tipo capsular V e o genótipo *ermA*. O grupo II alocou duas amostras oriundas de secreção uretral masculina e urina de uma paciente não grávida, as amostras apresentavam o tipo capsular II os genótipos *ermA* e *ermB*, respectivamente. Amostras do grupo III foram obtidas de secreção vaginal e urina de pacientes não grávidas, apresentaram o tipo capsular V e os genótipos *ermB* e *mefA/E*.

Nove amostras não foram analisadas por esta técnica. Duas amostras consideradas não tipáveis pela técnica utilizada para a tipificação capsular não foram submetidas à análise por PFGE, bem como quatro amostras que perderam viabilidade durante os estudos. Três amostras não foram digeridas pela enzima *SmaI*, duas delas abrigavam o gene *mefA/E*.

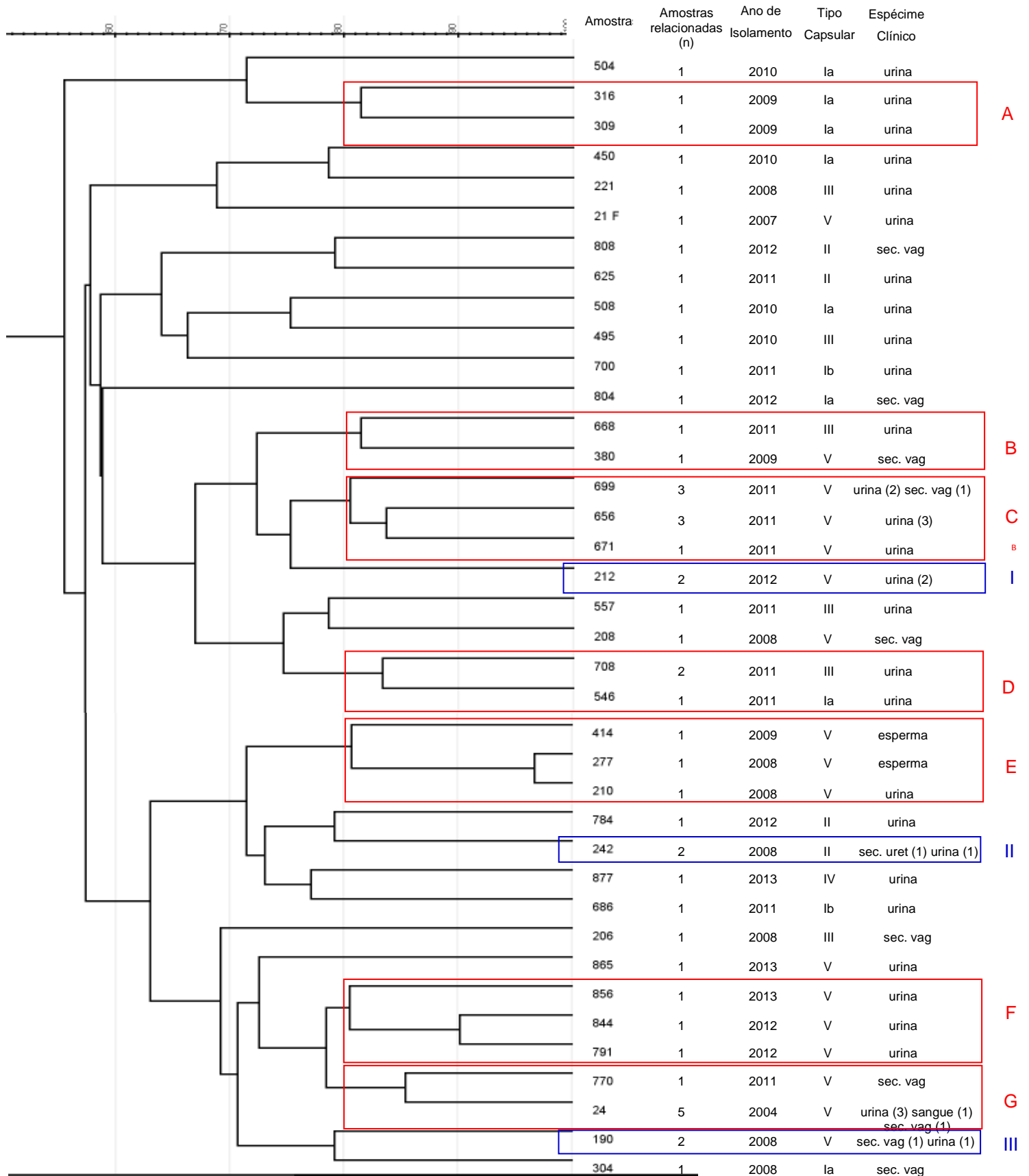


Figura 2: Dendrograma obtido a partir da análise computacional dos perfis de restrição do DNA cromossômico. Cada grupo clonal (caixa vermelha) e amostras com 100% de similaridade (caixa azul) estão representados no dendrograma.

## 5. DISCUSSÃO

EGB é um importante patógeno neonatal e de infecção em adultos não grávidos com doenças subjacentes debilitantes. Apesar da suscetibilidade reduzida, a penicilina ainda é a primeira droga para profilaxia intraparto contra a doença neonatal. Em contrapartida, altas taxas de resistência são relatadas às terapias recomendadas aos pacientes alérgicos aos beta-lactâmicos. Ainda que a incidência da doença estreptocócica neonatal tenha sido reduzida com o uso da quimioprofilaxia intraparto, esta estratégia é ineficiente para a doença de início tardio ou infecções entre adultos (Phares et al., 2010; Piccinelli et al., 2015).

Os resultados obtidos na avaliação da suscetibilidade a eritromicina por disco-difusão e diluição em ágar divergiram, exceto por uma amostra considerada intermediária nas duas técnicas. A disparidade entre as técnicas foi relatada na mesma região por D'Oliveira e colaboradores (2003). A existência dos fenótipos MLS<sub>B</sub> e M revelaram os dois mecanismos de resistência a macrolídeos, alteração do sitio alvo e bomba de efluxo, respectivamente. Todas as amostras com o fenótipo M albergavam o gene *mefA/E*, enquanto que o fenótipo MLS<sub>BC</sub> foi fortemente associado a *ermB* e o MLS<sub>Bi</sub> ao gene *ermA*. A associação entre fenótipos e genótipos de resistência a macrolídeos também foi encontrada em estudos anteriores realizados no Brasil e em outras localidades (Campelo et al., 2012; Shabayek e Abdalla, 2014; Otaguiri et al., 2013 Dutra et al., 2014). Em duas amostras o gene *ermA* foi associado aos genes *ermB* e *mefA/E*, como observado em outros estudos (Pinto et al., 2013; Usein et al., 2014; Wang et al., 2015). A concentração inibitória mínima de eritromicina variou de 0,5 a > 256 µg/ml e os valores mais altos foram encontrados nas amostras que expressaram o fenótipo MLS<sub>BC</sub>, semelhante ao descrito por Otaguiri e colaboradores (2013) no Brasil e em Portugal por Campelo e colaboradores (2012). Ao contrário do encontrado neste estudo, os resultados mostrados por Shabayek e Abdalla (2014), no Egito, não mostraram diferença entre os fenótipos e os valores da MIC de eritromicina, onde foi encontrada MIC 128 µg/ml para os fenótipos M e MLS<sub>B</sub>.

Neste estudo, todas as amostras resistentes à clindamicina foram associadas à resistência a eritromicina com fenótipo MLS<sub>B</sub>. Dados semelhantes foram descritos na China e no Egito (Wang et al., 2015; Foad, 2016). Apesar da existência do fenótipo L, associado ao gene *linB*, que confere, por translocação ribossomal, resistência à clindamicina e suscetibilidade à eritromicina (Mousavi et al., 2016), este fenótipo, até o momento, não foi encontrado em nossos estudos.

Ainda que não tenham sido investigadas características genéticas de resistência à tetraciclina, neste estudo, 86% das amostras foram resistentes a este antimicrobiano. Foram encontradas taxas similares em diferentes estudos conduzidos na mesma região (d'Oliveira et al., 2003; Côrrea et al., 2011; Pinto et al., 2013). Trinta e oito amostras resistentes à tetraciclina também foram resistentes a eritromicina, isto pode estar associado à transferência horizontal de genes envolvendo um único transposon com determinantes genéticos de resistência para ambos antimicrobianos (Foad, 2016).

As mutações pontuais em *gyrA* e *parC* encontradas nas amostras resistentes à levofloxacina foram reportadas em outros estudos (Wu et al., 2008; Faccone et al., 2010; Wang et al., 2015; Piccinelli et al. 2015). Mutações em ambos os genes resultaram em MIC >32 µg/ml como demonstrado por Piccinelli (2015). O uso de fluoroquinolonas pode, potencialmente, estar associado ao aumento da resistência de EGB e outros patógenos a este antimicrobiano (Wang et al., 2015).

O tipo capsular V foi predominante entre as amostras resistentes aos macrolídeos e fluoroquinolonas analisadas neste estudo. Outros relatos no Brasil, Portugal e Coreia do Sul também mostraram a prevalência do tipo capsular V entre as amostras resistentes a macrolídeos (Pinto et al., 2013; Otaguiri et al., 2013; Martins et al., 2012; Yoon et al., 2015). Considerando que a vacina contra EGB que se encontra em desenvolvimento, contenha os tipos capsulares Ia, Ib, II, III, e V, frequentemente associados às infecções (Yao et al., 2013), e os tipos capsulares encontrados neste estudo, o impacto da vacinação na população estudada seria de 95%.

A aplicação da técnica de PFGE permitiu a análise da diversidade genética da grande maioria das amostras. Duas amostras de genótipo *mefA/E* não foram digeridas pela *SmaI*, esta falha pode ser explicada pela presença de uma família de transposons que codifica uma metiltransferase que torna o DNA resistente a ação da *SmaI* (Figueiredo et al., 2006). Observou-se grande diversidade genética entre as amostras, quando analisadas por PFGE. Os grupos clonais compartilhavam o mesmo tipo capsular, na maioria deles, o tipo V. A correlação entre tipo capsular e grupos clonais obtidos por PFGE foi demonstrada por Martins e colaboradores (2012) e por Jiang e colaboradores (2015). Apenas em dois grupos clonais foram encontradas amostras de diferentes tipos capsulares. Estes resultados podem estar associados à ocorrência de “switch” capsular, devido à transferência horizontal de genes capsulares entre amostras relacionadas (Palmeiro et al., 2010). A presença de vários perfis de fragmentação do DNA entre as amostras resistentes sugere a diversidade genética destas, resultado da disseminação policlonal (Duarte et al., 2005; Dutra et al., 2013). As amostras alocadas em um grupo clonal apresentaram diversidade quanto ao hospedeiro, espécime clínico e ano de isolamento. Estes dados corroboram com a manutenção dos clones ao longo do tempo, provavelmente por sua adaptação a diferentes condições ambientais.

## 6. CONCLUSÃO

- ✓ A resistência de EGB aos macrolídeos e lincosamídeos tem ocorrido continuamente na população bacteriana circulante da região metropolitana do Rio de Janeiro;
- ✓ A resistência a fluoroquinolonas ainda é um evento raro nesta região geográfica;
- ✓ A diversidade dos determinantes genéticos, da distribuição dos tipos capsulares e dos perfis de restrição do DNA cromossômico revelam a disseminação policlonal de amostras resistentes a estes antimicrobianos;
- ✓ Os dados reforçam a necessidade de se investigar os mecanismos de resistência aos antimicrobianos para melhorar as estratégias de prevenção e tratamento das infecções por EGB.

## 7. REFERÊNCIAS

AMORIM, D M R; PERSON, O C; AMARAL, P J; TANAKA, I I. Resistência induzível a clindamicina entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. *O Mundo da Saúde*. 33: 401-405. 2009.

BARROS, R R; KEGELE, F C; DE PAULA, G R; DE BRITO, M A; DUARTE, R S. Molecular characterization of the first fluoroquinolone resistant strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Brazil. *Braz J Infect Dis*, 16: 476-8. 2012.

BARROS, R R; SOUZA, A F; LUIZ, F B O. Polyclonal spread of *Streptococcus agalactiae* resistant to clindamycin among pregnant women in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 71: 2054-2056. 2016.

BASTOS, A N; BASTOS, R V; BASTOS, L Q A; SOUZA, R C; BASTOS, V Q A. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: incidência em laboratório clínico de Juiz de Fora (MG) - 2007 a 2009. *HU Rev*. 38: 45-50. 2012.

BEALL, B; FACKLAM, R; THOMPSON, T. Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J Clin Microbiol*. 34:953-958. 1996.

CAMPELO, F A; PEDROSA, A C; ANTÚNEZ, I A; CAPUZ, B L. Fenotipos y mecanismos de resistencia a macrólidos y lincosamidas en aislados de *Streptococcus agalactiae* con significación clínica en un período de ocho años (2002-2010). *Rev Esp Quimioter*. 25: 42-46. 2012.

CAMUSET, G; PICOT, S; JAUBERT J; BORGHERINI, G; FERDYNUS, C; FOUCHER, A; MAÏZA, J; FELS, O; POYART, C; POUBEAU, P; GÉRARDIN, P. Invasive Group B Streptococcal Disease in Non-pregnant Adults, Reunion Island, 2011. *Int J Infect Dis*. 35: 46–50. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of perinatal



group B streptococcal disease: a public health perspective. *Morb Mortal Wkly. Rep* 59 (RR-10): 1-36. 2010.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth Informational Supplement M100-S24. CLSI, Wayne, PA, USA, 2014.

CÔRREA, A B A; SILVA, L G; PINTO, T C A; OLIVEIRA, I C M; FERNANDES, F G; COSTA, N S; MATTOS, M C; FRACALANZZA, S E L; BENCHETRIT, L C. The genetic diversity and phenotypic characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 106: 1002-1006. 2011.

DMITRIEV, A; SHAKLEINA, E; TKÁCIKOVÁ, L; MIKULA, I; TOTOLIAN, A. Genetic heterogeneity of the pathogenic potentials of human and bovine group B streptococci. *Folia Microbiol*. 47: 291-295. 2002.

d'OLIVEIRA, R E C; BARROS, R R; MENDONÇA, C R V; TEIXEIRA, L M; CASTRO, A C D. Susceptibility to antimicrobials and mechanisms of erythromycin resistance in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* from Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol*. 52: 1029-1030. 2003.

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

EDWARDS, M S; RENCH, M A; BAKER, C J. Relevance of age at diagnosis to prevention of late-onset group B Streptococcal disease by maternal immunization. *Pediatr Infect Dis J*. 34:538-9. 2015.

FACCONE, D; GUERRIERO, L, MÉNDEZ, E; ERRECALDE, L; CANO, H; YOYA, N; TOGNERI, A; ROMANOWSKI, V; GALAS, M; WHONET, R E D; CORSO, A. Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus agalactiae* isolates from Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 42: 203-207. 2010.

FIGUEIREDO, T A; AGUIAR, S I; MELO-CRISTINO, J; RAMIREZ, M. DNA methylase activity as a marker for the presence of a family of Phage-Like Elements conferring efflux-mediated macrolide resistance in Streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 3689-94. 2006.

FOAD, M F. Urinary tract and vaginal infections caused by group B Streptococcus and the macrolide-inducible resistance to clindamycin in non-pregnant females. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 5: 486-496. 2016.

GYGAX, S E; SCHUYLER, J A; KIMMEL, L E; TRAMA, J P; MORDECHAI, E; ADELSON, M E. Erythromycin and clindamycin resistance in group B streptococcal clinical isolates. *Antimicrob Agents and Chemother.* 50: 1875-1877. 2006.

HERAS, J; DOMÍNGUEZ, C; MATA, E; PASCUAL, V; LOZANO, C; TORRES, C; ZARAZAGA, M. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics.* 16:270.2015.

HERSCHLEB, J; ANANIEV, G; SCHATZ. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc.* 2:677-84. 2007.

JACOBY, G A. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis.* 41: 120-126. 2005.

JIANG, H; CHEN, M; LI, T; LIU, H; GONG, Y; LI, M. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* causing community and hospital acquired infections in Shanghai, China. *Front Microbiol.* 7: 1308. 2016.

JUNCOSA-MORROS, T; GUARDIÀ- LLOBET, C; BOSCH-MESTRES, J; DOPICO-PONTE, E; SANFELIU-SALA, I; SIERRA-SOLER, M; SÁNCHEZ-REUS, F; GIMÉNEZ-PÉREZ M; LITE-LITE, J; ANDREU-DOMINGO, A. La infección neonatal tardía por *Streptococcus agalactiae* en el área de Barcelona (1996-2010). *Enferm Infect Microbiol Clin.* 32 574-578. 2013.

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

KI, M; SRINIVASAN, U; OH, K Y; KIM, M Y; SHIN, J H; HONG, H L; DANG, T; BRITT, Z; FOXMAN, B. Emerging fluoroquinolone resistance in *Streptococcus agalactiae* in South Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31:3199–3205. 2012.

KIMURA, K; SUZUKI, S; WACHINO, J; KUROKAWA, H; YAMANE, K; SHIBATA, N; NAGANO, N; KATO, H; SHIBAYAMA, K; ARAKAWA, Y. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents and Chemother.* 52:2890–2897. 2008.

KISS, F S; ROSSATO, J S; GRAUDENZ, M S; GUTIERREZ, L L P. Prevalência da colonização por *Streptococcus agalactiae* em uma amostra de mulheres grávidas e não grávidas de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul. *Sci Med.* 23:169-174. 2013.

KONEMAN, E V; ALLEN, S D; JANDA, W M; SCHRECKENBERGER, P C; WINN Jr, W C. Diagnóstico microbiológico. Texto e atlas colorido. 5ª edição, Editora MEDSI. 2001.

LANG, S; PALMER, M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP Factor as a pore-forming toxin. *JBiol Chem.* 278: 38167-38173. 2003.

LECLERQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 34:482-92. 2002.

LEE, W T; LAI M C. High prevalence of *Streptococcus agalactiae* from vaginas of women in Taiwan and its mechanisms of macrolide and quinolone resistance. *J Microbiol Immunol Infect.* 48:510-6. 2015.

MALHOTRA-KUMAR, S; LAMMENS,C; CHAPELLE, S; MALLENTJER, C; WEYLER, J; GOOSSENS, H. Clonal spread of fluoroquinolone non-susceptible *Streptococcus pyogenes*. *J. Antimicrob Chemother.* 55: 320-325. 2005.

MARTINS, E R; MELO-CRISTINO, J; RAMIREZ, M. Dominance of serotype Ia among group B *Streptococci* causing invasive infections in nonpregnant adults in Portugal. *J Clin Microbiol.* 50:1219-27. 2012.

MENGIST, A; KANNAN, H; ABDISSA, A. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of anorectal and vaginal group B *Streptococci* isolates among pregnant women in Jimma, Ethiopia. *BMC Res Notes.* 9:351. 2016.

MIRÓ, E; REBOLLO, M; RIVERA, A; ÁLVAREZ, M T; NAVARRO, F; MIRELIS, B; COLL, P. *Streptococcus agalactiae* altamente resistente a fluoroquinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 24:562–3. 2006.

MOLTÓ-GARCÍA, B; LIÉBANA-MARTOS, M C; CUADROS-MORONTA, E; RODRÍGUEZ-GRANGER, J; SAMPEDRO-MARTÍNEZ, A; ROSA-FRAILE, M; GUTIERREZ-FERNÁNDEZ, J; PUERTAS-PRÍET, A; NAVARRO-MARÍ, J M. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of hemolytic *Streptococcus agalactiae* from post-menopausal women. *Maturitas.* 85: 5-10. 2016.

MORALES, W J; DICKEY S S; BORNICK, P; LIM, D V. Change in antibiotic resistance of group B *Streptococcus*: Impact on intrapartum management. *Am J Obstet Gynecol.* 181:310-4. 1999.

MOUSAVI, S M; NASAJ, M; HOSSEINI, S M; ARABESTANI, M R. Survey of strain distribution and antibiotic resistance pattern of group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*) isolated from clinical specimens. *GMS Hyg Infect Control.* 11: 1-8. 2016.

MURAYAMA, S Y; SEKI, C; SAKATA, H; SUNAOSHI, K; NAKAYAMA, E; IWATA, S; SUNAKAWA, K; UBUKATA, K. Capsular type and antibiotic resistance in

*Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from newborns to the elderly, with invasive infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 2650-2653. 2009.

NAKAMURA, P A M; SCHUAB, R B B; NEVES, F P G; PEREIRA, C F A; PAULA, G R; BARROS, R R. Antimicrobial resistance profiles and genetic characterisation of macrolide resistant isolates of *Streptococcus agalactiae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 119-122. 2011.

OTAGUIRI, E S; MORGETTE, A E B; TAVARES, E R; SANTOS, P M C; MOREY, A T; CARDOSO, J D; PERUGINI, M R E; YAMAUCHI, L M; YAMADA-OGATTA, S F. Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. *BMC Microbiol.* 13:297. 2013.

PALMEIRO, J K; DALLA-COSTA, L M; FRACALANZZA, S E L; BOTELHO, A C N; NOGUEIRA K S; SCHEFFER, M C; TORRES, R S L A; CARVALHO, N S; COGO, L L; MADEIRA, H M F. Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in southern Brazil. *J Clin Microbiol.* 48: 4397-4403. 2010.

PEREZ-TRALLERO, E; MONTES, M; ORDEN, B; TAMAYO, E; GARCIA-ARENZANA, J; MARIMÓN, J. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus pyogenes* isolates displaying the MLSb phenotype of macrolide resistance in Spain, 1999 to 2005. *J Clin Microbiol.* 51:1228-1233. 2007.

PHARES, C R; LYNFIELD, R; FARLEY, M M; MOHLE-BOETANI, J; HARRISIN, L H; PETIT, S; CRAIG, A S; SCHAFFNER, W; ZANSKY, S M; GERSHMAN, K; STEFONEK, K R; ALBANESE, B A; ZELL, E R; SCHUCHAT, A; SCHARAG, S J. Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Disease in the United States, 1999-2005. *JAMA.* 299:2056-65. 2008.

PICCINELLI, G; GARGIULO, F; CORBELLINI, S; RAVIZZOLA, G; BONFANTI, C; CARUSO, A; DE FRANCESCO, M.A. Emergence of the first levofloxacin-resistant strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Italy. *Antimicrob Agentes Chemother.* 59:2466-9.2015.

PINTO, T C A; COSTA, N S; SOUZA, A R V; SILVA, L G; CÔRREA A B A; FERNANDES, F G; OLIVEIRA, I C M; MATTOS, M C; ROSADO, A S; BENCHETRIT, L S. Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. *Braz J Infect Dis.* 17:131–136. 2013.

POYART, C; TAZI, A; RÉGLIER-POUPET, H; BILLOËT, A; TAVARES, N; RAYMOND, J; TRIEU-CUOT, P. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *J Clin Microbiol.* 45:1985-1988. 2007.

REINHEIMER, C; KEMPF, V A J; WITTEKINDT B E; ALLENDORF, A; WICHELHAUS, T A; HOGARDT, M; Schlößer, R L; FISCHER, D. Group B streptococcus infections in neonates admitted to a German NICU: Emphasis on screening and adherence to pre-analytical recommendations. *Early Hum Dev.* 103:37-41. 2016.

ROJO-BEZARES, B; AZCONA-GUTIERREZ J M; MARTIN, C; JAREÑO M S; TORRES, C; SAENZ, Y. *Streptococcus agalactiae* from pregnant women: antibiotic and heavy-metal resistance mechanisms and molecular typing. *Epidemiol. Infect.* Early online. 1-10. 2016.

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

SCHUAB, R B B; ARÊAS, G P; SOUZA, V C; BARROS, R R. Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* recovered from significant bacteriuria. *Infect Dis.* Early Online: 1–6. 2015.

SHABAYEK, S. ABDALLA, S. Macrolide- and tetracycline-resistance determinants of colonizing group B Streptococcus in women in Egypt. *J Med Microbiol.* 63, 1324–1327. 2014.

SOUZA, V C; KEGELE, F C O; SOUZA, S R; NEVES, F P G; DE PAULA, G R; BARROS, R R. Antimicrobial susceptibility and genetic diversity of *Streptococcus*

*agalactiae* recovered from newborns and pregnant women in Brazil. *Scand J Infect Dis.* 45: 780–785. 2013.

SUTCLIFFE J., TAIT-KAMRADT A., WONDRAK L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 1817–1824. 1996.

TEIXEIRA, L M; CARVALHO, M G; MERQUIOR, V L; STEIRGERWALT, A G BRENNER, D J; FACKLAM, R R. Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human sources. *J Clin Microbiol* 35: 2778-2781. 1997.

TEIXEIRA, L M; MERQUIOR, V L C; TRABULSI, L R. *Streptococcus*, *Enterococcus* e gêneros relacionados. In: TRABULSI, L R; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*, São Paulo: Atheneu, 2008.

TEIXEIRA L. M.; DUARTE R. S.; TRABULSI L. R. *Streptococcus agalactiae*. In: TRABULSI, L R; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*, São Paulo: Atheneu, 2008.

USEIN, C R; MILITARU, M; CRISTEA, V; Străuț, M. Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Streptococcus agalactiae* strains recovered from female carriers in the Bucharest area. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 109:189–196. 2004.

WANG, P; MA, Z; TONG, J; ZHAO, R; SHI, W; YU, S; YAO, K; ZHENG, Y; YANG, Y. Serotype distribution, antimicrobial resistance, and molecular characterization of invasive group B *Streptococcus* isolates recovered from Chinese neonates. *Int J Infect Dis.* 37: 115-118. 2015

WANG, P; TONG, J; MA, X; SONG, F; FAN, L; GUO C; SHI, W; YU, S; YAO, K; YANG, Y. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* isolates circulating in Beijing, China. *Plos one.* 10: e0120035. 2015.

WEHBEH, W; ROJAS-DIAZ, R; LI, X; MARIANO, N; GRENNER, L; SEGAL-MAURER, S; TOMMASULO, B; DRLICA, K; URBAN, C; RAHAL, J J. Fluoroquinolone-Resistant *Streptococcus agalactiae*: Epidemiology and Mechanism of Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 2495-2497. 2005.

WEISBLUM, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother.* p. 577-585. 1995.

WU, H; JANAPATLA, R P; HO, Y; HUNG, K; WU, C; YAN, J; WU, J. Emergence of fluoroquinolone resistance in group B Streptococcal isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 1888-1890. 2008.

YAO, K; POULSEN, K; MAIONE, D; RINAUDO, D; BALDASSARRI, L; TELFORD, J L. Capsular gene typing of *Streptococcus agalactiae* compared to serotyping by latex agglutination. *J Clin Microbiol.* 51: 503-507. 2013.

YOON, I A; JO, D S; CHO, E Y; CHOI, E H; LEE, H J; LEE, H. Clinical significance of serotype V among infants with invasive group B streptococcal infections in South. *Int J Infect Dis.* 38: 136-140. 2015.