



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL



**Caracterização de estirpes de *Streptococcus*
agalactiae provenientes de colonização dos tratos
genitourinário e gastrointestinal da mulher grávida**

Catarina Isabel Gonçalves Farinha

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS,
ESPECIALIDADE DE BIOLOGIA MOLECULAR EM MEDICINA TROPICAL E INTERNACIONAL

OUTUBRO DE 2012



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL



**Caracterização de estirpes de *Streptococcus*
agalactiae provenientes de colonização dos tratos
genitourinário e gastrointestinal da mulher grávida**

Catarina Isabel Gonçalves Farinha

DISSERTAÇÃO APRESENTADA PARA CUMPRIMENTO DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE DE
BIOLOGIA MOLECULAR EM MEDICINA TROPICAL E INTERNACIONAL, SOB A
ORIENTAÇÃO CIENTÍFICA DE:

Orientadora:

Professora Doutora Ilda Santos-Sanches
Centro de Recursos Microbiológicos (CREM)
Departamento de Ciências da Vida
Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT/UNL)

Co-Orientadora:

Professora Doutora Rita Castro
Laboratório de Doenças Sexualmente Transmissíveis
Unidade de Microbiologia Médica
Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT/UNL)

OUTUBRO DE 2012

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Ilda Sanches e à Professora Doutora Rita Castro por toda a disponibilidade, força e compreensão demonstradas durante este longo percurso, mas acima de tudo, pelo apoio, conhecimentos e motivação transmitidos.

Ao Doutor José Diogo, e a toda a secção de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Garcia de Orta, pela sua colaboração no envio das estirpes, permitindo a concretização deste estudo. Por toda a disponibilidade demonstrada na obtenção de dados importantes para o estudo.

À Doutora Emília Prieto por toda a sua dedicação, pela partilha de conhecimentos e experiência, pela paciência e pela enorme disponibilidade prestadas durante todo este percurso.

À Professora Doutora Filomena Martins Pereira pelo acompanhamento e esclarecimento de dúvidas na fase inicial deste trabalho.

À Professora Doutora Isabel Couto por me apresentar o PFGE, pelos conhecimentos transmitidos, por ter permitido a utilização de equipamento e material do laboratório de Micobactérias, e pela preocupação demonstrada ao longo deste caminho.

À Professora Doutora Lélia Chambel, do Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT) pela simpatia, dedicação, transmissão de conhecimentos e pela facilidade com que me permitiu ter acesso ao *BioNumerics*.

À Professora Doutora Maria José Borrego por ter permitido que efectuasse a genotipagem capsular dos isolados no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Ao Carlos Florindo e à Vera Damião por toda a simpatia, disponibilidade e participação em todo o processo.

À Professora Doutora Aida Esteves pela disponibilidade e pela partilha de conhecimentos e experiência laboratorial.

Aos Professores Doutores João Piedade e Ricardo Parreira por todo o apoio e disponibilidade que demonstraram neste período.

À Márcia Rato pela disponibilidade e apoio prestados neste caminho.

À D. Fernanda, à TACSP Teresa Veneno e à TSS Ângela Lopes pela simpatia e por todo o auxílio prestado durante este percurso.

Aos meus pais e ao meu irmão, por estarem sempre presentes! Por toda a compreensão que tiveram, pelo carinho e conforto, por nunca duvidarem! Pelo conforto nos momentos menos bons e por toda a força transmitida neste longo caminho! A vocês dedico todo o trabalho envolvido para chegar aqui! Obrigada! Adoro-vos!

Aos meus grandes amigos Tatiana, André e Mariana. Pela verdadeira amizade, pelo carinho, pela motivação, pela força e acima de tudo por acreditarem e fazerem-me acreditar. Foi imprescindível ter-vos comigo! Muito Obrigada!

À “Sophie”, pela amizade, pelos ensinamentos, pela companhia nas horas de trabalho (enquanto as estirpes atingiam as DO...) pela paciência e pela motivação que sempre transmitiste.

À “Claudete”, pela amizade, pelo apoio e companhia nos dias de “aventuras” com o “CHEF”, pela força e energia positiva que transmites sempre.

A todos os que me apoiaram de alguma forma, em especial à Catarina, à Rita e à Dr.^a Leonor pelo carinho nos momentos menos bons e por toda a força transmitida.

A todos...MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Streptococcus agalactiae, ou *Streptococcus* do grupo B, é actualmente, o principal responsável pelo desenvolvimento de infecção neonatal, seja de início precoce (nos primeiros 7 dias de vida) ou tardio (entre os 7 dias e os 3 meses de vida). O principal factor de risco ao desenvolvimento de doença neonatal precoce é a colonização rectovaginal da mulher grávida.

No presente estudo foram caracterizados 179 isolados provenientes de colonização dos tratos genitourinário e gastrointestinal da mulher grávida, obtidos no Hospital Garcia de Orta (Almada) entre 2007 e 2010. A colonização vaginal da mulher grávida neste período foi de 12%, e os serótipos mais prevalentemente detectados foram os serótipos Ia, V, IV, II e III, o que está de acordo com outros estudos efectuados em Portugal, à excepção do serótipo IV que tem sido pouco detectado na Europa. Todos os isolados se revelaram susceptíveis à penicilina, ofloxacina e vancomicina e, apenas 11.8% se revelaram susceptíveis a todos os antibióticos testados. A resistência à tetraciclina, eritromicina e clindamicina, de 2007 a 2010, foi de 86.8%, 14.6% e 9.7%, respectivamente. Não foi encontrado nenhum fenótipo de resistência à eritromicina dominante. Neste estudo o serótipo capsular mais associado à resistência à eritromicina foi o serótipo Ia, seguido pelos serótipos III, V e II. Verificou-se a presença de uma associação entre o serótipo Ia, o fenótipo M e a presença do gene *mef(A)*. Os isolados com fenótipo cMLS_B apresentaram o gene *erm(B)* e o gene *erm(A)* [*erm(TR)*] foi detectado em todos os isolados de fenótipo iMLS_B, em ambos os casos com diversos serótipos.

Os isolados pertencentes à mesma grávida foram considerados geneticamente relacionados com base na técnica de PFGE, excepto em dois casos em que as duas mulheres grávidas aparentemente estavam colonizadas por mais do que uma estirpe. Observou-se uma grande heterogeneidade populacional entre os isolados caracterizados. Relativamente à resistência aos macrólidos, a origem foi multiclonal e não derivada da disseminação de um único clone.

Mais estudos epidemiológicos longitudinais são necessários para complementar os já existentes e, conhecer a evolução das estirpes de *S. agalactiae* em circulação, não só a nível nacional, mas em todo o mundo. Desta forma será possível definir a melhor estratégia para a criação de uma vacina adequada à variabilidade populacional de *S. agalactiae*.

Palavras-Chave: *Streptococcus agalactiae*, colonização, grávida, rastreio, restistência aos antibióticos, diversidade genética

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae, or Group B *Streptococci* is the leading cause of neonatal infection, early onset disease (first week of life) or late onset disease (between the 7th day and three weeks of life). The main risk factor for development of neonatal infection is the rectovaginal colonization of pregnant women.

In the present study, were characterized 179 isolates of colonization of the genitourinary and gastrointestinal tracts of pregnant women, obtained at Hospital Garcia de Orta (Almada) between 2007 and 2010. Vaginal colonization of pregnant women in this period was 12% and the Ia, V, IV, II and III serotypes were the most prevalent, which is in agreement with other studies from Portugal, the only exception was serotype IV that has been reported infrequent in Europe. All isolates were susceptible to penicillin, ofloxacin and vancomycin and only 11.8% were susceptible to all antibiotic tested. The resistance to tetracycline, erythromycin and clindamycin, between 2007 and 2010, was 86.8%, 14.6% and 9.7%, respectively. No major erythromycin resistance phenotype was found. Also, in this study the capsular serotype Ia was the most frequently found as associated to erythromycin resistance, followed by the III, V and II serotypes. We observed an association with serotype Ia, the M phenotype and the presence of the *mef(A)* gene. The *erm(B)* gene was detected in isolates with the cMLSB phenotype whereas the *erm(A)* [*erm(TR)*] gene was present in all isolates of iMLSB phenotype, however in both cases with diverse serotypes.

The isolates that belonged to the same pregnant women were considered closely related by PFGE with a exception related of two pregnant women that apparently were colonized by more than one strain. We observed a high populational heterogenicity among the studied isolates. Relatively to the macrolide resistance, it was considered of multiclonal origin instead of being caused by the dissemination of a single clone.

More longitudinal epidemiological studies will be necessary to complement the studies that already exist and to know the evolution of *S. agalactiae* strains circulating not only at national level but also worldwide. Only then it will be possible to define the best strategy to design a vaccine effective against the global *S. agalactiae* population.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, colonization, pregnant women, screening, antibiotic resistance, genetic diversity

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Agradecimentos..... | i |
| Resumo..... | iii |
| Abstract..... | iv |
| Índice..... | v |
| Índice de tabelas..... | viii |
| Índice de figuras..... | x |
| Lista de abreviaturas..... | xi |
| I-INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1. Características de <i>Streptococcus agalactiae</i>..... | 2 |
| 1.1. Genoma de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 3 |
| 1.2. Serótipos capsulares de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 4 |
| 1.3. Transmissão de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 9 |
| 2. Infecção por <i>Streptococcus agalactiae</i>..... | 9 |
| 2.1. Colonização da mulher grávida..... | 10 |
| 2.2. Infecção do recém-nascido..... | 12 |
| 2.3. Infecção dos adultos homens e mulheres não grávidas..... | 14 |
| 3. Prevenção de infecções no recém-nascido..... | 14 |
| 3.1. Factores de risco para o desenvolvimento de doença neonatal por <i>Streptococcus agalactiae</i> | 14 |
| 3.2. Selecção da mulher grávida para quimioprofilaxia intraparto..... | 15 |
| 3.3. Antibioticoterapia de eleição para quimioprofilaxia intraparto..... | 17 |
| 3.4. Vacina..... | 18 |
| 4. Resistência aos antimicrobianos em <i>Streptococcus agalactiae</i>..... | 19 |
| 4.1. Mecanismos de resistência aos macrólidos e lincosamidas..... | 20 |
| 4.2. Mecanismos de resistência à tetraciclina..... | 23 |
| 4.3. Mecanismos de resistência às quinolonas..... | 26 |
| 4.4. Mecanismos de resistência à penicilina..... | 26 |

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 5. Diagnóstico laboratorial de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 27 |
| 5.1. Rastreio de colonização da mulher grávida..... | 27 |
| 5.2. Colheita e processamento..... | 27 |
| 5.3. Identificação de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 30 |
| 5.3.1. Teste de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen)..... | 30 |
| 5.3.2. Pesquisa de antígenos de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 30 |
| 5.3.2.1. Serogrupagem de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 30 |
| 5.3.2.2. Serotipagem de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 31 |
| 5.3.3. Detecção de ácidos nucleicos de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 32 |
| 5.3.3.1. Genotipagem capsular de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 32 |
| 5.3.3.2. Electroforese de campo pulsado (PFGE, de <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>)..... | 33 |
| 5.3.4. Características do teste “ideal” para diagnóstico laboratorial de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 35 |
| 6. Objectivos | 36 |
| 6.1. Objectivos específicos..... | 36 |
| II-MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |
| 1. População de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 38 |
| 2. Identificação de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 39 |
| 2.1. Teste de CAMP..... | 40 |
| 2.2. Serotipagem de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 40 |
| 2.3. Serogrupagem de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 41 |
| 2.4. Genotipagem capsular de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 42 |
| 2.5. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos – Método de difusão em disco..... | 44 |
| 2.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Método de macrodiluição..... | 46 |
| 2.7. Detecção dos genes de resistência ao macrólidos por PCR..... | 48 |

ÍNDICE

| | |
|--|------------|
| 2.8. Electroforese de campo pulsado (PFGE, de <i>Pulsed Filed Gel Electrophoresis</i> | 50 |
| 2.8.1. Propagação das culturas..... | 51 |
| 2.8.2. Lavagem celular..... | 51 |
| 2.8.3. Ajuste da concentração celular..... | 51 |
| 2.8.4. Preparação dos discos de agarose com o DNA..... | 52 |
| 2.8.5. Lise celular..... | 53 |
| 2.8.6. Desproteinização..... | 53 |
| 2.8.7. Lavagem dos discos de agarose com o DNA..... | 53 |
| 2.8.8. Restrição enzimática do DNA..... | 53 |
| 2.8.8.1. Restrição enzimática com <i>SmaI</i> | 53 |
| 2.8.8.2. Restrição enzimática com <i>Cfr9I</i> | 54 |
| 2.8.9. Preparação do gel..... | 54 |
| 2.8.10. Electroforese de campo pulsado..... | 54 |
| 2.8.11. Coloração e visualização do gel..... | 55 |
| 2.8.12. Elaboração de dendrogramas..... | 55 |
| 2.8.13. Preparação de soluções para PFGE..... | 55 |
| III-RESULTADOS..... | 57 |
| 1. Descrição da população de <i>Streptococcus agalactiae</i> em estudo e percentagem de colonização..... | 57 |
| 2. Distribuição dos serótipos capsulares de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 58 |
| 3. Resistência dos isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> aos antimicrobianos.... | 61 |
| 4. Clonalidade dos isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 68 |
| IV-DISCUSSÃO E CONCLUSÃO..... | 79 |
| V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 91 |
| VI-ANEXOS..... | 109 |
| ANEXO I – Dendrograma total (2007-2010)..... | 109 |
| ANEXO II – Dendrograma total (2004-2010)..... | 111 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Incidência e mortalidade de infecção por <i>Streptococcus agalactiae</i> | 2 |
| Tabela 2: Genótipos e fenótipos de resistência aos macrólidos em <i>Streptococcus</i> spp..... | 22 |
| Tabela 3: Resistência de <i>Streptococcus agalactiae</i> à eritromicina, clindamicina e tetraciclina..... | 24 |
| Tabela 4: Critérios de interpretação dos perfis gerados por electroforese de campo pulsado, considerando o número de fragmentos de DNA diferentes | 34 |
| Tabela 5: Distribuição anual (2007-2010) dos isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> por produto biológico..... | 38 |
| Tabela 6: Condições de PCR para a detecção dos genes <i>cpsD-E-F</i> em <i>Streptococcus agalactiae</i> | 43 |
| Tabela 7: Critérios de interpretação do teste de susceptibilidade aos antibióticos para <i>Streptococcus</i> spp. (excepto <i>Streptococcus pneumoniae</i>)..... | 45 |
| Tabela 8: <i>Breakpoints</i> para interpretação do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos em <i>Streptococcus</i> spp. (excepto <i>Streptococcus pneumoniae</i>)..... | 47 |
| Tabela 9: <i>Primers</i> utilizados para detecção dos genes <i>erm(A)</i> [<i>erm (TR)</i>], <i>erm(B)</i> e <i>mef(A)</i> de resistência aos macrólidos..... | 49 |
| Tabela 10: Condições de PCR para a detecção dos genes de resistência aos macrólidos: <i>erm(A)</i> [<i>erm(TR)</i>], <i>erm(B)</i> e <i>mef(A)</i> | 49 |
| Tabela 11: Perfil de amplificação para a detecção dos genes de resistência aos macrólidos: <i>erm(A)</i> [<i>erm(TR)</i>], <i>erm(B)</i> e <i>mef(A)</i> | 50 |
| Tabela 12: Genotipagem capsular do <i>locus cpsD-E-F</i> dos isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 58 |
| Tabela 13: Distribuição dos serótipos capsulares de <i>Streptococcus agalactiae</i> entre 2007-2010..... | 59 |
| Tabela 14: Concentração inibitória mínima dos isolados com resistência intermédia à eritromicina, clindamicina e/ou tetraciclina (no método de Kirby-Bauer)..... | 61 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 15: Resistência dos isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> à eritromicina, clindamicina e tetraciclina entre 2007 e 2010..... | 62 |
| Tabela 16: Associação entre o serótipo capsular e os fenótipos de resistência à eritromicina, clindamicina e tetraciclina..... | 65 |
| Tabela 17: Associação entre serótipo capsular, fenótipo e genótipo de resistência aos macrólidos..... | 67 |
| Tabela 18: Número de isolados e perfis de PFGE por <i>cluster</i> no período de 2007 a 2010..... | 69 |
| Tabela 19: Análise dos <i>clusters</i> de PFGE no período de 2007 a 2010..... | 70 |
| Tabela 20: Número de isolados e perfis de PFGE por <i>cluster</i> no período de 2004 a 2010..... | 73 |
| Tabela 21: Análise dos <i>clusters</i> de PFGE no período de 2004 a 2010..... | 74 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Inóculo de <i>Streptococcus agalactiae</i> não hemolítico e beta-hemolítico..... | 39 |
| Figura 2: Teste de CAMP positivo para <i>Streptococcus agalactiae</i> | 40 |
| Figura 3: Teste de aglutinação para identificação do antígeno do grupo B de Lancefield..... | 42 |
| Figura 4: Teste de indutibilidade da resistência à clindamicina, pela eritromicina.... | 45 |
| Figura 5: Interpretação da concentração inibitória mínima por macrodiluição e teste de indutibilidade de resistência à clindamicina num isolado de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 48 |
| Figura 6: Preparação dos discos de agarose com o DNA..... | 52 |
| Figura 7: Prevalência anual dos serótipos (%) de <i>Streptococcus agalactiae</i> entre 2007 e 2010..... | 59 |
| Figura 8: Prevalência total (%) dos serótipos de <i>Streptococcus agalactiae</i> (2007 a 2010)..... | 60 |
| Figura 9: Resistência dos isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> à eritromicina, clindamicina e tetraciclina (2007-2010)..... | 63 |
| Figura 10: Prevalência (%) dos fenótipos de resistência aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B, entre 2007 e 2010..... | 64 |
| Figura 11: Gel de visualização dos produtos de PCR para os genes <i>erm(A)</i> [<i>erm(TR)</i>], <i>erm(B)</i> e <i>mef(A)</i> de resistência aos macrólidos..... | 66 |
| Figura 12: Gel de visualização dos perfis de PFGE de <i>S. agalactiae</i> | 68 |
| Figura 13: Diversidade de perfis de macrorestrição de <i>Streptococcus agalactiae</i> entre 2004 e 2010..... | 72 |
| Figura 14: Dendrograma representativo de isolados de <i>S. agalactiae</i> resistentes à eritromicina e/ou clindamicina recolhidos no período de 2004 a 2006, no HGO..... | 76 |
| Figura 15: Dendrograma representativo de isolados de <i>S. agalactiae</i> resistentes à eritromicina e/ou clindamicina recolhidos no período de 2007 a 2010, no HGO..... | 77 |

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag – Antígeno

CAMP – Christie-Atkins-Munch-Petersen

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Institute*

cMLS_B – Fenótipo de resistência constitutiva aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B

cps – capsular polysaccharide synthesis

DNP – Doença neonatal precoce

DNT – Doença neonatal tardia

erm – erythromycin ribosome methylase gene

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

HGO – Hospital Garcia de Orta

ICAT – Instituto de Ciência Aplicada e tecnologia

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

iMLS_B – Fenótipo de resistência a macrólidos e resistência induzida às lincosamidas e estreptograminas B

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

L – Fenótipo de resistência às lincosamidas (do inglês, *Lincosamide*)

lnu – lincosamide nucleotidyltransferase gene

LSA – Fenótipo de resistência às lincosamidas e estreptograminas A (do inglês, *Lincosamide, streptogramins A*)

M – Fenótipo de resistência aos macrólidos de 14 e 15 átomos, mediada por bombas de efluxo

mef – *macrolide efflux gene*

min. - minuto

MLS_B – *Macrolide, Lincosamides, Streptogramins B*

MLST – *Multilocus sequencing type*

NT – Não tipáveis

pb – Pares de bases

PBP – Proteínas de ligação á penicilina (PBP, do inglês *Protein binding protein*)

PCR – Reacção de polimerase em cadeia (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PFGE – Electroforese de campo pulsado (PFGE, do inglês *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)

rpm – rotações por minuto

seg. – segundo

ST – Sequência Tipo

TA – Temperatura ambiente

tet – classe de genes que codificam para a resistência à tetraciclina

UPGMA – *Unweighted pair group method with arithmetic average*

I-INTRODUÇÃO

Streptococcus do Grupo B de Lancefield ou *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) como também é denominado, foi identificado em 1920 como agente de mastite bovina (Beitune *et al.*, 2005). Em 1935 foi relatado como agente causal de sépsis em puérperas, sendo, posteriormente na década de 60 (século XX), reconhecido como agente patogénico em crianças com idade inferior a 3 meses de vida (Koenig & Keenan, 2009). Actualmente é responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade na mulher grávida e no recém-nascido (Beitune *et al.*, 2005). No recém-nascido pode ser responsável por doença neonatal precoce (DNP), nos primeiros 7 dias de vida, ou doença neonatal tardia (DNT) quando as manifestações surgem entre os 7 dias e os 3 meses de vida (CDC, 2010; Melin, 2011).

O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que ocorram aproximadamente 1200 casos de DNP anualmente nos Estados Unidos da América (EUA) (CDC, 2010).

Na Tabela 1, encontram-se resumidas as incidências de infecção neonatal (DNP e/ou DNT) em várias regiões do mundo, assim como a taxa de mortalidade descrita em algumas áreas geográficas.

Nos EUA a incidência de DNP decresceu de 1.7 casos/1000 nados vivos nos anos 90 (século XX) para menos de 0.4 casos nos últimos anos, após implementação das medidas preventivas (Van Dyke *et al.*, 2009; Melin, 2011), o mesmo se verificou em Espanha em que a incidência reduziu de 2.4 casos/1000 nados vivos em 1996 para 0.45 casos em 2008 (Melin, 2011). Contudo, apesar desta redução, *S. agalactiae* ainda permanece o principal responsável pela morbidade e mortalidade neonatal precoce (CDC, 2010).

Desde 1990 que *S. agalactiae* foi considerado em Portugal, como o microrganismo mais frequentemente isolado em recém-nascidos, resultante de transmissão materna. É responsável pela grande maioria dos casos de sépsis neonatal precoce, o que releva a necessidade de vigilância epidemiológica para acções preventivas adequadas (Neto, 2008).

Tabela 1: Incidência e mortalidade de infecção neonatal por *Streptococcus agalactiae*

| Área Geográfica | Incidência infecção neonatal/1000 nados vivos |
|-----------------------------------|--|
| EUA ¹ | 0.6 a 1.8 |
| Reino Unido ^{1,4} | 0.7 |
| Irlanda ¹ | 0.7 |
| Europa-Este ² | 0.2-4 |
| Europa-Occidental ² | 0.3-2 |
| Holanda ² | 1.9 |
| Alemanha ¹⁰ | 0.47 |
| Escandinávia ² | 0.76-2 |
| Europa-Sul ² | 0.57-2 |
| Espanha ⁷ | 2.4 |
| Bélgica ² | 2-3 |
| Portugal ^{3,4} | 0.44-0.6 |
| Índia ² | 0.17 |
| África sub-Sahariana ² | 3 |
| Noruega ² | 16.3 |
| Grécia ⁸ | 0.26 |
| Suíça ⁹ | 0.4 |
| Holanda ⁷ | 1.9 |
| Área geográfica | Mortalidade (%) |
| EUA ⁵ | 4-6 |
| Alemanha ¹⁰ | 4.3 |
| Reino Unido ^{1,4} | ~10 |
| França ⁶ | 14.5 em crianças com DNT 2.5 em crianças com DNP |
| Portugal ⁴ | 6.6 |

Resultados publicados por: ¹Lindahl *et al.* (2005), ²Melin, (2011), ³Almeida *et al.* (2004), ⁴Neto (2008) ⁵Schrag *et al.* (2000); ⁶Poyart *et al.* (2008); ⁷Trijbels-Smeulders *et al.* (2002) citado por Bisharat *et al.*, (2005); ⁸Tsolia *et al.*, (2003); ⁹Stan *et al.*, (2001); ¹⁰Fluegge *et al.* (2006)

1. CARACTERÍSTICAS DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Os microrganismos pertencentes ao género *Streptococcus* são bactérias de coloração de Gram positiva, catalase negativa, cujas células têm menos de 2 micrómetros de diâmetro, apresentando-se morfológicamente como cocos (esféricos ou

ovóides) que podem estar agrupados aos pares ou em cadeia (Costa, 2000). Maioritariamente anaeróbios facultativos, são microrganismos exigentes nutritivamente, necessitando de meios de cultura enriquecidos, por exemplo com sangue (Costa, 2000). Na identificação primária de espécies deste género, o tipo de hemólise é uma característica importante, podendo esta ser completa (β -hemólise), incompleta (α -hemólise) ou ausente (γ -hemólise) (Levinson, 2004). Para além do tipo de hemólise, a classificação de Lancefield é também frequentemente considerada para identificar as espécies de *Streptococcus* patogénicas para o Homem (Costa, 2000). Esta classificação de Lancefield permite agrupar as espécies de *Streptococcus* β -hemolíticos de A a U, com base nas diferenças antigénicas existentes no carbohidrato C constituinte da parede celular (Levinson, 2004). As espécies de *Streptococcus* patogénicas para o Homem são, geralmente, β -hemolíticas, com excepção de *Streptococcus pneumoniae* que é α -hemolítico (Costa, 2000). Entre os *Streptococcus* β -hemolíticos, encontra-se *Streptococcus agalactiae*.

S. agalactiae apresenta proteínas de superfície (Glaser *et al.*, 2002) e polissacáridos capsulares que potenciam a sua virulência (Glaser *et al.*, 2002; Cieslewicz *et al.*, 2005; Ramaswamy *et al.*, 2006; Melin, 2011; Martins *et al.*, 2010), pois constituem um mecanismo de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro, através da imitação dos seus antigénios ou através da interferência com o sistema do complemento (Cieslewicz *et al.*, 2005). Na sua constituição possui dois antigénios polissacáridos, o antigénio (Ag) polissacárido capsular específico de tipo e o Ag polissacárido específico do grupo B. O Ag específico do grupo B é comum a todas as estirpes desta espécie e é constituído por unidades de ramnose (Glaser *et al.*, 2002). Os polissacáridos capsulares são o principal alvo dos anticorpos produzidos pelo hospedeiro (Martins *et al.*, 2010) e das vacinas glicoconjugadas (Ramaswamy *et al.*, 2006).

1.1. Genoma de *Streptococcus agalactiae*

Relativamente ao genoma de *S. agalactiae*, são conhecidas as sequências de três estirpes. A estirpe NEM316 serótipo III possui um genoma com 2.21 Mb (2 211 485

pares de bases - pb) (Glaser *et al.*, 2002), a estirpe 2603 V/R serótipo V tem um genoma de 2.16Mb (2 160 267 pb) (Tettelin *et al.*, 2002) e a estirpe A909 serótipo Ia tem um genoma com a dimensão de 2.13 MB (2 127 839 pb) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/186?project_id=57935) (Tellelin *et al.*, 2005). O genoma de *S. agalactiae* contém 35.6% GC, possui um número variável de genes [concretamente 2235 (estirpe NEM316), 2276 (estirpe 2603V/R), 2136 (estirpe A909)] que codificam cerca de 2000 proteínas [concretamente 2094 (estirpe NEM316), 2124 (estirpe 2603V/R), 1996 (estirpe A909)] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=streptococcus%20agalactiae>).

1.2. Serótipos capsulares de *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae é classificado de acordo com os polissacáridos capsulares e a sua reactividade imunológica (Glaser *et al.*, 2002), nos serótipos Ia, Ib, II-VIII, e mais recentemente no serótipo IX (Martins *et al.*, 2010; Brzychczy-Wtoch *et al.*, 2010; Slotved *et al.*, 2007).

Os polissacáridos capsulares de *S. agalactiae* são constituídos por unidades de repetição, cuja composição em monossacáridos é semelhante em todos os serótipos, contudo, apresentam diferenças que os permite ter antigenicidade distintas. Apesar de *S. agalactiae* não ser naturalmente competente para receber DNA de outras espécies por transformação, a transferência horizontal de genes ou a recombinação entre serótipos de *S. agalactiae*, parecem ser as explicações para a diversidade estrutural dos polissacáridos (Cieslewicz *et al.*, 2005). Todos os serótipos apresentam glucose, galactose e ácido N-acetilneuramínico na constituição dos polissacáridos. Os serótipos VI e VIII apresentam ainda N-acetilglucosamina enquanto que a ramnose se encontra presente apenas no serótipo VIII (Cieslewicz *et al.*, 2005).

Os serótipos mais frequentemente detectados são os serótipos Ia, II, III e V que representam pelo menos 80% dos isolados nos EUA, na Europa ocidental (Florindo *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2008) e na Australásia (Kong *et al.*, 2008). Embora estirpes de todos os serótipos possam causar infecções no Homem (Cieslewicz *et al.*, 2005), os serótipos mais frequentemente isolados em casos de infecção neonatal por *S. agalactiae*

são os serótipos Ia, III e V (Gherardi *et al.*, 2007). Nos EUA, China, Alemanha, Austrália e Nova Zelândia, os isolados de *S. agalactiae* com serótipos Ia e III são os que mais frequentemente colonizam o trato genital da mulher grávida (Wen *et al.*, 2006). Os serótipos Ib, II e V parecem apresentar menor virulência que o serótipo III. Contudo, o potencial de virulência do serótipo Ia parece variar conforme o local geográfico, sendo que em estudos efectuados na África do Sul, em Taiwan e na Holanda o serótipo Ia é descrito como menos virulento que o serótipo III enquanto que em Portugal, em Israel e na Suécia é descrito como mais invasivo (Madzivhandila *et al.*, 2011).

Isolados de *S. agalactiae* com serótipo III foram os principais agentes etiológicos de DNP e DNT em estudos efectuados no Japão (Murayama *et al.*, 2009) e na África do Sul (Madzivhandila *et al.*, 2011). Em Portugal, o serótipo Ia encontra-se mais associado a DNP e o serótipo III a DNT, embora o clone ST17 de serótipo III apresente potencial invasivo para DNP e DNT (Martins *et al.*, 2007).

A distribuição dos serótipos sofre variações geográficas e temporais (Ramaswamy *et al.*, 2006; Brzywczy-Wtoch *et al.*, 2010). Antes da década de 80 (século XX), o serótipo V era raramente detectado (Tettelin *et al.*, 2002), contudo, nos últimos anos tem sido o mais prevalente em adultos (homens e mulheres não grávidas) em estudos efectuados na América do Norte, Taiwan e Zimbabué (Wang *et al.*, 2010). Este serótipo apresenta uma baixa prevalência na África do Sul, Malawi enquanto que em Inglaterra, País de Gales e nos EUA a sua prevalência é elevada (Madzivhandila *et al.*, 2011), sendo responsável por 24-31% das doenças invasivas em adultos (homens e mulheres não grávidas) nos EUA (Ramaswamy *et al.*, 2006). O serótipo Ib apresenta elevada prevalência na Coreia (Uh *et al.*, 2005), enquanto que os serótipos VI e VIII são prevalentes no Japão (Lachenauer *et al.*, 1999; Terakubo *et al.*, 2003) e o serótipo IV nos Emirados Árabes Unidos (Amin *et al.*, 2002). Relativamente aos serótipos IV, VI, VII e VIII são raramente isolados na Europa e nos EUA (Uh *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2008; Brimil *et al.*, 2005), enquanto que os serótipos III e V são os mais frequentemente detectados em Portugal em mulheres em idade reprodutiva (Florindo *et al.*, 2010).

A percentagem de *S. agalactiae* cujo polissacárido capsular não é identificável (por técnica de aglutinação com anti-soros específicos), considerados não tipáveis (NT) pode variar de 4 a 12% (Ramaswamy *et al.*, 2006), contudo, outro estudo revela uma

percentagem de isolados NT compreendida entre 7 e 32% (Kong *et al.*, 2008). Na Europa e EUA essa percentagem oscila entre 8-14% (Margarit *et al.*, 2009) Esta situação pode dever-se ao défice na produção de polissacáridos capsulares ou à presença de mutações ou inserção de elementos genéticos móveis no locus *cps* (*capsular polysaccharide synthesis*) conduzindo à perda de funções de proteínas envolvidas na síntese dos polissacáridos capsulares (Martins *et al.*, 2010). A existência de isolados NT pode dever-se à fraca ou mesmo à ausência de expressão de polissacáridos capsulares, resultando num baixo potencial de virulência (Martins *et al.*, 2007).

Num estudo efectuado na Coreia do Sul (1990-2002), o serótipo III foi o mais prevalente, seguido pelos serótipos Ib, V, Ia, VI, II, VIII, IV e VII (36,5%, 22%, 21.1%, 9.6%, 4.3%, 1.8%, 1.3%, 1.1% e 0.9%, respectivamente) (Uh *et al.*, 2005). No Japão (2006-2007), em isolados provenientes de locais estéreis, a distribuição de serótipos no adulto, revelou-se diferente, existindo um predomínio do serótipo Ib (31.5%), seguido dos serótipos V (18.5%), II e III, 12.1% cada (Murayama *et al.*, 2009).

Nos Emirados Árabes Unidos (1998- 1999), o serótipo IV (26.3%) foi o mais prevalentemente detectado em isolados provenientes de colonização da mulher grávida. Os serótipos Ia e III apresentaram também prevalências elevadas, de 21% e 17.6%, respectivamente. Neste estudo, a percentagem de isolados não serotipáveis foi de 15.8% (Amin *et al.*, 2002)

Em França, isolados provenientes de colonização de mulheres grávidas apresentam uma predominância do serótipo III (41%), Ia (26%) e V (18%), enquanto que os serótipos Ib e II estiveram presentes em apenas 8% cada um (Mee-Marquet *et al.*, 2009). Num outro estudo efectuado em França (2006-2007) foram isoladas 109 estirpes de *S. agalactiae* responsáveis por infecção neonatal, tendo-se verificado DNP em 36% dos casos e DNT em 64% das infecções neonatais. O serótipo III foi o serótipo predominante na DNP (61.5%) seguido dos serótipos Ia (28.2%), Ib (5.1%), II (2.5%) e V (2.5%), não tendo sido detectados os serótipos IV, VI-IX. O serótipo III foi também o mais prevalente na DNT (83%), seguido dos serótipos Ia (7.4%), Ib (4.5%) e V (1.5%) (Poyart *et al.*, 2008).

Em Taiwan (2006-2008), verificou-se um predomínio do serótipo V entre os isolados provenientes de adultos, seguido dos serótipos Ib, III; VI, IV, II, Ia e VII, tendo sido detectados 11 isolados NT (Wang *et al.*, 2010).

Entre 2001 e 2003, na Alemanha, a colonização das grávidas deveu-se sobretudo ao serótipo III (28%), seguido dos serótipos II (21%) Ia (17%), V (16%), Ib (15%) e IV (3%). Os serótipos VI-VIII não foram detectados no estudo (Brimil *et al.*, 2005). No estudo efectuado por Kunze e colaboradores (2011), o serótipo III foi também o mais isolado na mulher grávida e no recém-nascido.

Na República Checa (2001-2002), a colonização da mulher grávida por *S. agalactiae* foi causada por estirpes de serótipos III, Ia, V e II, tendo-se verificado uma percentagem de isolados não tipáveis de 1.8% (Motlová *et al.*, 2004).

Na África do Sul (2004-2007), o serótipo III foi o predominante entre os isolados associados a colonização de mãe e recém-nascido, representando conjuntamente com os serótipos Ia e Ib, 74.1% e 69.6%, na mãe e recém-nascido, respectivamente. Os serótipos III (predominante) e Ia foram prevalentes nas estirpes invasivas enquanto que os serótipos VI, VII, VIII e IX não foram detectados. Neste estudo verificou-se uma concordância de 90.7% entre os serótipos de *S. agalactiae* isolados na mãe e recém-nascido (Madzivhandila *et al.*, 2011).

Em Itália, de 2002 a 2005 (Gherardi *et al.*, 2007), em 91 isolados de *S. agalactiae* (de colonização e invasivos) 15 eram NT, 21 do serótipo III, 16 do serótipo Ia, 14 do serótipo V, 13 do serótipo II, 5 do serótipo Ib, 3 do serótipo IV e 4 do serótipo VII. Os serótipos VI e VIII não foram detectados. O serótipo Ia foi encontrado maioritariamente nas estirpes invasivas (29%), o serótipo V foi detectado sobretudo nos isolados de *S. agalactiae* não invasivos (25%) e os isolados NT predominaram entre os isolados associados a colonização (29.1%). Neste estudo o serótipo III foi identificado maioritariamente como colonizador (33%) comparativamente ao número de isolados invasivos e não invasivos detectados com este serótipo, contudo a diferença não foi estatisticamente significativa.

No sul do Brasil (2006-2008) num estudo efectuado em doentes internados e/ou ambulatório, em isolados colonizadores, invasivos e não invasivos, foram detectados os

seguintes serótipos: Ia (38.1%), Ib (10.1%), II (16.1%), III (3%), IV (13.1%), V (12.5%) e NT (7.1%) (Palmeiro *et al.*, 2010).

Na Grécia (2000-2001), o serótipo mais prevalente entre isolados de colonização da mulher grávida foi o serótipo II (26.9%), seguido dos serótipos III (22.4%) e Ia (19.4%). Todos os restantes serótipos foram detectados embora a prevalência de cada um fosse inferior a 10% (Tsolia *et al.*, 2003).

Num estudo efectuado com isolados obtidos em Angola, observou-se a presença de isolados de *S. agalactiae* de serótipos Ia e III em crianças com meningite (Florindo *et al.*, 2011).

Num estudo efectuado com isolados obtidos em Barcelona (de 1992 a 2009) foram caracterizados 212 isolados provenientes de infecção neonatal (DNP e DNT), tendo sido observado um predomínio dos serótipos III (55.7%) e Ia (22.2%). O serótipo III (ST17) revelou um elevado potencial invasivo para DNT (Martins *et al.*, 2011), o que também já tinha sido verificado em Portugal por Martins e colaboradores (2007).

Em Portugal, em 2007 e 2008 (Santarém, Hospital Distrital de Santarém), a distribuição dos serótipos na grávida colonizada por *S. agalactiae* foi: Ia (26.3%), Ib (8.8%), II (10.5%), III (19.3%), IV (15.8%), V (17.55%) e NT (1.75%) (Rodrigues, 2009). Num outro estudo efectuado em Portugal, os serótipos III (21.93%), V (21.93%), II (17.1%) e Ia (15.61%) também foram os serótipos mais detectados nos isolados de mulheres grávidas, tendo os outros serótipos sido identificados em menor frequência: Ib (5.2%), IV (2.23%), VII (1.9%). A percentagem de isolados não serotipáveis por técnica de aglutinação neste estudo foi de 14.1%. Neste mesmo estudo, os autores observaram que os isolados de serótipo Ia e III foram os mais frequentemente detectados em casos de infecção neonatal por este microrganismo (Martins *et al.*, 2007). Em Lisboa, de 2005 a 2007, foram rastreadas para pesquisa de *S. agalactiae* 4269 mulheres em idade reprodutiva, em que 1310 eram grávidas. Não houve diferença na frequência de colonização por *S. agalactiae* entre mulheres grávidas e não grávidas. Foram caracterizados 100 isolados com a seguinte distribuição de serótipos: III (35%), V (33%), Ia (16%), II (10%), Ib (3%) e IV (3%). (Florindo *et al.*, 2010). Ainda em Portugal, de 2004 a 2006, num outro estudo que envolveu o rastreio de grávidas em

diversas regiões do país (Almada, Coimbra, Porto, Lisboa e Amadora) verificou-se a seguinte distribuição de serótipos: Ia (23.9%), Ib (8.8%), II (13.9%), III (27%), IV (7.1%), V (13.1%) e NT (6.2%) (Guimarães, 2008). O serótipo Ib foi identificado como responsável por dois casos de meningite em duas mulheres adultas, não grávidas, num hospital da área de Lisboa. Os isolados obtidos das duas pacientes revelaram não só o mesmo serótipo capsular, mas também o mesmo perfil de PFGE e sequência tipo (ST10). Embora não tenha sido determinada uma fonte comum, a proximidade de residência destas duas mulheres levou os autores a considerar uma origem comum (Martins *et al.*, 2007).

1.3. Transmissão de *Streptococcus agalactiae*

A colonização vaginal por *S. agalactiae* é adquirida através do trato gastrointestinal, considerado o principal reservatório humano deste microrganismo (Koenig & Keenan, 2009; CDC, 2010; Jahromi *et al.*, 2008; Melin, 2011; El Aila *et al.*, 2010). A transmissão fecal-oral também pode acontecer (Manning *et al.*, 2004; Foxman *et al.*, 2007), assim como pelos alimentos, uma vez que este microrganismo é também agente patogénico de bovinos e peixes (Foxman *et al.*, 2007). O trato respiratório superior constitui um reservatório de *S. agalactiae* (Ferrieri & Blair, 1977; Martins *et al.*, 2007) e pode constituir uma fonte de transmissão (Martins *et al.*, 2007). A actividade sexual constitui uma outra fonte de transmissão deste microrganismo (Manning *et al.*, 2004; Foxman *et al.*, 2007; Meyn *et al.*, 2002). A transmissão horizontal durante o período perinatal pode ocorrer de mãe para filho, como por exemplo através do leite materno, assim como através da comunidade ou hospital (Melin, 2011).

2. INFECÇÃO POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

O estabelecimento de uma infecção por *S. agalactiae* está relacionado não só com o sistema imunitário do hospedeiro mas também com factores bacterianos na medida em que no processo evolutivo emergem clones mais virulentos (Rolland *et al.*, 1999).

Este microrganismo pode originar infecções não só em mulheres grávidas e recém-nascidos, mas também em idosos e mulheres não grávidas, contudo, a sua maior incidência ocorre nos recém-nascidos (CDC, 2010; Melin *et al.*, 2011).

2.1. Colonização da mulher grávida

A colonização vaginal é adquirida através do trato gastrointestinal (Koenig & Keenan, 2009; CDC, 2010; Jahromi *et al.*, 2008; Melin, 2011; El Aila *et al.*, 2010), contudo, pouco se sabe sobre as características da bactéria ou do hospedeiro que influenciam a colonização com *S. agalactiae* (Manning *et al.*, 2008). A colonização da mulher grávida apresenta variações de acordo com a etnia e a geografia (Jahromi *et al.*, 2008; Beitune *et al.*, 2005; Motlová *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2004), sendo semelhante em mulheres grávidas e não grávidas (Beitune *et al.*, 2005; Motlová *et al.*, 2004). São desconhecidas as razões para a discrepância de colonização com *S. agalactiae* entre etnias (Meyn *et al.*, 2002), contudo pensa-se que as condições socioeconômicas (Jahromi *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2004), imunidade do hospedeiro, doenças sexualmente transmissíveis e nutrição possam contribuir para as discrepâncias entre etnias e regiões geográficas (Jahromi *et al.*, 2008). Factores como uma maior colonização materna, uma maior quantidade de partos prematuros e um menor acesso aos cuidados de saúde durante a gravidez contribuem para uma maior incidência de doença invasiva por *S. agalactiae* nos recém-nascidos de raça negra (CDC, 2007).

Existe um risco acrescido de aborto espontâneo, ruptura prematura das membranas, parto prematuro ou baixo peso à nascença do recém-nascido, quando a mãe se apresenta colonizada com *S. agalactiae* durante a gravidez. (Beitune *et al.*, 2005). Segundo Daugaard e colaboradores (1988), citado por Guimarães (2008), existe uma associação entre a presença de *S. agalactiae* na urina e no cérvix com a ocorrência de aborto tardio.

A colonização da mulher grávida pode resultar em corioamniotites e endometrites, assim como na infecção da parede abdominal, abscesso pélvico, osteomielite e meningite, embora estas últimas situações sejam menos frequentes

(Beitune *et al.*, 2005). Este microrganismo pode ainda provocar esterilidade materna (Rolland *et al.*, 1999).

Na mulher grávida, a colonização por *S. agalactiae* foi documentada como variável entre 10 a 37% (Melin, 2011; El Aila *et al.*, 2010). Na Bélgica, a colonização da mulher grávida oscila entre 13 e 25%, sendo este microrganismo responsável por 38% dos casos de DNP (El Aila *et al.*, 2010). Já no Irão, a percentagem de colonização rectovaginal apresenta-se mais baixa (9.1%) (com transmissão vertical em 60% dos casos) (Jahromi *et al.*, 2008), assim como na Grécia (2000-2001) em que a colonização da mulher grávida foi de 6.6 % (Tsolia *et al.*, 2003), e nos Emirados Árabes Unidos foi de 10.1% (Amin *et al.*, 2002), enquanto que no Brasil essa percentagem foi em média de 27.6% (Nomura *et al.*, 2009).

A colonização da mulher grávida foi de 8% em França (Mee-Marquet *et al.*, 2009), 16% na Alemanha em mulheres grávidas ou não (Brimil *et al.*, 2005), enquanto que na República Checa, foi encontrada uma percentagem de colonização da mulher grávida de 29.3% (Motlová *et al.*, 2004). Na Dinamarca, a colonização da mulher grávida oscilou entre 33 e 38%, independentemente da idade gestacional, tendo-se verificado colonização persistente em 28% dos casos (Hansen *et al.*, 2004). No Chile a colonização foi de 19.8% (Abarzúa *et al.*, 2002), enquanto que na Tanzânia, a percentagem de colonização da grávida com *S. agalactiae* foi de 23% e de 8.9% nos recém-nascidos, tendo-se verificado transmissão vertical em 37% dos casos (Joachim *et al.*, 2009). Em Espanha observou-se uma percentagem de colonização rectovaginal da mulher grávida de 18% (Marimón *et al.*, 2005).

Em estudos efectuados em diferentes áreas geográficas de Portugal foram encontradas diferentes taxas de colonização da mulher grávida: no Hospital Distrital de Santarém foi de 21.1% (Rodrigues, 2009), no Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga de 19.7% (Araújo, 2010) e, em Braga foi de 34.9% (Areal *et al.*, 2010). No Hospital Fernando da Fonseca a frequência de colonização foi de 18% (Mendinhos *et al.*, 2006, citado por Areal *et al.*, 2010) e, no Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro foi de 18% (Pinheiro, 2009).

2.2. Infecção do recém-nascido

Na DNP, a transmissão de *S. agalactiae* pode ter ocorrido durante a passagem pelo canal de parto, assim como através da ascensão deste microrganismo, após ruptura das membranas, da vagina até ao líquido amniótico (CDC, 2010; Beitune *et al.*, 2005; El Aila *et al.*, 2010). Uma vez na cavidade amniótica *S. agalactiae* pode colonizar a pele e mucosas fetais assim como alcançar os pulmões, através da aspiração do líquido amniótico por parte do feto. Após o nascimento, e replicação de *S. agalactiae*, ocorre aderência deste ao epitélio pulmonar, com lesão das células epiteliais e endoteliais do pulmão, invade a corrente sanguínea podendo originar septicémia e, consequentemente, meningite e osteomielite (Melin, 2011; Lindahl *et al.*, 2005). Quando não são aplicadas medidas preventivas, 1 a 2% dos recém-nascidos desenvolve infecção sintomática, na grande maioria dos casos (90%) nas primeiras 24 horas de vida (Beitune *et al.*, 2005; CDC, 2010; de-Paris, *et al.*, 2011; Motlová *et al.*, 2004). As manifestações clínicas mais frequentes são pneumonia, sépsis e, mais raramente, meningite (CDC, 2010). O risco do recém-nascido desenvolver DNP e de falecer como consequência da doença é tanto maior quanto menor o tempo de gestação (Melin, 2011; Almeida *et al.*, 2004) e menor o peso à nascença (Koenig & Keenan, 2009). Apesar de a prematuridade ser um factor de risco importante, 75% dos casos de DNP ocorrem em recém-nascidos de termo (Melin, 2011; Almeida *et al.*, 2004). A colonização materna por *S. agalactiae* aumenta em 25 vezes o risco de DNP (Beitune *et al.*, 2005).

Permanece por explicar a patogénese da DNT, contudo em alguns casos verifica-se que o serótipo responsável é o mesmo que foi isolado nas respectivas mães (Martins *et al.*, 2007), o que sugere transmissão de mãe para o filho (Lindahl *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2007), a qual pode ocorrer através do leite materno (Melin, 2011; Martins *et al.*, 2007). A DNT pode também derivar de infecção nosocomial, sendo primeiramente afectados os recém-nascidos prematuros, os quais adquirem a bactéria através do contacto com os profissionais de saúde (Lindahl *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2007) ou equipamentos contaminados. A prematuridade constitui o principal factor de risco para o desenvolvimento de DNT (Lin *et al.*, 2003) que se manifesta, maioritariamente com bacteriémia e meningite (Melin, 2011; Lindahl *et al.*, 2005).

A transmissão vertical de *S. agalactiae* acontece em 30 a 70% dos recém-nascidos em cujas mães *S. agalactiae* foi isolado durante a gravidez (Beitune *et al.*, 2005; CDC, 2010; de-Paris, *et al.*, 2011; Motlová *et al.*, 2004). Os recém-nascidos de mães colonizadas com *S. agalactiae* apresentam colonização das mucosas superficiais (oral, nasofaringe, vagina, ânus e pele) em 60% dos casos (Joachim *et al.*, 2009). Num estudo efectuado na África do Sul, 28.1% dos recém-nascidos colonizados com *S. agalactiae* nasceram de mães com resultado negativo para o exsudado vaginal. Verificou-se ainda que a transmissão vertical ocorreu em 52.5% dos casos (Madzivhandila *et al.*, 2011).

A DNP está fortemente associada à colonização materna enquanto que na DNT, apenas se verifica essa ligação numa parte das crianças (Koenig & Keenan, 2009). Um outro factor que contribui para a infecção do recém-nascido com *S. agalactiae* são os baixos níveis de anticorpos maternos contra o polissacárido capsular ou contra as proteínas de superfície (Lindahl *et al.*, 2005), assim como a fraca resposta imunitária do recém-nascido. A resistência à opsonização pelo complemento é o principal mecanismo de patogenicidade de *S. agalactiae* para desencadear DNP (Adderson *et al.*, 2000). As crianças que sobrevivem à infecção por *S. agalactiae*, podem apresentar perturbações no desenvolvimento, entre as quais, perda de visão, perda de audição, atraso mental (Schrag *et al.*, 2000; Lindahl *et al.*, 2005), hidrocefalo, atraso na fala e linguagem (Lindahl *et al.*, 2005). Cerca de 50% dos recém-nascidos que sofrem de meningite derivada de infecção com *S. agalactiae* apresentam deficiências e aproximadamente 30% têm sequelas neurológicas (Melin, 2011).

A quimioprofilaxia intraparto pode reduzir o grau de colonização (Scharg *et al.*, 2000) mas não afecta a DNT (Melin, 2011). Desde a implementação das normas preventivas pelo CDC, os casos de DNP precoce diminuíram em mais de 60% (de-Paris *et al.*, 2011).

Num estudo efectuado no Hospital Dona Estefânia em Portugal, a incidência de doença causada por *S. agalactiae* em crianças com menos de 3 meses (por cada 1000 nados vivos) oscilou de acordo com a região geográfica: 0.9 no norte, 0.4 no centro, 0.4 em Lisboa e Vale do Tejo e 0.2 no Algarve e Ilhas (Neto, 2008).

2.3. Infecção dos adultos homens e mulheres não grávidas

No adulto, *S. agalactiae* pode originar infecções locais ou disseminadas, sendo os principais grupos afectados, os diabéticos, as mulheres grávidas, as mulheres no pós-parto e os doentes imunocomprometidos (Gordillo *et al.*, 1993). Além da diabetes, entre outras patologias estão a cirrose, cancro da mama (Farley, 2001), falência renal (Wang *et al.*, 2010).

A fonte de infecção para os adultos não é conhecida (<http://www.cdc.gov/groupbstrep/about/adults.html>), porém infecções da pele, tecidos moles, ossos e articulações, pneumonia, meningite, urosépsis, endocardite, podem ocorrer (Farley *et al.*, 2001; Domelier *et al.*, 2008).

A taxa de infecção por *S. agalactiae* em adultos com mais de 65 anos é de 33%, sendo este o grupo etário que apresenta maior mortalidade após infecção por este microrganismo (15%) (Koenig & Keenan, 2009). A taxa de infecção aumenta com a idade e é duas vezes mais frequente na raça negra (Farley, 2001). A meningite constitui um risco de morte superior aos outros quadros clínicos (Schrag *et al.*, 2000) embora ocorra raramente (<http://www.cdc.gov/groupbstrep/about/adults.html>).

O serótipo V, desde a década de 80 (século XX), tem sido identificado como o serótipo mais frequentemente associado a infecções em adultos (homens e mulheres não grávidas) na América do Norte, Taiwan, Zimbabué (Wang *et al.*, 2010).

3. PREVENÇÃO DE INFECÇÕES NO RECÉM-NASCIDO

3.1. Factores de risco para o desenvolvimento de doença neonatal precoce por *Streptococcus agalactiae*

A colonização materna dos tratos genitourinário e/ ou gastrointestinal é o primeiro factor de risco para o desenvolvimento de DNP (CDC, 2010; Melin, 2011). A existência de infecções urinárias por *S. agalactiae* durante a gravidez constitui um risco elevado. Outros factores como a idade gestacional inferior a 37 semanas, ruptura prolongada das membranas (superior a 18 horas) (CDC, 2010; Beitune *et al.*, 2005; Melin, 2011; El Helali *et al.*, 2009), infecção intra-amniótica (CDC, 2010), gravidez

precoce (idade inferior a 20 anos), raça negra, febre intraparto (superior ou igual a 38°C) e baixos níveis de anticorpos anticapsulares de *S. agalactiae* aumentam também o risco de DNP. Grávidas que já tenham tido filhos com DNP possuem risco aumentado nas gravidezes seguintes (CDC, 2010; Beitune *et al.*, 2005; Melin, 2011). A diabetes mellitus gestacional constitui também um factor de risco (Beitune *et al.*, 2005). Outros factores, tais como procedimentos obstétricos (utilização de dispositivos de monitorização intrauterinos) ou realização de 5 ou mais exames vaginais durante o parto têm também sido mencionados (CDC, 2010; Melin, 2011). Não obstante, permanece por explicar a razão da divergência entre a incidência de infecção por *S. agalactiae* entre indivíduos de raça negra face a outros grupos raciais (Schrag *et al.*, 2000). No entanto em 50% dos casos de recém-nascidos com DNP, nenhum desses factores é observado nas mães (Melin, 2011). O risco do recém-nascido desenvolver DNP é maior se a grávida apresentar culturas positivas no rastreio às 35-37 semanas de gestação mesmo sem factores de risco durante o parto, comparativamente às grávidas cujo rastreio foi negativo mas apresentam no mínimo um factor de risco intraparto, sendo as incidências de 5,1 e 0,9 casos/1000 nados vivos, respectivamente (CDC, 2010). A presença de apenas um dos factores de risco aumenta a probabilidade da grávida ter um filho com DNP 6,5 vezes.

3.2. Selecção da mulher grávida para quimioprofilaxia intraparto

Para a identificação de grávidas em risco de transmissão de *S. agalactiae* são considerados dois critérios: um deles é a presença de factores de risco, tais como um parto em idade gestacional inferior às 37 semanas, uma temperatura materna igual ou superior a 38°C (durante o parto) ou uma ruptura das membranas superior a 18 horas; o outro factor é o rastreio da colonização vaginal e/ou rectal da grávida, sendo este efectuado por cultura entre as 35 e as 37 semanas de gestação (CDC, 2010). Contudo, o rastreio baseado na cultura tem-se revelado mais eficaz do que o rastreio baseado apenas nos factores de risco (Church *et al.*, 2008; Schrag *et al.*, 2002; Melin, 2011). Quando o rastreio é baseado nos factores de risco apenas 68,8% dos casos de DNP são prevenidos contrariamente ao rastreio apoiado na cultura entre as 35 e as 37 semanas de gestação, em que a percentagem de prevenção é na ordem dos 86% (Beitune *et al.*,

2005). As normas recomendadas pelo CDC baseiam-se no rastreio por cultura e na quimioprofilaxia intraparto em mulheres grávidas colonizadas com *S. agalactiae*. O rastreio baseado em factores de risco deve ser aplicado somente nos casos em que no momento do parto o estado de colonização da grávida é desconhecido (Melin, 2011; CDC, 2010). Uma das limitações do rastreio baseado na cultura às 35-37 semanas de gestação prende-se com o facto de não englobar os partos prematuros (7 a 11% dos nascimentos), considerados como factor de risco elevado de infecções graves (Daniels *et al.*, 2011; Honest *et al.*, 2006), associados a 32 a 38% dos casos de DNP (Honest *et al.*, 2006), no entanto, permite iniciar a quimioprofilaxia no momento de admissão hospitalar (Daniels *et al.*, 2011)

Para a quimioprofilaxia intraparto, são seleccionadas todas as grávidas que já tenham filhos que desenvolveram DNP, assim como aquelas que apresentem bacteriúria por *S. agalactiae* em qualquer trimestre da gravidez ou rastreio positivo às 35-37 semanas de gestação. Contudo, as duas primeiras situações por si só permitem seleccionar a grávida para quimioprofilaxia intraparto sem necessidade de efectuar o rastreio do terceiro trimestre da gravidez. A percentagem de mulheres grávidas que apresenta *S. agalactiae* na urina em qualquer trimestre da gravidez oscila entre 2 e 7 % (CDC, 2010). A presença de bacteriúria por *S. agalactiae* em mulheres grávidas é um marcador de elevada colonização vaginal, aumentando por isso o risco de DNP (McKenna *et al.*, 2003). Num estudo efectuado a 2318 grávidas, apenas 30% das grávidas com bacteriúria assintomática no primeiro trimestre da gravidez apresentaram colonização do trato vaginal no período entre as 35-37 semanas de gestação. Destes 30%, apenas 63% apresentaram o mesmo serótipo nos pares urina/exsudado vaginal (McKenna *et al.*, 2003).

Todas as mulheres grávidas colonizadas por *S. agalactiae* devem efectuar terapêutica intraparto, excepto se o parto ocorrer por cesariana antes de ter sido iniciado o trabalho de parto em mulheres grávidas com as membranas intactas. Quando a cesariana é efectuada antes do início do trabalho de parto, e quando ainda não existe ruptura de membranas, o risco do recém-nascido, cujo nascimento ocorreu no final do tempo, sofrer de DNP é extremamente baixo (CDC, 2010).

3.3. Antibioticoterapia de eleição para quimioprofilaxia intraparto

A quimioprofilaxia intraparto foi implementada pela primeira vez na década de 80 (século XX) e tem-se revelado eficiente na redução da transmissão vertical de *S. agalactiae*, prevenindo o desenvolvimento de DNP (CDC, 2010; Schrag *et al.*, 2000). Nos anos 90, o recurso a esta medida preventiva permitiu reduzir em 70% a incidência de DNP, revelando uma eficácia de 86-89% na prevenção desta patologia (Schrag *et al.*, 2002). A quimioprofilaxia no período pré-natal não erradica definitivamente *S. agalactiae* dado que a colonização pode ser persistente ou intermitente (Beitune *et al.*, 2005).

S. agalactiae é susceptível a muitos agentes antimicrobianos, nomeadamente antibióticos β -lactâmicos (CDC, 2010; Beitune *et al.*, 2005), sendo a penicilina G a primeira opção a utilizar (Beitune *et al.*, 2005). A sua administração pelo menos 4 horas antes do parto revela uma elevada protecção contra a transmissão vertical de *S. agalactiae*, prevenindo a DNP, contudo, uma duração mais curta também confere alguma protecção (Melin, 2011).

Também tem sido descrita susceptibilidade à vancomicina, cloranfenicol, cefalosporinas de primeira e segunda geração (excepto cefoxitina) assim como de terceira geração. Os aminoglicosídeos por si só não apresentam efeito contra *S. agalactiae*; contudo, potenciam a actividade da ampicilina ou da penicilina G, quando administrados em conjunto. A gentamicina como co-adjuvante no tratamento de infecção por *S. agalactiae* parece ter particular interesse em situações de doença fulminante e infecções profundas como a endocardite (Farley *et al.*, 2001). Quando ocorre suspeita de DNP deve ser iniciada terapêutica com ampicilina e gentamicina (Almeida *et al.*, 2004).

As mulheres grávidas alérgicas à penicilina mas sem antecedentes de anafilaxia, angioedema, perturbações respiratórias e urticária após administração de penicilina ou cefalosporina, devem ser tratadas com cefazolina. Das grávidas alérgicas à penicilina, 10% também desenvolvem hipersensibilidade imediata às cefalosporinas (CDC, 2010). Quando a mulher grávida é alérgica à penicilina e apresenta risco elevado de anafilaxia o antibiótico a administrar é a clindamicina. Nestas circunstâncias, deve também ser

testada a susceptibilidade à eritromicina e no caso de existir resistência à eritromicina e sensibilidade à clindamicina, deve ainda avaliar-se se existe resistência induzida à clindamicina. A clindamicina só é administrada se o isolado de *S. agalactiae* for susceptível aos dois antibióticos ou se não existir resistência induzida à clindamicina. A vancomicina deve ser considerada quando existe resistência intrínseca ou induzida à clindamicina ou quando não é conhecida a susceptibilidade à eritromicina e clindamicina (CDC, 2010).

3.4. Vacina

A vacinação é considerada uma alternativa mais eficaz e mais económica para prevenção da DNP principalmente quando comparada com os inconvenientes da administração de antibióticos (Melin, 2011). Além dos antibióticos não prevenirem a DNT, podem induzir reacções alérgicas e contribuir para a emergência de microrganismos resistentes (Kasper *et al.*, 1996). O desenvolvimento de uma vacina contra *S. agalactiae* conferirá protecção à mulher grávida e aos adultos e, conseqüentemente, permitirá reduzir a utilização de antibióticos durante o parto (Schrag *et al.*, 2000). A vacinação tem como alvo mulheres em idade fértil podendo ser alargada para homens e mulheres não grávidas (Melin, 2011), assim como grávidas (Lindahl *et al.*, 2005), constituindo uma alternativa promissora pois irá permitir prevenir doenças associadas a *S. agalactiae*, entre as quais DNP, DNT, aborto espontâneo, feto morto, bacteriemia materna (Melin, 2011). A vacinação da mulher grávida visa reduzir a colonização e potenciar a passagem de anticorpos para o feto através da placenta, de forma a prevenir DNP (Madzivhandila *et al.*, 2011).

Inicialmente o alvo da vacina eram os polissacáridos capsulares, contudo, como a distribuição dos serótipos varia geográfica e temporalmente, seria difícil o desenvolvimento de uma vacina que englobasse a população mundial (Melin, 2011). A eficácia de uma vacina baseada apenas nos serótipos capsulares pode ser comprometida por processos de transformação capsular (Martins *et al.*, 2007), pelo que se encontra em desenvolvimento uma vacina conjugada multivalente proteína-polissacárido baseada nos polissacáridos capsulares específicos dos serótipos, para prevenção da DNP (Farley *et al.*, 2001), em que os serótipos considerados são o Ia, Ib, II, III e V (Brimil *et al.*,

2005). Segundo Madzivhandila e colegas (2011) uma vacina trivalente envolvendo os serótipos Ia, Ib e III cobriria 80% dos serótipos invasivos em crianças até aos 3 meses de vida nos EUA e Europa. Contudo, as vacinas baseadas nos polissacáridos capsulares não protegem contra *S. agalactiae* NT (Ramaswamy *et al.*, 2006). O desenvolvimento de uma vacina com recurso a proteínas de superfície, como por exemplo, as proteínas dos pili de *S. agalactiae*, poderá tornar-se uma realidade (Maione *et al.*, 2005). Estas proteínas são codificadas por três ilhas cromossómicas (PI-1, PI-2a e PI-2b) e, no estudo efectuado por Margarit e colaboradores (2005), todos os isolados possuíam pelo menos uma dessas três ilhas. O facto de estas regiões estarem bem conservadas entre estirpes, constitui em factor adjuvante à sua utilização no desenvolvimento de uma vacina para prevenção de infecções por *S. agalactiae*. Uma vacina que incluía componentes das três ilhas cromossómicas conferiria protecção contra 94% das estirpes de *S. agalactiae* na Itália e EUA (Margarit *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de vacinas contra *S. agalactiae* permanece a medida mais promissora para prevenção da DNP (Van Dyke *et al.*, 2009). Contudo, a imunização da grávida pode falhar na prevenção de aproximadamente 40% dos casos de DNT em recém-nascidos com idade gestacional inferior a 34 semanas (Lin *et al.*, 2003).

4. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

O aumento do uso de antibióticos como medida profiláctica da DNP conduziu a um aumento da resistência de isolados de *S. agalactiae* aos antibióticos (CDC, 2010; Schrag *et al.*, 2000).

A resistência aos antimicrobianos pode resultar de diferentes tipos de mecanismos, nomeadamente por alterações genéticas, mutações espontâneas ou transferência horizontal de genes e devido a alterações bioquímicas. Estas podem ocorrer por diversos motivos: (i) modificação ou inactivação dos antibióticos, (ii) modificação do alvo de acção dos antimicrobianos, (iii) bombas de efluxo ou permeabilidade da membrana, (vi) evitar a inactivação do antibiótico. Relativamente às alterações genéticas, as mutações pontuais ocorrem menos frequentemente que a transferência de DNA extracromossomal (Giedraitienė *et al.*, 2011). Por outro lado, as

bombas de efluxo constituem um dos principais mecanismos de multirresistência a antimicrobianos (Giedraitienlè *et al.*, 2011).

S. agalactiae permanece susceptível aos β -lactâmicos, contudo a emergência de estirpes resistentes aos macrólidos e tetraciclina, tem sido divulgada (Culebras, *et al.*, 2002). A resistência à eritromicina tem sido documentada como variável, por exemplo de 7 -25% e a resistência à clindamicina também entre 3 a 15%, podendo estes fenótipos de resistência estar associadas a determinados serótipos (Motlová *et al.*, 2004), nomeadamente o serótipo V (Beitune *et al.*, 2005; Brzychczy-Wtoch *et al.*, 2010; Farley, 2001). Em Portugal, a resistência à eritromicina parece estar associada ao serótipo III, tornando-se este facto ainda mais preocupante dado o potencial invasivo a associado a este serótipo (Florindo *et al.*, 2010). Na Australásia a resistência aos macrólidos é pouco comum (Zhao *et al.*, 2008).

4.1. Mecanismos de resistência aos macrólidos e lincosamidas

Existem três classes principais de mecanismos de resistência aos macrólidos: (i) modificação do alvo do antibiótico no ribossoma, (ii) modificação do antibiótico e (iii) alterações no transporte do antibiótico através da membrana celular; sendo que apenas a modificação do alvo do antibiótico e as alterações no transporte do mesmo têm sido documentadas em *Streptococcus*, aos quais conferem resistência aos macrólidos de 14 e 15 átomos (Clancy *et al.*, 1997; Leclercq, 2002). A resistência à eritromicina pode ocorrer por dois processos: (i) acção de metilases ribossomais e (ii) presença de bombas de efluxo (Domelier *et al.*, 2008). As metilases modificam o local de ligação do antibiótico no ribossoma, através da metilação de um resíduo de adenina conservado no rRNA 23S, conferindo desta forma resistência aos macrólidos com 14 e 15 átomos, lincosamidas e estreptograminas B (Klugman *et al.*, 1998). A metilação do rRNA 23S é codificada pelos genes *erm* (*erythromycin ribosome methylase*), cuja expressão dá origem aos fenótipos MLS_B (*Macrolide, Lincosamides and Streptogramins B*): resistência constitutiva (fenótipo $cMLS_B$) ou indutiva (fenótipo $iMLS_B$) (Brzychczy-Wtoch *et al.*, 2010). A metilação ribossomal é a forma mais frequente de resistência aos macrólidos e lincosamidas (Leclercq, 2002). Estão descritas 21 classes de genes

erm, sendo a mais frequentemente detectada em estreptococos a classe *erm*(B). Nos *Streptococcus* β -hemolíticos também os genes *erm*(TR), pertencentes à classe *erm*(A), podem ser detectados. Na expressão indutiva, para haver transcrição é necessário um indutor, neste caso um macrólido, enquanto que na expressão constitutiva o mRNA é sempre transcrito, na presença ou ausência do indutor. As estirpes que apresentam fenótipo iMLS_B são resistentes ao macrólido que induz resistência, mas permanecem susceptíveis às lincosamidas e aos macrólidos cuja presença não induz resistência às lincosamidas (Leclercq, 2002).

O gene *erm*(B) está associado à expressão constitutiva da metilase enquanto que o gene *erm*(A) se encontra relacionado com a expressão induzida pela eritromicina. Contudo, mutações no gene *erm*(A) resultam numa expressão constitutiva das metilases (Heelan *et al.*, 2004), assim como é possível detectar em *S. agalactiae* resistência induzida à clindamicina associada ao gene *erm*(B) (Leclercq, 2002). Ambos os genes *erm*(A) e *erm*(B), podem ser expressos de forma constitutiva ou indutiva. Novos subfenótipos de resistência MLS_B devem-se à presença simultânea dos genes *erm* e *mef* (*macrolide efflux*) (Culebras *et al.*, 2002). Quase sempre a resistência aos macrólidos-lincosamidas-estreptograminas B em *S. agalactiae* são devidas à presença dos genes *erm*(B) e *erm*(A) subclasse *erm*(TR) (Marimón *et al.*, 2005). Os genes *erm* encontram-se codificados em plasmídeos ou transposões (Leclercq, 2002), assim como o gene *mef*(A), que podem integrar-se no cromossoma bacteriano (Cresti *et al.* 2002).

A resistência por bombas de efluxo deve-se à ligação de proteínas à parte hidrofóbica da membrana (Domelier *et al.*, 2008) que conferem resistência aos macrólidos com anéis de 14 e 15 átomos, no entanto existe susceptibilidade aos macrólidos com anéis de 16 átomos, lincosamidas e estreptograminas (Arpin *et al.*, 1999; Mouy *et al.*, 2001; Domelier *et al.*, 2008; Clarebout *et al.*, 2001). Este fenótipo (fenótipo M) depende de um mecanismo de efluxo dependente de proteínas, e é codificado pelos genes *mef* da classe *mef*(A) (Clarebout *et al.*, 2001; Clancy *et al.*, 1997; Leclercq, 2002) e afecta apenas os macrólidos de 14 e 15 átomos. As estirpes com fenótipo M não apresentam resistência aos macrólidos de 16 átomos nem à clindamicina e estreptograminas B. A proteína Mef(A) pertence à família MFS (*major facilitator superfamily*) e atinge 12 regiões na membrana (Leclercq, 2002). Embora a subclasse

mef(A) seja a mais frequentemente associada ao fenótipo M, a subclasse *mef(E)* também já foi detectada em isolados clínicos de *S. agalactiae* resistentes à eritromicina (Marimón *et al.*, 2005) Na Tabela 2, encontram-se esquematizados os genótipos e fenótipos envolvidos na resistência aos macrólidos em *Streptococcus* spp. (Leclercq, 2002)

As estirpes invasivas apresentam menos resistência aos macrólidos comparativamente às não invasivas (Domelier *et al.*, 2008).

Tabela 2: Genótipos e fenótipos de resistência aos macrólidos em *Streptococcus* spp.

| Mecanismo de resistência | Classe de genes | Fenótipo | Fenótipo de Resistência | | |
|--------------------------|-----------------|-------------------|------------------------------|-------------------------|--------------|
| | | | Macrólidos de 14 e 15 átomos | Macrólidos de 16 átomos | Clindamicina |
| Metilação ribossomal | <i>erm</i> | iMLS _B | R ou I | R, I ou S | R, I ou S |
| | | cMLS _B | R | R | R |
| Efluxo | <i>mef(A)</i> | M | R ou I | S | S |

Adaptado de Leclercq, 2002. R= Resistente; I= Resistência intermédia; S= Susceptível

A resistência às lincosamidas tem também sido descrita em estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium*, sendo este mecanismo de resistência associado aos genes *lnu(A)* [*lin(A)*] e *lnu(B)* [*lin(B)*], respectivamente. Estes genes codificam para nucleotidiltransferases que inactivam lincosamidas, sendo o modo de actuação das lincosamidas similar ao dos macrólidos (Leclercq, 2002).

Na nova Zelândia foram descritas estirpes de *S. agalactiae* susceptíveis à eritromicina mas com resistência intermédia ou resistência à clindamicina, contudo estes isolados também apresentam resistência às estreptograminas A, resultando no fenótipo LSA (*Lincosamide-Streptogramin A*) (Malbruny *et al.*, 2004). Os mecanismos bioquímicos e genéticos deste fenótipo ainda não são conhecidos, mas pensa-se que aqueles genes possam ser adquiridos por transferência horizontal. O fenótipo LSA é semelhante ao fenótipo LSA intrínseco encontrado em *Enterococcus faecalis* e ao fenótipo LSA adquirido por *S.aureus*. Em *E. faecalis*, este fenótipo está relacionado com a expressão da proteína Lsa, sendo esta semelhante às proteínas ABC, que têm

como função o transporte de moléculas em resposta à hidrólise de ATP (Malbruny *et al.*, 2004). No Canadá foi detectada apenas uma estirpe de *S. agalactiae* com resistência à clindamicina e susceptibilidade à eritromicina, que tinha presente o gene *lin(B)* que codifica para nucleotidiltransferases que inactivam lincosamidas (de Azavedo *et al.*, 2001). Nos EUA também foi detectada uma estirpe portadora do gene *lin(B)*, com fenótipo L (*Lincosamide*). Este gene já tinha sido anteriormente identificado em *E. faecium* (Gygax *et al.*, 2006). Em Portugal, no estudo efectuado por Rodrigues (2009) também foi detectado um isolado proveniente de colonização da mulher grávida, resistente à clindamicina e susceptível à eritromicina.

4.2. Mecanismos de resistência à tetraciclina

Desde a década de 50 (século XX), a resistência à tetraciclina no género *Streptococcus* é bastante elevada. Contudo, são poucos os casos em que esta resistência se encontra associada a plasmídeos (Burdett, 1980).

As tetraciclinas apresentam na sua constituição 4 anéis benzénicos, e têm como alvo o ribossoma, onde travam a síntese proteica através do impedimento da ligação dos aminoacil-tRNA ao ribossoma, exercendo efeito bacteriostático (de Sousa e Peixe, 2010). Estão caracterizados 17 determinantes genéticos que conferem resistência à tetraciclina, muitos dos quais, codificam para bombas de efluxo ou para proteínas que protegem os ribossomas da acção da tetraciclina. Nas bactérias de coloração Gram positiva, o determinante mais prevalente é o *tet(M)*, embora o *tet(O)*, *tet(K)* e *tet(L)* também possam surgir, contudo menos frequentemente (Culebras *et al.*, 2002). O gene *tet(M)* pode ser adquirido por transferência horizontal mediada por transposões conjugativos. A razão para a elevada prevalência de isolados de *S. agalactiae* resistentes à tetraciclina é desconhecida pois este antibiótico não é utilizado profilacticamente nem como tratamento de grávidas e/ou crianças (de Azavedo *et al.*, 2001).

A resistência à tetraciclina e eritromicina deve-se, por vezes, à presença dos respectivos determinantes genéticos de resistência no mesmo elemento genético móvel, pelo que existe uma associação frequente entre os genes *erm(B)* e *tet(M)*, quer em bactérias de coloração Gram positiva quer Gram negativa (Culebras *et al.*, 2002).

Na Tabela 3, encontra-se a distribuição da resistência à eritromicina, clindamicina e tetraciclina em algumas áreas geográficas.

Tabela 3: Resistência de *Streptococcus agalactiae* à eritromicina, clindamicina e tetraciclina

| Área Geográfica | Resistência Eritromicina (%) | Resistência Clindamicina (%) | Resistência Tetraciclina (%) |
|---|------------------------------|---|------------------------------|
| Coreia do Sul ¹ | 30 | 35 | 96 |
| Taiwan ² | 58.3 | 57.9 | SR |
| República Checa ³ | 3.8 | 3.2 | 83.9 |
| França ⁶ | 13.8 | SR | 95.5 |
| França ⁷ | 17 | SR | SR |
| Itália ⁸ | 16.5 | SR | 68.1 |
| Madrid ¹⁰ | 17.4 | 12.1 | SR |
| Barcelona ¹⁵ | 14.2 | 14.2 | 89.2 |
| Líbano ¹¹ | 15.8 | 11.8 | 86.8 |
| Grécia ¹⁴ | 10.5 | 12 | SR |
| Portugal ¹² | 10.8 | 10.5 | 82.4 |
| Portugal ⁵ | 22.9 | 22.9 | SR |
| Lisboa ⁹ | 19 | 53% dos isolados resistentes à eritromicina | SR |
| Santarém ⁴ | 8.3** | 8.3 | 80 |
| Trás-os-Montes e Aldo Douro ¹³ | 15 | 9.6 | SR |

¹ Uh *et al.*, 2005; ² Wang *et al.*, 2010; ³ Motlová *et al.*, 2004; ⁴ Rodrigues, 2009; ⁵ Araújo, 2010; ⁶ Poyart *et al.*, 2008; ⁷ Domelier *et al.*, 2008; ⁸ Gherardi *et al.*, 2007; ⁹ Florindo *et al.*, 2010; ¹⁰ Betriu *et al.*, 2003; ¹¹ Hannoun *et al.* 2009; ¹² Guimarães, 2008; ¹³ Pinheiro, 2009; ¹⁴ Tsolia *et al.* 2003; ¹⁵ Martins *et al.*, 2011; SR-Sem Referência; **Neste estudo 8.3% dos isolados apresentaram resistência à eritromicina e 1.7% apresentaram resistência intermédia à mesma.

Na Tanzânia (Outubro de 2008-Março de 2009), a susceptibilidade à eritromicina e clindamicina oscilou entre 80 e 90% (Joachim *et al.*, 2009) enquanto que nos EUA (2004) a resistência à eritromicina e/ou clindamicina apresentou valores elevados (29%) (Dela Cruz *et al.*, 2007). Em França, a resistência à eritromicina oscilou entre 11 e 50% (Mouy *et al.*, 2001) enquanto que no Japão (2006-2007) a percentagem de resistência aos macrólidos foi de 12.2% (Murayama *et al.*, 2009). Em Espanha

(1992-2000), 87% dos isolados resistentes à eritromicina também apresentaram resistência à tetraciclina enquanto que entre os isolados sensíveis à eritromicina a resistência à tetraciclina foi de 72% (Culebras *et al.*, 2002). Num estudo efectuado com isolados obtidos de crianças angolanas dos 91 dias aos 12 anos de vida, com diagnóstico de meningite, apenas foi detectado um isolado com resistência intermédia à eritromicina (Florindo *et al.*, 2011). Em Taiwan (Wang *et al.*, 2010) e Portugal (Rodrigues, 2009) foram detectados isolados com resistência à clindamicina e sensibilidade à eritromicina. No Brasil (2006-2008) a resistência à eritromicina e à clindamicina foi de 4.7%, tendo o fenótipo cMLS_B sido detectado em todos os isolados (Palmeiro *et al.*, 2010). Em Espanha observou-se uma percentagem de isolados colonizantes resistentes à eritromicina de 11% (Marimón *et al.*, 2005).

O gene *erm(B)* tem sido o gene mais detectado entre os isolados resistentes à eritromicina, tal como descrito em estudos efectuados na Coreia do Sul (Uh *et al.*, 2005), no Japão (Murayama *et al.*, 2009), em Itália (Gherardi *et al.*, 2007), no Brasil (Palmeiro *et al.*, 2010), em Espanha (Marimón *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2011) e em Portugal (Florindo *et al.*, 2010; Pinheiro, 2009). No Canadá, a resistência à eritromicina está sobretudo associada à presença do gene *erm(A)* [*erm(TR)*] (de Azavedo *et al.*, 2001) enquanto que em França a resistência foi originada pelo gene *mef(A)* (Poyart *et al.*, 2008). Em Madrid, 44,5% dos isolados apresentam mais de um gene de resistência aos macrólidos (Culebras *et al.*, 2002).

O fenótipo cMLS_B foi o fenótipo mais detectado em estudos efectuados em Portugal (Araújo, 2010; Florindo *et al.*, 2010; Pinheiro, 2009), na República Checa (Motlová *et al.*, 2004), em Itália (Gherardi *et al.*, 2007), em Taiwan (Wang *et al.*, 2010), Espanha (Martins *et al.*, 2011).

Em Portugal, o serótipo III tem sido identificado em grande parte das estirpes resistentes à eritromicina (Florindo *et al.*, 2010; Guimarães, 2008), sendo também detectados os serótipos II e V (Guimarães, 2008). Em Santarém (Rodrigues, 2009), o serótipo V foi o mais frequentemente detectado entre os isolados resistentes à eritromicina, tal como se verificou também na Coreia do Sul (Uh *et al.*, 2005), Barcelona (Martins *et al.*, 2011).

4.3. Mecanismos de resistência às quinolonas

As quinolonas apresentam uma boa eficácia no tratamento de infecções causadas por microrganismos do género *Streptococcus* (Kawamura *et al.*, 2003). No Japão (Fevereiro a Dezembro de 2002) foram detectados isolados altamente resistentes às quinolonas tendo sido observada a existência de mutações pontuais nos genes *gyrA* e *parC* (Kawamura *et al.*, 2003). Num outro estudo efectuado em Espanha (2003-2004), a percentagem de resistência às quinolonas foi de 1.2%, tendo os autores verificado que as estirpes apresentavam também mutações no genes *gyrA* e *parC* (Miró *et al.*, 2006).

4.4. Mecanismos de resistência à penicilina

A penicilina consituti o antibiótico de eleição não só para antibioticoprofilaxia intraparto mas também para tratamento de infecções em adultos por *S. agalactiae* (Kimura *et al.*, 2008).

Embora não existam critérios que definam um isolado como resistente a este antibiótico, já foram descritos isolados com susceptibilidade reduzida à penicilina. Num estudo efectuado no Japão, entre 1995 e 1998 e em 2005, foram caracterizados 14 isolados com susceptibilidade reduzida a este antibiótico, 8 apresentaram serótipo capsular III. Alguns dos isolados apresentaram mutações nas proteínas de ligação às penicilinas (PBP) (do inglês *Protein Binding Penicilins*) - PBP 1A, PBP 1B, PBP 2A, PBP 2B e, todos os 14 isolados apresentaram mutações na PBP 2X. Os autores assumem que as substituições de aminoácidos verificadas na PBP 2X (Q557E e/ou V405A) são a principal causa para a susceptibilidade reduzida de *S. agalactiae* à Penicilina G (Kimura *et al.*, 2008). No Canadá também foi detectado um isolado responsável por sépsis neonatal com susceptibilidade reduzida á penicilina (de Azavedo *et al.*, 2001).

Mais tardiamente (Longtin *et al.*, 2011) foram descritas novas mutações em isolados com susceptibilidade reduzida à penicilina, na PBP 1A (T546P), PBP 2A [(E636G), (S644F), (S676F)] e PBP 2X (G371D). No entanto, a mutação mais frequentemente reportada é Q557E em PBP 2X.

5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

5.1. Rastreo de colonização da mulher grávida

No rastreo de colonização da mulher grávida deve ser efectuada colheita de um exsudado vaginal (introito vaginal) e de um exsudado rectal entre as 35 e as 37 semanas de gestação (CDC, 2010). A sensibilidade da cultura do exsudado vaginal é apenas de 50 a 60% (CDC, 2010), e a colonização rectal parece ser 18 a 24 vezes superior à colonização vaginal (El Aila *et al.*, 2010), razão pela é aconselhada a colheita vaginal e rectal (CDC, 2010). A colheita simultânea dos exsudados vaginal e rectal aumenta em 18.5-51% a probabilidade de detecção de *S. agalactiae* comparativamente à colheita isolada do exsudado vaginal (Madzivhandila *et al.*, 2011).

A colonização da mulher grávida com *S. agalactiae* pode ser transitória, intermitente ou persistente (Hoogkamp-Korstanje *et al.*, 1982; Melin, 2011; Rallu *et al.*, 2006), apenas com variação da densidade de colonização (Rallu *et al.*, 2006). O valor preditivo negativo da cultura para pesquisa de *S. agalactiae* nas 5 semanas que antecedem o parto é de 95 a 98%, no entanto, este valor preditivo decresce, se o rastreo for efectuado mais de 5 semanas antes do parto (Yancey *et al.*, 1996). O valor preditivo negativo da cultura é 97% e o valor preditivo positivo é 89% relativamente à probabilidade de colonização da mulher grávida no momento do parto (Almeida *et al.*, 2004).

A colheita durante o parto pode ficar comprometida, nomeadamente após ruptura das membranas devido à saída do líquido amniótico (Madzivhandila *et al.*, 2011).

5.2. Colheita e processamento

A colheita na parte distal da vagina revela-se mais eficaz do que no cérvix (Melin, 2011; Beitune *et al.*, 2005) contudo o exsudado rectal é mais eficaz no isolamento de *S. agalactiae* que o vaginal e quando associados permitem obter resultados mais fidedignos. Sendo o trato gastrointestinal o principal reservatório de *S. agalactiae*, a combinação dos dois tipos de colheita aumenta a probabilidade de

detecção deste microrganismo (Daniels *et al.*, 2011; Melin, 2011; El Aila *et al.*, 2010). A colheita pode ser efectuada por profissionais de saúde ou pela própria grávida e o transporte deve ser efectuado num meio não nutritivo, como por exemplo o meio de Stuart ou de Amies (CDC, 2010). *S. agalactiae* mantém-se viável no meio de transporte por um período de 4 dias desde que a amostra seja refrigerada ou mantida à temperatura ambiente, sendo a percentagem de recuperação de *S. agalactiae* entre 92 e 100%. Contudo, a sua recuperação decresce significativamente, quando exposto a temperaturas na ordem dos 30°C, podendo originar resultados falsamente negativos (Stoner *et al.*, 2004; CDC, 2010). A sensibilidade da cultura aumenta quando a amostra é guardada refrigerada (4°C) e processada num período de 24 horas após a colheita (CDC, 2010).

No laboratório, as amostras devem ser incubadas em meio líquido de enriquecimento como o *Todd-Hewitt broth* suplementado com gentamicina e ácido nalidíxico (*Trans Vag broth*) ou com colistina e ácido nalidíxico (*Lim broth*); o enriquecimento destes meios com 5% de sangue de carneiro desfibrinado aumenta a recuperação de *S. agalactiae*. A incubação é efectuada durante 18 a 24 horas a 35-37°C em aerobiose ou atmosfera com 5% de CO₂ (CDC, 2010). A utilização de um meio líquido não selectivo apresenta uma percentagem de falsos negativos na ordem dos 58,9% (Baker *et al.*, 1973). Por outro lado, se a cultura fosse efectuada primeiramente em meio sólido, a percentagem de grávidas com resultados falsamente negativos seria de 50% (CDC, 2010).

Após o enriquecimento em meio líquido deve ser efectuada subcultura para meio sólido com 5% de sangue de carneiro suplementado com colistina e ácido nalidíxico, ou para meio sólido cromogénio, sendo a incubação efectuada nas mesmas condições (CDC, 2010). Posteriormente, procede-se à identificação de colónias sugestivas de *S. agalactiae*, ou seja, aquelas que no meio sólido suplementado com 5% de sangue de carneiro surgem com pequena região de β -hemólise, testes de catalase negativa e/ou hipurato positivo e se apresentam como cocos de coloração Gram positiva. Após incubação, sempre que não existir crescimento de colónias suspeitas de *S. agalactiae*, as placas devem ser reincubadas durante a noite para posterior reavaliação (CDC, 2010).

Existem meios líquidos cromogénios como alternativa, que permitem detectar *S. agalactiae* β -hemolíticos através da modificação da cor do meio (como por exemplo, o

meio de *Granada Biphasic Broth*). Quando não se observa alteração na cor, deve ser efectuada subcultura para meio sólido com 5% de sangue de carneiro, ou serem pesquisados antigénios de *S. agalactiae* ou utilizados métodos moleculares que permitam identificar estirpes não-hemolíticas (CDC, 2010). Segundo El Aila e colegas (2009), a utilização do meio de *Lim broth* com subcultura para o meio sólido de Granada constitui um método de detecção de *S. agalactiae* em exsudados vaginais e rectais de mulheres grávidas, específico e sensível.

Para a detecção de *S. agalactiae* em amostras de exsudados vaginais e rectais, o exame cultural, com recurso a enriquecimento prévio é considerado o método *gold standard*. A confirmação dos resultados é feita com base em testes específicos de aglutinação ou recorrendo a métodos moleculares (Beitune *et al.*, 2005). A cultura apresenta como desvantagem o facto de exigir microrganismos viáveis assim como a necessidade de maior tempo para a obtenção de um resultado (Beitune *et al.*, 2005), pelo que não pode ser aplicada no momento do parto. Desta forma, a sua realização entre as 35 e as 37 semanas de gestação exclui as situações de parto prematuro (<35 semanas de gestação), facto que não deve ser menosprezado visto que 7-11% das grávidas têm o parto antes do rastreio e que a prematuridade é um dos factores de risco para o desenvolvimento de infecção neonatal (El Helali *et al.*, 2009).

Diversos factores podem condicionar a detecção de *S. agalactiae* em mulheres grávidas portadoras, entre os quais, a toma de antibióticos orais e/ou utilização de produtos de higiene antes da colheita, ou outros factores como o tipo de colheita, condições de transporte da amostra e processamento da mesma (Melin, 2011).

Podem ocorrer situações em que DNP acontece em recém-nascidos no termo da gestação cuja mãe apresentou rastreio negativo para *S. agalactiae*, assim como em prematuros cujas mães não foram rastreadas. Uma grande percentagem dos casos de DNP (60 a 80%) ocorrem em recém-nascidos cujas mães apresentaram rastreios negativos para *S. agalactiae* (Melin, 2011), o que limita a cultura como método de detecção (Beitune *et al.*, 2005).

O facto de a colonização durante a gravidez ser intermitente enfraquece a correlação entre o rastreio e a colonização no momento do parto o que pode conduzir a uma aplicação incorrecta das medidas preventivas (El Helali *et al.*, 2009).

5.3. Identificação de *Streptococcus agalactiae*

Em meio sólido suplementado com 5% de sangue de carneiro, *S. agalactiae* apresenta colónias pequenas com um halo ligeiro de β -hemólise (CDC, 2010), sendo necessário recorrer a outros testes para a sua correcta identificação.

5.3.1. Teste de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen)

O teste de CAMP (Christie, Atkins, Munch, Peterson) pode ser usado como método de identificação presuntiva (CDC, 2010). *S. agalactiae* possui o gene *cfb*, responsável pela produção de uma citolisina ou factor CAMP (Glaser *et al.*, 2002), que potencia a actividade da β -hemolisina de *S.aureus* em meio sólido suplementado com sangue de carneiro. *S. agalactiae* é presuntivamente identificado pela presença de uma região de β -hemólise (em forma de seta), resultante da convergência da acção da β -hemolisina de *S.aureus* e do factor CAMP de *S. agalactiae* (Wilkinson, 1977).

Este teste é de fácil execução, raramente fornece resultados falsamente positivos e permite obter resultados em 18 horas (Wilkinson, 1977).

5.3.2. Pesquisa de antígenos de *Streptococcus agalactiae*

5.3.2.1. Serogrupagem de *Streptococcus agalactiae*

A pesquisa antigénica de *Streptococcus* β -hemolíticos dos grupos A, B, C, D, F e G de Lancefield, consiste num teste rápido de aglutinação que permite obter resultados em 10 minutos. Constitui um excelente teste de confirmação após a cultura, com uma sensibilidade e especificidade próximas de 100%. Contudo, quando o teste é efectuado antes da cultura em meio sólido suplementado com 5% de sangue de carneiro,

a sua sensibilidade decresce para 65%. Apresenta variações quando não existe enriquecimento prévio à cultura e depende do tempo de incubação no meio sólido, quantidade de inóculo presente na amostra assim como do tempo que decorre entre a extracção e a execução do teste. Um grupo de investigadores em Espanha concluiu que este teste sendo efectuado após enriquecimento no meio líquido, apresenta uma elevada sensibilidade (98%) tendo ainda a vantagem de reduzir o tempo de resposta em 24 horas; contudo, estes resultados não foram comprovados por outros investigadores, pelo que a cultura constitui o melhor método existente actualmente para o rastreio pré-natal mas não o mais adequado para o rápido diagnóstico exigido no momento do parto (Beitune *et al.*, 2005).

5.3.2.2. Serotipagem de *Streptococcus agalactiae*

A serotipagem baseada no Ag polissacárido capsular é relevante para o conhecimento da distribuição dos serótipos em todo o mundo, com a finalidade de se poder desenvolver uma vacina multivalente conjugada polissacárido capsular-proteína (Ramaswamy *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2008; Slotved *et al.*, 2007).

Neste método testa-se a reactividade dos anti-soros comerciais com o polissacárido capsular da estirpe em estudo (Kong *et al.*, 2008). Os métodos de tipagem convencionais exigem grande quantidade de antisoros específicos e os resultados são muitas vezes subjectivos (Kong *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2006). Os isolados que não apresentam reactividade com nenhum dos antisoros vulgarmente utilizados são considerados não tipáveis (NT) (Ramaswamy *et al.*, 2006), tal facto pode dever-se à ausência de expressão do polissacárido capsular ou à inexistência de reacção com os antisoros disponíveis (Kong *et al.*, 2008; Slotved *et al.* 2007), assim como pode resultar de um processo de recombinação, originando a disrupção de genes no *locus cps*. A base genética molecular para o fenótipo NT não é conhecida (Ramaswamy *et al.*, 2006). As limitações deste tipo de teste estão associadas à qualidade dos antisoros utilizados, à experiência do operador assim como à existência de isolados não serotipáveis. Contudo, é um método útil para avaliação da distribuição dos serótipos (Kong *et al.*, 2008).

Apesar de existirem métodos de tipagem molecular como o Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) e Multilocus sequencing type (MLST), a serotipagem permanece um método essencial em estudos epidemiológicos (Martins *et al.*, 2007).

5.3.3. Detecção de ácidos nucleicos de *Streptococcus agalactiae*

A identificação dos serótipos por métodos moleculares revela um elevado poder discriminatório assim como reprodutibilidade (Kong *et al.*, 2002). Os testes genotípicos, na sua maioria, apresentam uma tipeabilidade de 100%, que pode ser inferior na serotipagem convencional (van Belkum *et al.*, 2007).

Os testes de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para detecção de *S. agalactiae* apresentam grandes oscilações de sensibilidade (62,5-98,5%) e especificidade (64.5-99.6%) quando comparados ao método *gold standard* (enriquecimento seguido de subcultura); contudo, o enriquecimento prévio das amostras aumenta a sensibilidade dos testes de PCR para 92,5-100%, o que constitui uma desvantagem para a detecção de *S. agalactiae*, pois acresce o tempo de resposta; contudo, a sua exactidão é mais relevante (CDC, 2010).

5.3.3.1. Genotipagem capsular de *Streptococcus agalactiae*

O polissacárido capsular é frequentemente utilizado para tipagem de estirpes (Poyart *et al.*, 2007). Os testes fenotípicos de serotipagem apresentam algumas limitações comparativamente aos testes genotípicos, entre as quais baixa robustez, a existência de um número considerável de isolados NT (Manning *et al.*, 2005; Poyart *et al.*, 2007), a possibilidade de erros inerentes à serotipagem (Poyart *et al.*, 2007), assim como os custos (Manning *et al.*, 2005).

Os testes genotípicos complementam os métodos fenotípicos apresentando ainda a vantagem de ultrapassarem as limitações associadas à expressão capsular assim como a possibilidade de identificar novas variantes antigénicas e também a limitação dos isolados NT. Uns testes são mais reprodutíveis, específicos e fáceis de executar do que

outros. Usualmente os métodos genotípicos envolvem a execução de métodos baseados em, nomeadamente, PCR e hibridação DNA/DNA, PCR e restrição enzimática ou PCR e sequenciação (Poyart *et al.*, 2007). A maioria dos métodos de tipagem molecular são mais discriminatórios e apresentam maior tipabilidade comparativamente aos métodos de tipagem convencionais (van Belkum *et al.*, 2007).

A região genética *cps* (*capsular polysaccharide synthesis*) engloba os genes *cpsA-cpsO*, *cpsR* e *cpsY*, alguns dos quais permanecem conservados entre serótipos. Contudo, nem todos os serótipos apresentam todos os genes *cps*. Os genes *cpsG-cpsK* apresentam grande variabilidade entre os serótipos Ia, Ib, II-VII enquanto que os genes *cpsE-CpsK* são variáveis no serótipo VIII (Manning *et al.*, 2005). As regiões *cpsH-cpsM* são específicas para cada serótipo (Slotved *et al.*, 2007).

A genotipagem capsular por PCR tem-se revelado eficaz na tipagem de isolados invasivos de *S. agalactiae* que se revelem não tipáveis pela metodologia convencional (Madzivhandila *et al.*, 2011). Geralmente, os resultados da serotipagem convencional e molecular são concordantes para os isolados serotipáveis (Slotved *et al.*, 2007).

A técnica de hibridização reversa em linha (RLB) é uma técnica promissora que permite simultaneamente a detecção, identificação e tipagem de microrganismos, incluindo *S. agalactiae* (Kong *et al.*, 2005).

5.3.3.2. Electroforese de campo pulsado (PFGE, de *Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

A electroforese de campo pulsado permite analisar os perfis de restrição de DNA cromossomal (Tenover *et al.*, 1995), possibilitando desta forma, inferir sobre a clonalidade e diversidade genética das estirpes estudadas. É utilizada para a tipagem e subtipagem de isolados bacterianos (Matushek *et al.*, 1996; Rolland *et al.*, 1999), estudos de prevalência de serótipos e investigação de surtos de infecção (Benson & Ferrieri, 2001). Esta metodologia implica a incorporação das células em discos de agarose, a sua lise *in situ*, assim como a digestão do DNA cromossomal com endonucleases de corte pouco frequente, originando menos de 30 fragmentos com

tamanhos compreendidos entre 20 e 600 Kpb (van Belkum *et al.*, 2007). Os fragmentos de DNA são separados através da aplicação de uma corrente eléctrica, que mudará de direcção consoante o padrão definido. Desta forma é possível obter bandas discretas correspondentes aos fragmentos de restrição do DNA cromossomal. A proximidade genética dos isolados é obtida por comparação dos perfis de restrição obtidos (Tenover *et al.*, 1995, van Belkum *et al.*, 2007).

Na Tabela 4 encontram-se os critérios de interpretação dos perfis da técnica de PFGE propostos por van Belkum e colegas (2007) para actualização dos critérios de interpretação propostos por Tenover e colaboradores (1995).

Tabela 4: Critérios de interpretação dos perfis gerados por electroforese de campo pulsado, considerando o número de fragmentos de DNA diferentes

| N.º de fragmentos diferentes entre dois isolados | Interpretação |
|---|--|
| 0 | Isolados indistinguíveis |
| 1-4 | Isolados do mesmo tipo com subtipos diferentes |
| 5-8 | Provavelmente isolados diferentes* |
| ≥9 | Isolados diferentes** |

* atribuído a provavelmente dois eventos mutacionais; ** atribuído a pelo menos três eventos mutacionais. van Belkum *et al.*, 2007

A técnica de PFGE constitui o método com maior poder discriminatório comparativamente aos métodos baseados em PCR (Benson & Ferrieri, 2001). Esta técnica tem sido referenciada como método padrão para estudos epidemiológicos (Chung *et al.*, 2000), em particular em investigação de surtos de infecção (Tenover *et al.*, 1995), sendo a sua principal limitação, o tempo requerido para a sua execução (Matushek *et al.*, 1996), razão pela qual Benson e Ferrieri (2001) propuseram modificações à técnica de forma a permitir processar um maior número de isolados em menor espaço de tempo (Benson & Ferrieri, 2001).

5.3.4. Características do teste “ideal” para diagnóstico laboratorial de *S. agalactiae*

Um número relevante de casos DNP ocorrem em crianças cujas mães apresentaram colonização ligeira ou resultado negativo no rastreio das 35-37 semanas de gestação, pelo que é necessário um teste rápido e sensível de aplicação intraparto, como os testes que têm por base reacções de PCR (El Helali *et al.*, 2009).

De acordo com um estudo de comparação de quatro técnicas, efectuado no Canadá, os autores consideram que o método de detecção de Ag de *S. agalactiae* é mais sensível que a cultura e mais fácil de executar, além de não ser um teste oneroso e ter aplicabilidade em qualquer centro obstétrico, razão que leva os autores a considerarem que o método de detecção de Ag deve substituir a cultura às 35-37 semanas de gestação (Rallu *et al.*, 2006).

A comercialização de um teste rápido para detecção de *S. agalactiae* permitirá rastrear grávidas que não tenham recebido cuidados de saúde durante a gravidez ou que não tenham efectuado qualquer cultura durante o tempo de gestação (Melin, 2011). Considerando a necessidade de enriquecimento prévio da amostra a rastrear outras limitações se impõe aos ensaios de PCR em tempo real, como por exemplo a necessidade de profissionais treinados e equipamento apropriado (El Helali *et al.*, 2009). A forma de ultrapassar estas limitações consiste no desenvolvimento de um teste de PCR fácil de executar e que permita obter resultados 24 horas por dia, 7 dias por semana (El Helali *et al.*, 2009). Em 2006, FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o método Xpert™ GBS (Cepheid), que consiste num teste de PCR em tempo real e que permite obter resultados em 30-75 minutos, sendo pouco laborioso e de simples execução (Melin, 2011). Este teste permite ainda detectar se a grávida está colonizada por *S. agalactiae* após início do trabalho de parto, apresentando uma sensibilidade de 98.5%, uma especificidade de 99.6% comparativamente ao *gold standard* e tem como alvo de amplificação a região adjacente à extremidade 3' do gene *cfb* (El Helali *et al.*, 2009). O método de PCR em tempo real (Xpert) permite uma selecção exacta das grávidas para quimioprofilaxia intraparto (El Helali *et al.*, 2009). Contudo existem factores a considerar, tais como a necessidade de obtenção de resultados pelo menos 4 horas antes do parto, para aplicação de quimioprofilaxia, os

custos associados ao equipamento de PCR em tempo real assim como o número necessário de pessoal treinado e disponível para situações de emergência. Poucos centros obstétricos podem proporcionar estes recursos e o isolamento em cultura continuará a ser necessário para a realização dos testes de susceptibilidade aos antibióticos (TSA) (Rallu et al., 2006). De acordo com Overman e colegas (2002), a técnica de Accuprobe (detecção de rRNA), após enriquecimento em meio *Lim broth*, é tão sensível como o *gold standard* para detecção de *S. agalactiae* em amostras anovaginais, apresentando ainda a vantagem de uma redução de 24 horas no tempo de resposta (Overman et al., 2002).

O teste ideal para a detecção de colonização materna com *S. agalactiae* deverá ser sensível, rápido (de-Paris et al., 2011), rigoroso e orientado para a quimioprofilaxia (Honest et al. 2006), devendo apresentar uma sensibilidade mínima de 86% assim como uma baixa taxa de falsos negativos. Deverá ser económico e incluído nos exames solicitados no período do parto. Um curto tempo de resposta (Beitune et al., 2005), não excedendo 1 hora, permitirá uma quimioprofilaxia atempada e orientada. Durante as duas últimas décadas, foram desenvolvidos testes rápidos baseados em antígenos e hibridização, contudo, apesar da elevada especificidade apresentam uma baixa sensibilidade, podendo ocorrer falsos negativos (Melin, 2011; El Helali et al., 2009).

6. Objectivos

Caracterizar isolados de *S. agalactiae* resultantes de colonização dos tratos genitourinário e gastrointestinal da mulher grávida às 35-37 semanas de gestação, obtidos no período de 2007 a 2010 no Hospital Garcia de Orta (HGO), em Almada.

6.1. Objectivos Específicos

- ✓ Conhecer a prevalência de colonização da mulher grávida neste período;
- ✓ Conhecer a prevalência de cada serótipo capsular na população estudada;
- ✓ Identificar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos;

- ✓ Identificar os fenótipos e genótipos de resistência aos macrólidos;
- ✓ Avaliar a evolução temporal dos serótipos capsulares e da resistência aos antimicrobianos;
- ✓ Procurar associações entre o serótipo capsular, o fenótipo e o genótipo de resistência aos macrólidos;
- ✓ Analisar a clonalidade dos isolados caracterizados neste período, nomeadamente, os isolados com resistência aos macrólidos;

II-MATERIAIS E MÉTODOS

1. POPULAÇÃO DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Neste trabalho foram caracterizados 179 isolados de *S. agalactiae* provenientes de amostras de exsudados vaginais e/ou rectais de grávidas com idade gestacional compreendida entre as 35 e as 37 semanas e/ou urinas obtidas durante a gravidez. Os isolados de *S. agalactiae* foram obtidos no Hospital Garcia de Orta (HGO), Almada (Portugal), entre 2007 e 2010. A utilização do exsudado rectal no rastreio da colonização da grávida com *S. agalactiae* neste hospital teve início no decorrer do ano 2007.

Os 179 isolados foram seleccionados aleatoriamente em relação ao total de isolados (n=729) provenientes de amostras clínicas recebidas durante o período referido (2007 a 2010) no laboratório hospitalar, correspondendo a 24,6% do total.

Na tabela 5 encontra-se discriminada a distribuição anual dos isolados por produto biológico.

Tabela 5: Distribuição anual (2007-2010) dos isolados de *Streptococcus agalactiae* por produto biológico

| | Produto Biológico | Ano | | | |
|---------------------|---------------------------------|------|------|------|------|
| | | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |
| Mesma Grávida | Ex. vaginal e ex. rectal | 0 | 6 | 8 | 12 |
| | Ex. vaginal e urina | 0 | 1 | 1 | 0 |
| | Duas urinas | 0 | 3 | 0 | 0 |
| | Duas urinas e ex. vaginal | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | Ex. vaginal, ex. rectal e urina | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Grávidas diferentes | Ex. vaginal | 17 | 17 | 19 | 16 |
| | Ex. rectal | 0 | 9 | 7 | 3 |
| | Urina | 3 | 3 | 8 | 6 |

2. IDENTIFICAÇÃO DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Os isolados de *S. agalactiae* caracterizados neste estudo foram isolados e identificados no HGO sendo posteriormente congelados em meio líquido tripticase soja com glicerol a 20% (Difco) e enviados para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), onde foram conservados a -80°C no mesmo meio (suplementado com 20% de glicerol).

As amostras conservadas a -80°C foram semeadas em meio de gelose Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro (COS) (bioMérieux®, Marcy-l'Etoile, France) e incubadas 18-24 horas em aerobiose a 37°C, para isolamento e observação das características das colónias. A partir de cultura pura, procedeu-se à confirmação da identificação pelo teste CAMP, à serotipagem e, no caso de existirem isolados não tipáveis foi ainda efectuada a pesquisa do Ag específico de grupo (serogrupagem) e genotipagem capsular, como se encontra descrito a seguir.

Geralmente *S. agalactiae* manifesta-se em cultura em meio sólido com colónias pequenas esbranquiçadas rodeadas por um pequeno halo de β -hemólise (Levinson, 2004) como se pode observar na Figura 1.

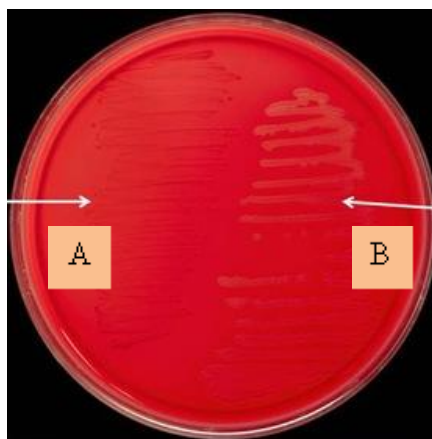


Figura 1. Inóculo de *Streptococcus agalactiae* não hemolítico (A) e beta-hemolítico (B) em meio suplementado com 5% de sangue de carneiro (<http://www.cdc.gov/groupbstrep/images/lab-HemolyticTests-lg.jpg>)

2.1. Teste de CAMP

O teste de CAMP (de “Christie Atkins Munch-Petersen”) (Costa, 2000) é considerado um teste presuntivo para a identificação de *S. agalactiae* e é efectuado na presença de uma estirpe de *Staphylococcus aureus*. Para a sua execução, numa placa de gelose Columbia suplementada com 5% de sangue de carneiro (COS) (bioMérieux®, Marcy-l’Etoile, France) semeou-se em estria vertical, em todo o diâmetro da placa, com inóculo de uma estirpe de *S. aureus*. Perpendicularmente, efectuou-se uma estria com o inóculo da estirpe em estudo, sendo a incubação realizada a 37°C durante 18 a 24 horas, em aerobiose. O teste de CAMP foi considerado positivo quando se observou uma hemólise com formato de seta na zona onde os inóculos das estirpes confluem (ver Figura 2), resultante do sinergismo entre o factor CAMP, de *S. agalactiae*, e uma β -lisina de *S. aureus*.

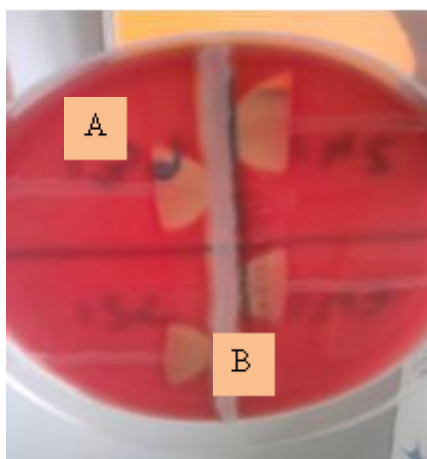


Figura 2. Teste de CAMP positivo para *Streptococcus agalactiae* (A) executado na presença de inóculo de *Staphylococcus aureus* (B) em meio suplementado com 5% de sangue de carneiro (Imagem obtida no âmbito deste trabalho)

2.2. Serotipagem de *Streptococcus agalactiae*

A classificação dos serótipos foi efectuada pela aplicação de um kit comercial (ESSUM GBS, Probiotics, Umeå, Sweden). Este kit permite identificar os serótipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII mediante a utilização de células de *Streptococcus* do grupo G inactivadas e revestidas com anticorpos de coelho específicos para os antígenos polissacáridos capsulares específicos de tipo.

Num cartão de reacção, colocou-se uma gota de cada um dos anti-soros e misturaram-se colónias do isolado de *S. agalactiae* a testar. Agitou-se durante 1 minuto, período ao fim do qual se observou a presença de aglutinação (reacção positiva) com um dos serótipos em estudo.

Cada isolado de *S. agalactiae* foi testado com os anti-soros Ia, Ib, II, III, IV e V e, sempre que se verificou ausência de reacção com um destes serótipos, testaram-se os serótipos VI, VII e VIII. Contudo, quando não se verificou aglutinação com nenhum dos serótipos testados, os isolados foram considerados não tipáveis (NT) e procedeu-se à serogrupagem para confirmação da identificação da espécie.

2.3. Serogrupagem de *Streptococcus agalactiae*

Para confirmar que os isolados NT acima referidos pertenciam à espécie *S. agalactiae* foi efectuada grupagem utilizando o kit SLIDEX® Strepto Plus B (BioMérieux® SA, Marcy-l'Étoile, France). Este teste utiliza reagentes compostos por partículas de látex sensibilizadas com anticorpos contra o Ag específico do grupo B de *S. agalactiae*.

O Ag específico de grupo do isolado NT em estudo, foi extraído através da adição de 3 a 5 colónias a 200 µl da enzima de extracção (fornecida pelo kit). Após agitação seguiu-se uma incubação de 10 minutos a 37°C, finda a qual se misturou uma gota do anti-soro com uma gota do extrato da estirpe em estudo. Após uma agitação constante durante 2 minutos o resultado foi lido tendo-se considerado positivo sempre que existiu aglutinação nítida, como se pode observar na Figura 3.



Figura 3. Teste de aglutinação para identificação do antígeno do grupo B de Lancefield. Reacção positiva para *Streptococcus agalactiae* (A) e reacção negativa (B) (<http://www.cdc.gov/groupbstrep/images/lab-agglutinationTests-1g.jpg>)

2.4. Genotipagem capsular de *Streptococcus agalactiae*

A genotipagem capsular por PCR foi efectuada nos isolados classificados como NT pela serotipagem convencional e em alguns isolados com serótipo conhecido como forma de confirmação do serótipo.

Esta metodologia baseia-se na amplificação por PCR de sequências alvo internas aos genes *cps* D-E-F, tendo sido utilizado para a sua detecção os seguintes *primers*: D1 (*forward*) 5' GTTGTTGATGCCGCAATAATC 3' e F1 (*reverse*) 5' CTACAGCGGCACCAGATGATA 3'. O tamanho do produto de PCR esperado está compreendido entre 1901 e 1911 pb (Florindo *et al.*, 2010).

Como controlo positivo foi utilizada uma estirpe previamente identificada no estudo como *S. agalactiae*, de serótipo capsular III e, como controlo negativo da reacção de PCR foi utilizada água milli-Q (Merck Millipore). As condições da reacção de PCR (para um volume final de 25 μ L) encontram-se esquematizadas na tabela 6.

Tabela 6 – Condições de PCR para a detecção dos genes *cpsD-E-F* em *Streptococcus agalactiae*

| Reagente | Cf | V (µL) |
|-------------------------|--------|--------|
| 10X Tampão de reacção | 1X | 2.5 |
| 10 mM dNTPs | 0.2 mM | 0.5 |
| Primer D1 (25 pmol/mL) | 1pmol | 1 |
| Primer F1 (25 pmol/mL) | 1pmol | 1 |
| 4 U/ µL Bio-X-Act | 0.06 U | 0.375 |
| 50 mM MgCl ₂ | 2.8 mM | 1.4 |
| DNA | - | 1 col. |
| Água destilada estéril | - | 17.725 |

Cf= Concentração final; V= Volume pipetado; 1col.=1 colónia isolada em meio sólido suplementado com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux ®, Marcy-l'Etoile, France); Bio-X-Act (Bioline) – e dNTPs (Fermentas)

A amplificação foi efectuada no termociclador (EppendorfMastercycler ® personal), com o seguinte perfil de amplificação: 95°C (3min.), 51°C (1min.), 35 ciclos [72°C (2min. 25seg.), 95°C (30seg.), 51°C (30seg.)], 72°C (10 min.).

A visualização do produto de PCR foi efectuada por separação em electroforese em gel de agarose a 1.5% (Agarose Molecular Grade, Bioline) com uma concentração de brometo de etídeo 0.5 µg/ mL. O marcador de peso molecular utilizado foi *HyperLadder II* (Bioline). O gel foi submetido a uma corrente eléctrica de 100 V durante 60 minutos, sendo a imagem observada com o sistema GelDoc (BioRad).

O produto de PCR foi purificado segundo as recomendações do kit (JETQUICK PCR Purification Spin Kit, Genomed, Löhne, Germany). Seguidamente foi efectuada uma reacção de PCR para cada um dos genes do *locus cps* D-E-F cujos produtos de PCR foram enviados ao laboratório de genética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), para sequenciação no equipamento ABI3700 *Cappillary Sequencer* (Applied BioSystems, Foster City, California, USA).

Os *primers* utilizados foram, respectivamente, D1 (*forward*) 5' GTTGTTGATGCCGCAATAATC 3', E1 (*forward*) 5' TCTTACGCTAAGTTTTACG 3' e F1 (*reverse*) 5' CTACAGCGGCACCAGATGATA 3'.

Foi utilizado o reagente BigDye (V 1.1) Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster city, EUA) e a reacção foi efectuada de acordo com o seguinte programa: 95°C (30 seg.), 25 ciclos [95°C (10 seg.), 50°C (5seg.), 60°C (4 min.)]. As sequências foram posteriormente editadas e alinhadas para construção de árvores filogenéticas e, desta forma, obter o tipo capsular da estirpe em estudo. Para este processo foram utilizados os programas *Chromas Lite* (versão 2.01), *EditSec* (Versão 9.1.0) e *MegAlign* (Versão 9.1.0).

2.5. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos – Método de difusão em disco

Em todas as estirpes em estudo foi testada a susceptibilidade aos antimicrobianos por difusão em disco pelo método Kirby-Bauer conforme as normas internacionais do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2005), utilizando-se os seguintes discos de antimicrobianos (e respectiva concentração): penicilina (10U), tetraciclina (30µg), vancomicina (30µg), ofloxacina (5µg), eritromicina (15µg) e clindamicina (2µg) (bioMérieux ®, Marcy-l’Etoile, France).

Para realizar o antibiograma (de acordo com o método Kirby-Bauer referido) preparou-se uma suspensão bacteriana com concentração celular equivalente à da escala de 0.5 de Mcfarland e inocularam-se duas placas com *Mueller-Hinton* suplementado com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux ®, Marcy-l’Etoile, France) seguindo-se a colocação dos discos e posterior incubação durante 20-24 horas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂. O controlo de qualidade foi efectuada com a estirpe *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (CLSI, 2005). Os discos dos antibióticos foram colocados tendo em consideração o seguinte: (i) os discos de penicilina e tetraciclina foram colocados na mesma placa em posições diametralmente opostas devido a se antecipar a formação de halos grandes, por forma a reduzir a possibilidade de interferência; (ii) os discos de eritromicina e clindamicina foram colocados com apenas 12 mm de distância entre si, pretendendo-se assim avaliar a indução da resistência à clindamicina devido à presença de eritromicina. Quando existe indução observa-se um halo em forma de D (Seppälä et al., 1998). Este fenótipo designa-se iMLSB (inducible, Macrolide,

Lincosamide and Streptogramins B) (ver Figura 4). Quando existe apenas resistência à eritromicina, sem indução, o isolado em questão apresenta o fenótipo M (Macrolide), quando se verifica resistência à eritromicina e à clindamicina (resistência constitutiva), o isolado será classificado como tendo o fenótipo cMLSB (constitutive, Macrolide, Lincosamide and Streptogramins B). A interpretação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos é efectuada com base na medição do halo de inibição resultante da acção do agente antimicrobiano. Os critérios aplicados neste estudo (CLSI, 2005) encontram-se esquematizados na tabela 7.

Tabela 7: Critérios de interpretação do teste de susceptibilidade aos antibióticos para *Streptococcus* spp. (excepto *Streptococcus pneumoniae*)

| Antibióticos | Grupo de Antibióticos | Concentração do antibiótico no disco | Diâmetro do halo (mm) | | |
|--------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|-------|-----|
| | | | R | I | S |
| Penicilina | Penicilinas | 10U | - | - | ≥24 |
| Vancomicina | Glicopéptidos | 30µg | - | - | ≥17 |
| Eritromicina | Macrólidos | 15µg | ≤15 | 16-20 | ≥21 |
| Tetraciclina | Tetraciclinas | 30 µg | ≤18 | 19-22 | ≥23 |
| Ofloxacina | Fluoroquinolonas | 5 µg | ≤12 | 13-15 | ≥16 |
| Clindamicina | Lincosamidas | 2 µg | ≤15 | 16-18 | ≥19 |

Valores de acordo com CLSI (2005)

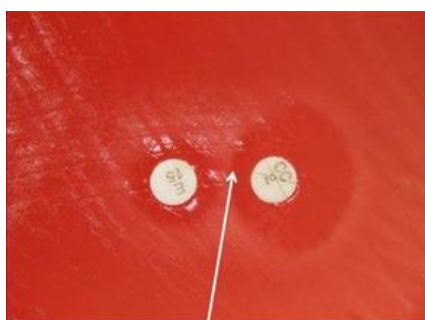


Figura 4. Teste de indutibilidade da resistência à clindamicina, pela eritromicina (<http://www.cdc.gov/groupbstrep/images/lab-positiveGBS-1g.jpg>)

Nos isolados que apresentaram resistência intermédia à eritromicina, clindamicina e/ou tetraciclina foi efectuada a confirmação através da determinação da sua concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de macrodiluição.

2.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Método de macrodiluição

Para os isolados que revelaram resistência intermédia à eritromicina, clindamicina e/ou tetraciclina, determinou-se a concentração inibitória mínima a esses antimicrobianos pelo método de macrodiluição, tendo por base as recomendações do CLSI (2005).

Preparou-se uma suspensão bacteriana equivalente à escala de 0.5 de Mcfarland a partir de colónias propagadas em meio sólido suplementado com 5% de sangue de carneiro durante 18-24 horas a 37°C. A cada tubo de ensaio com 10 mL de *Mueller-Hinton broth* suplementado com 3% de sangue de cavalo lisado (bioMérieux®, Marcy-l'Etoile, France) foram adicionados 10 µL da suspensão bacteriana em estudo, obtendo-se uma concentração final de 1.5×10^5 UFC/mL. As concentrações de eritromicina e clindamicina testadas foram 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 e 2 µg/mL e para a tetraciclina foram de 1, 2, 4, 8 e 10 µg/mL. A incubação dos isolados com as respectivas diluições dos antibióticos foi efectuada a 37°C pelo período de 20-24 horas. Seguidamente observou-se a turvação das diferentes diluições e registou-se a CIM, sendo que esta corresponde à menor concentração mínima do agente antimicrobiano que inibe visivelmente o crescimento bacteriano em testes de susceptibilidade aos antimicrobianos (CLSI, 2005). Semeia-se cada diluição (em meio sólido suplementado com 5% de sangue de carneiro durante 18-24 horas a 37°C) para confirmação da interpretação feita macroscopicamente assim como para excluir a possibilidade de contaminação. Como controlo negativo foi utilizado o meio de *Mueller-Hinton broth* suplementado com 3% de sangue de cavalo lisado (bioMérieux®, Marcy-l'Etoile, France) e, como controlo positivo, e estirpe em estudo propagada no meio. O controlo de qualidade foi efectuado com a estirpe *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619. Na tabela 8 encontram-se os *breakpoints* para a clindamicina, eritromicina e tetraciclina para *Streptococcus* spp. (excepto

Streptococcus pneumoniae) para classificação dos isolados quanto ao seu perfil de susceptibilidade a estes antimicrobianos.

Tabela 8 – Breakpoints para interpretação do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos em *Streptococcus* spp. (excepto *Streptococcus pneumoniae*) pelo método de macrodiluição

| Antibiótico | CIM (µg/ mL) | | |
|--------------|--------------|------------------------|------------|
| | Susceptível | Resistência Intermédia | Resistente |
| Eritromicina | ≤0.25 | 0.5 | ≥1 |
| Clindamicina | ≤0.25 | 0.5 | ≥1 |
| Tetraciclina | ≤2 | 4 | ≥8 |

Valores de acordo com CLSI (2005)

Nos isolados de *S. agalactiae* que apresentaram resistência intermédia à eritromicina e susceptibilidade ou resistência intermédia à clindamicina, sem achatamento do halo de inibição da clindamicina em meio sólido, foi efectuado um teste para avaliação da indução da resistência à clindamicina em meio líquido, testando-se as concentrações de clindamicina acima mencionadas juntamente com uma concentração sub-inibitória de eritromicina de 0.1 µg/mL (Guimarães, 2008). A interpretação da CIM por macrodiluição, de acordo com os *breakpoints* recomendados (CLSI, 2005) está representada na figura 5.



Figura 5. Interpretação da Concentração Inibitória Mínima por macrodiluição e teste de indutibilidade de resistência à clindamicina num isolado de *Streptococcus agalactiae* (Imagem obtida no âmbito deste trabalho). 1) Contolo negativo; 2) Controlo positivo, 3) [E]=0.05µg/mL; 4) [E]=0.1µg/mL; 5) [E]=0.25µg/mL; 6) [E]=0.5µg/mL; 7) [E]=1µg/mL; 8) [E]=2µg/mL; 9) [E]=0.1µg/mL e [DA]=0.05µg/mL; 10) [E]=0.1µg/mL e [DA]=0.1µg/mL; 11) [E]=0.1µg/mL e [DA]=0.25µg/mL; 12) [E]=0.1µg/mL e [DA]=0.5µg/mL; 13) [E]=0.1µg/mL e [DA]=1µg/mL; 14) [E]=0.1µg/mL e [DA]=2µg/mL. Os tubos 1, 10-14 apresentaram-se límpidos após incubação de 20-24 horas a 37°C, enquanto que os tubos 2 a 9 apresentaram turvação, revelando crescimento bacteriano. Desta forma, o valor da CIM para este isolado foi: [E]: $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ e para a clindamicina (na presença de uma concentração sub-inibitória de eritromicina) foi de $0.1 \mu\text{g/mL}$. Assim, este isolado apresentou resistência à eritromicina e não revelou resistência induzida à clindamicina (fenótipo M)

2.7. Detecção dos genes de resistência aos macrólidos por PCR

Os isolados que apresentaram resistência ou resistência intermédia aos macrólidos foram estudados por PCR para pesquisa dos genes *erm(A)* [*erm(TR)*], *erm(B)* e *mef(A)*.

Os *primers* utilizados para a detecção de cada um destes genes encontram-se descritos na tabela 9.

Tabela 9 – Primers utilizados para detecção dos genes *erm(A)* [*erm(TR)*], *erm(B)* e *mef(A)* de resistência aos macrólidos

| Gene alvo | Sequência dos Primers |
|---|---|
| <i>erm(A)</i> [<i>erm(TR)</i>] ¹ | <i>Forward</i> – 5' CCCGAAAATACGCAAAATTTTCAT 3' <i>Reverse</i> – 5' CCCTGTTTACCCATTTATAAACG 3' |
| <i>erm(B)</i> ² | <i>Forward</i> – 5' GGAGTGATTACATGAACAAAATA 3' <i>Reverse</i> – 5' TTCCTTTTAGTAACGTGTAACCTT 3' |
| <i>mef(A)</i> ¹ | <i>Forward</i> – 5' GACCAAAAGCCACATTGTGGA 3' <i>Reverse</i> – 5' CCTCCTGTCTATAATCGCATG 3' |

¹ Cresti *et al.*, 2002; ² Cascone *et al.*, 2002.

Assim, para cada um dos isolados foram efectuadas reacções de PCR (volume final de 25 µL) para detecção dos 3 genes, de acordo com as condições apresentadas na tabela 10. As condições de reacção para cada um dos genes foram adaptadas das descritas anteriormente (Cresti *et al.*, 2002; Marchese *et al.*, 1998; Pires *et al.*; 2005).

Tabela 10 - Condições de PCR para a detecção dos genes de resistência aos macrólidos: *erm(A)* [*erm(TR)*], *erm(B)* e *mef(A)*

| Reagente | <i>erm(A)</i> [<i>erm(TR)</i>] | | <i>erm(B)</i> | | <i>mef(A)</i> | |
|------------------------------|----------------------------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|
| | Cf | V (µL) | Cf | V (µL) | Cf | V (µL) |
| 10 X Tampão de reacção | 1X | 2.5 | 1X | 2.5 | 1X | 2.5 |
| 10 mM dNTPs | 200 µM | 0.5 | 0.2 mM | 0.5 | 0.2 mM | 0.5 |
| 0.1 mM <i>Primer Forward</i> | 1 µM | 0.25 | 1 µM | 0.25 | 1 µM | 0.25 |
| 0.1 mM <i>Primer Reverse</i> | 1 µM | 0.25 | 1 µM | 0.25 | 1 µM | 0.25 |
| 5 U/ µL Biotaq polimerase | 1 U | 0.1 | 2.5 U | 0.25 | 1 U | 0.1 |
| 50 mM MgCL2 | 1.5 mM | 0.75 | 2 mM | 1 | 2.5 mM | 1.25 |
| DNA | - | 1col. | - | 1col. | - | 1 col. |
| Água destilada estéril | - | 20.15 | - | 19.75 | - | 19.65 |

Cf = Concentração final; V (µL) = Volume pipetado; 1col.=1 colónia isolada em meio sólido suplementado com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux ®, Marcy-l'Etoile, France). Biotaq DNA Polimerase (Bioline) – e dNTPs (Fermentas)

A amplificação foi efectuada no termociclador (*Eppendorf Mastercycler* ® *personal*) com as condições de amplificação discriminadas na tabela 11. Como controlos positivos utilizaram-se estirpes de *Streptococcus pyogenes* que contêm os genes em estudo (Pires *et al.*, 2005; Cresti *et al.*, 2002; Guimarães, 2008; Rodrigues,

2009), o controlo negativo da reacção foi efectuada através da utilização de água Milli-Q (Merck Millipore).

Tabela 11 – Perfil de amplificação para a detecção dos genes de resistência aos macrólidos: *erm*(A) [*erm*(TR)], *erm*(B) e *mef*(A)

| Gene | Perfil de amplificação | Tamanho do Produto amplificado | Estirpes Controlo Positivo |
|--------------------------------------|---|---------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>erm</i> (A) [<i>erm</i> (TR)] | 95°C (5min.); 40 ciclos[94°C (30seg.), 48°C (60seg.), 72°C (30seg.)] | 590 pb | <i>S. pyogenes</i> A200 |
| <i>erm</i> (B) | 94°C (5min.); 30 ciclos[94°C (30seg.), 53°C (30seg.), 72°C (1min 30seg.)]; 72°C (7min.) | 800 pb | <i>S. pyogenes</i> 19D79 |
| <i>mef</i> (A) | 95°C (5min.); 40 ciclos[94°C (30seg.), 58°C (60seg.), 72°C (80seg.)] | 1432 pb | <i>S. pyogenes</i> A177 |

A visualização do produto de PCR foi efectuada por separação em electroforese em gel de agarose a 1,5% (Agarose Molecular Grade, Bioline) com uma concentração de brometo de etídeo 0.5 µg/ mL Os marcadores de peso molecular utilizados foram *HyperLadder* II (Bioline) ou *HyperLadder* IV (Bioline) conforme o tamanho do produto de PCR esperado. O gel foi submetido a uma corrente eléctrica de 100 V durante 60 minutos, sendo a imagem observada com o sistema GelDoc (BioRad).

2.8. Electroforese de campo pulsado (PFGE, de *Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

O método utilizado neste estudo foi adaptado do descrito por Chung e colaboradores (2000). A composição das soluções e tampões está referida na secção 2.8.13

Foram seleccionados para análise de padrões de PFGE os isolados recolhidos de amostras de uma mesma grávida assim como os isolados que apresentaram resistência à eritromicina e/ou clindamicina.

2.8.1. Propagação das culturas

Amostras das culturas *stock* conservadas a -80°C, foram semeadas em gelose Columbia enriquecida com 5% de sangue de Carneiro (bioMérieux®, Marcy-l'Etoile, France) e incubadas a 37°C em atmosfera de aerobiose, durante um período de 18 a 24 horas. Em seguida, colónias isoladas de cada estirpe foram inoculadas em 6 mL de *Todd-Hewitt broth* (Quilaban), seguindo-se nova incubação a 37°C em aerobiose sem agitação, durante um período mínimo de 17 horas.

2.8.2. Lavagem celular

A suspensão celular obtida foi centrifugada a 4000 rpm durante 20 minutos em centrífuga refrigerada (Beckman, Model J2-21Centrifuge), à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi decantado e o sedimento ressuspendido em 1 mL de tampão PIV, seguindo-se nova centrifugação, também em centrífuga refrigerada, a 4000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi decantado e o sedimento ressuspendido em 200 µL de tampão PIV.

2.8.3. Ajuste da concentração celular

Numa cuvette com 1 mL de tampão PIV adicionou-se 5µL da suspensão bacteriana e, após homogeneização, foi efectuada a leitura da absorvância a comprimento de onda (λ) de 620 nanómetros (nm) (Philips, PU 8600 series). Os valores das absorvâncias devem estar compreendidos entre 0,025 cm⁻¹ e 0,15 cm⁻¹. Para obtenção de uma densidade óptica final de 5,0, o ajuste da concentração celular foi efectuada através da adição de PIV com base na seguinte fórmula:

$$\text{Volume de PIV } (\mu\text{L}) = (\text{DO}_{620} \times 40 \times 210) - 210, \text{ em que:}$$

DO_{620} = Densidade óptica da suspensão celular a um λ de 620 nm

210 µL = Volume aproximado da suspensão bacteriana após ressuspensão do sedimento em 200 µL de PIV

40 = (200/5) sendo 200 o factor de diluição (5µL de suspensão em 1mL de PIV) e 5,0 a DO final da suspensão celular

2.8.4. Preparação dos discos de agarose com o DNA

Foram transferidos 150 µL de cada suspensão celular com a concentração celular desejada para um microtubo (tubo *eppendorf*) e incubaram-se 10 minutos a 42°C em banho seco (Accublock™ Digital Dry Bath, Labnet International, Inc., Woodbridge, USA). A solução de agarose (Agarose Type VII, Low Gelling Temperature, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) foi preparada a 1,5% em tampão PIV, tendo sido mantida a 42°C durante 10 minutos. Após este período misturaram-se 150 µL da suspensão bacteriana com 150 µL da solução de agarose, e homogeneizou-se bem. Numa placa de vidro forrada com parafilm e pré-lavada com etanol a 70%, foram colocadas 10-12 gotas de 20 µL de cada mistura (de suspensão celular e solução de agarose), e as gotas foram cobertas com lâminas de vidro, também pré-lavadas com etanol a 70% (ver Figura 6), de forma a ficarem achatadas com forma de disco. A placa com os discos foi colocada 5 minutos a -20°C para que a agarose solidificasse bem, seguindo-se uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente (TA)

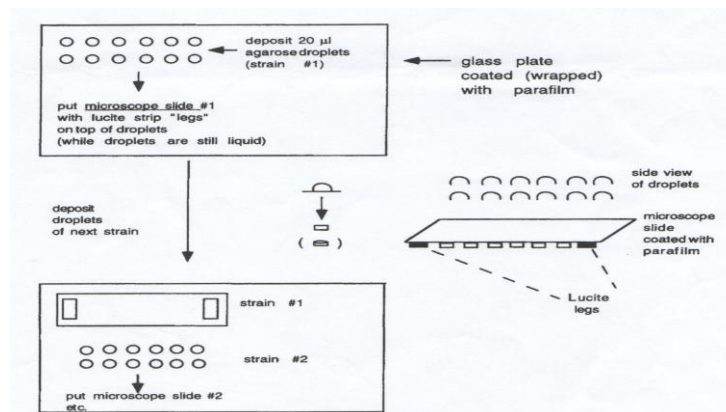


Figura 6. Preparação dos discos de agarose com o DNA para PFGE
(Chung *et al.*, 2000)

2.8.5. Lise celular

Transferiu-se para um tubo *Falcon* (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) de 15 mL, 1 mL de solução de lise EC e colocaram-se os discos de agarose nesta solução. A lise celular ocorreu a 37°C durante a noite.

2.8.6. Desproteíntização

Removeu-se a solução de lise EC e adicionou-se 1 mL de solução ESP. Para que a desproteíntização ocorra incubaram-se as amostras durante 17 horas a 50°C.

2.8.7. Lavagem dos discos de agarose com o DNA

A solução de desproteíntização foi removida e, seguidamente foram efectuadas 8 lavagens com 12 mL de tampão TE 1X, durante 30 minutos cada, com agitação suave. A remoção do tampão TE 1X entre lavagens foi efectuada com recurso a gaze esterilizada. Os discos foram armazenados a 4°C em tampão TE 1X.

2.8.8. Restrição enzimática do DNA

As endonucleases de restrição utilizadas foram a *SmaI* (Invitrogen Corporation) e o isosquisómero *Cfr9I* (Fermentas International Inc.). A sequência de reconhecimento de DNA e o local de restrição da endonuclease *SmaI* são 5'CCC↓GGG3' e da endonuclease *Cfr9I* são 5'C↓CCGGG3'. A endonuclease *Cfr9I* foi usada para estudo dos isolados resistentes aos macrólidos de fenótipo M (Figueiredo *et al.*, 2006) e a *SmaI* para os restantes isolados em estudo.

2.8.8.1. Restrição com *SmaI*

O disco de agarose com o DNA de cada isolado em estudo foi colocado num tubo *ependorf* com 150µL de tampão pré-*SmaI* 1X e incubado durante 40 minutos à

TA, após os quais o tampão foi removido. Foram adicionados 50 µL do mesmo tampão e 20 U da endonuclease *Sma*I. A restrição ocorreu a 30°C durante a noite (período mínimo de 17 horas). A paragem da restrição enzimática foi feita com uma mistura de TE 0.5X e EDTA 0.25M.

2.8.8.2. Restrição com *Cfr*9I

O disco de agarose com o DNA de cada isolado em estudo foi colocado num tubo *eppendorf* com 150 µL de tampão *Cfr*9I 1X e incubado durante 40 minutos à TA, após os quais o tampão foi removido. Posteriormente, adicionaram-se 50 µL do mesmo tampão e 3.75U da endonuclease *Cfr*9I, e a restrição ocorreu durante a noite (16 horas) a 37°C. A restrição foi parada pela adição de uma mistura de tampão TE 0.5X e EDTA 0.25M.

2.8.9. Preparação do gel

Adicionaram-se 2g de agarose SeaKem ® (Lonza Rockland, ME USA) a 200 mL de tampão TBE 0.5% (BioRad) autoclavado. A mistura foi fervida no microondas e homogeneizada até se observar a dissolução da agarose. Deixou-se arrefecer a solução de agarose (aproximadamente até aos 50°C) e encheu-se a moldura de montagem do gel. Guardou-se um pouco da solução de agarose a 50°C para selagem dos poços após a colocação dos discos. Após a solidificação da agarose, adicionou-se o tampão de deposição com azul de bromofenol aos tubos *eppendorfs* que continham os discos, os quais foram colocados nos poços com o auxílio de uma lamela e de uma ansa. Em posições determinadas, em cada gel, foi incluído o marcador de peso molecular, *Lambda Ladder PFG Marker* (New England BioLabs® Inc).

2.8.10. Electroforese de campo pulsado

A migração dos fragmentos de macrorestrição foi efectuada no equipamento CHEF-DRIII (BioRad) durante 23 horas com as seguintes condições:

Temperatura: 11.3°C, Tempo inicial do pulso 5 segundos, Tempo final do pulso 35 segundos, Voltagem: 6V/cm, Ângulo: 120°-

2.8.11. Coloração e visualização do gel

Após electroforese o gel foi corado em 200 mL de água bidestilada com 10µL de brometo de etídio (solução stock a 10mg/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) durante 30 minutos. Removeu-se a solução com brometo de etídio e adicionou-se 200 mL de água bidestilada para descoloração do gel durante 40 minutos. O gel foi posteriormente visualizado no sistema GelDoc (BioRad).

2.8.12. Elaboração de dendrogramas

A análise dos perfis electroforéticos foi efectuada através da elaboração de dendrogramas, permitindo assim avaliar a diversidade genética e proximidade genética (clonalidade) existente entre os isolados em estudo. Os dendrogramas foram elaborados com o *software BioNumerics* (*Software BioNumerics*®, Versão 6.5, *Applied Maths*), existente no Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT). O método de agrupamento foi o UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic average*) e o coeficiente de semelhança utilizado foi o Dice. Para a construção dos dendrogramas foi definida uma optimização de 0 e uma tolerância de 1.5. Isolados cujos perfis de restrição revelem uma semelhança $\geq 80\%$ foram considerados geneticamente relacionados, enquanto que, isolados que apresentem menos de 80% de semelhança entre os seus perfis de restrição foram considerados como geneticamente não relacionados (Pires *et al.*, 2009).

2.8.13. Preparação de soluções para PFGE

Os tampões e soluções foram preparados de acordo com Chung e colaboradores (2000), excepto quando indicado de outra forma e foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos e conservados à TA.

1M Tris pH 8.0 (1 Litro): Pesaram-se 121.1g de Trizma base (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) e adicionaram-se 800mL de água destilada. Ajustou-se o pH a 8.0, através da adição de aproximadamente 42 mL de HCL. Perfez-se o volume com água destilada e autoclavou-se a solução.

0.5M EDTA pH 8.0 (1 Litro): Pesaram-se 186.1g de EDTA (sal disódico) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) e adicionaram-se 800mL de água destilada. Agitou-se e ajustou-se o pH até 8.0 através da adição de lentilhas de NaOH. Perfez-se o volume com água destilada e autoclavou-se a solução.

PIV (500mL): 10mM Tris pH 8.0, 1.0M NaCl Adicionaram-se 5 mL de 1M de Tris a pH 8,0 e 29,2 g de NaCl (Panreac Química SA, Barcelona, Espanha), perfez-se o volume até aos 500 mL com água destilada e autoclavou-se a solução.

Solução EC (500mL) (Pires, R. et al. 2009): 6mM de Tris a pH 8,0, 1M de NaCl, 100 mM de EDTA a pH 8,0, 0,2% de desoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 0,5% de laurilsarcosina de sódio (USB® Corporation, Cleveland OH, USA) e 0,5% de Brij 58 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) Pipetaram-se 3 mL de 1M de Tris a pH 8,0, 29,2 g de NaCl, 100mL de 0,5M de EDTA a pH 8,0, 1g de desoxicolato de sódio, 2,5g de laurilsarcosina de sódio e 2,5g de Brij 58 e perfez-se o volume até 500 mL com água destilada. Autoclavou-se a solução.

Solução de lise EC (Pires, R. et al. 2009): solução EC com 50µg/mL RNase, 1mg/mL de lisozima e 10U/µL de mutanolisina

Solução ES: Para preparar 500 mL, pesaram-se 93,1 g de EDTA (sal dissódico) e dissolveram-se em 400 mL de água destilada. O pH foi ajustado a 9.0 com NaOH. Acrescentaram-se 5g de sarcosil (laurilsarcosina de sódio) e perfez-se o volume com água destilada. A solução foi posteriormente autoclavada.

Solução de desproteíntização ESP: solução ES com 1mg/mL de Proteinase K

1M Tris pH 7.5 (1Litro):Dissolveram-se 121.1 gramas de Trizma base em 800 mL de água destilada. Ajustou-se o pH a 7.5 com HCL. Perfez-se o volume com água destilada e autoclavou-se a solução.

TE 1X (1 Litro): 10mM de Tris a pH 7,5, 1mM de EDTA a pH 8,0 Pipetaram-se 10 mL de 1M de Tris a pH 7,5 e 2 mL de 0,5m de EDTA a pH 8,0 e perfez-se o volume com água destilada. A solução foi posteriormente autoclavada.

III-RESULTADOS

1. DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM ESTUDO E PERCENTAGEM DE COLONIZAÇÃO

No presente estudo foram caracterizados 179 isolados de *S. agalactiae* provenientes de exsudados vaginais e/ou rectais de mulheres grávidas entre as 35 e as 37 semanas de gestação, assim como de amostras de urina colhidas durante a mesma gestação. As grávidas foram acompanhadas no Hospital Garcia de Orta, em Almada. Entre os 179 isolados, 100 foram isolados de exsudados vaginais, 47 de exsudados rectais e 32 de urinas.

Foi possível observar a existência de conjuntos de isolados com as mesmas características fenotípicas e genotípicas, os quais são epidemiologicamente relacionados porque pertencem à mesma grávida e foram obtidos no decorrer da gravidez. Assim, os isolados provenientes da mesma grávida, que apresentaram o mesmo serótipo, o mesmo fenótipo e genótipo de resistência aos antimicrobianos estudados e que se revelaram indistinguíveis ou relacionados por comparação dos perfis de PFGE (com grau de semelhança mínimo de 80% (ver 2.8.12), foram contabilizados apenas como um só.

Deste modo, dos 179 isolados iniciais, apenas 144 foram considerados para determinar a prevalência dos serótipos e da resistência aos antimicrobianos. A distribuição anual dos 144 isolados estudados foi a seguinte: 22 em 2007, 40 em 2008, 44 em 2009 e 38 em 2010.

Considerando a informação fornecida pelo HGO, relativamente aos isolados clínicos enviados para o IHMT, a percentagem de colonização vaginal da mulher grávida entre as 35-37 semanas de gestação, de 2007 a 2010, foi de 12%, podendo esta percentagem estar sub-avaliada.

Após a propagação das estirpes congeladas em meio sólido suplementado com 5% de sangue de carneiro procedeu-se à respectiva caracterização dos isolados. O teste de CAMP revelou-se positivo para todos os isolados.

2. DISTRIBUIÇÃO DOS SERÓTIPOS CAPSULARES DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

A todos os isolados (179 isolados) foi efectuada a determinação do serótipo capsular. Aos isolados que não apresentaram reacção positiva com nenhum dos anti-soros específicos de tipo (5 isolados), foram considerados NT (2.8%). Estes foram submetidos a serogrupagem como forma de confirmar a identificação da espécie, tendo-se verificado uma reacção positiva para todos os casos. Foi ainda efectuada genotipagem capsular através de sequenciação do *locus cps* D-E-F. A genotipagem capsular foi também efectuada a alguns isolados como forma de confirmação do seu serótipo. Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 12.

Tabela 12- Genotipagem capsular do *locus cps*D-E-F dos isolados de *S. agalactiae*

| Identificação do isolado | Serotipagem por aglutinação | Genotipagem capsular do <i>locus cps</i> D-E-F |
|--------------------------|-----------------------------|--|
| GO10146R | Não Tipável | Serótipo V |
| GO10148R | Serótipo Ib | Serótipo Ib |
| GO10147V | Serótipo IV | Serótipo Ib |
| GO10125R | Não tipável | Serótipo IV |
| GO8110V | Serótipo IV | Serótipo III |
| GO10164U | Não tipável | Serótipo II |
| GO8104R | Serótipo III | Serótipo III |
| GO7184U | Serótipo II | Serótipo II |
| GO7189U | Serótipo Ia | Serótipo Ia |
| GO7191V | Serótipo II | Serótipo II |
| GO10151V | Não Tipável | Serótipo V |
| GO8085R | Não Tipável | Serótipo V |

Desta forma foi possível obter o serótipo capsular de cada isolado de *S. agalactiae*. Verificou-se que três dos cinco isolados considerados NT pela serotipagem por aglutinação, apresentam o serótipo V, enquanto que os outros dois isolados, um apresenta o serótipo II e outro apresenta serótipo IV. Relativamente aos restantes isolados, observou-se discrepância entre o serótipo obtido por aglutinação e o serótipo obtido através de técnicas de PCR e sequenciação do *locus cps* D-E-F em dois dos

isolados (GO10147V e GO8110V). Considerando os resultados obtidos pela genotipagem do *locus* cpsD-E-F, a distribuição dos serótipos capsulares dos isolados em estudo encontra-se na tabela 13.

Tabela 13 - Distribuição dos serótipos capsulares de *S. agalactiae* entre 2007 e 2010

| Ano | N.º de isolados por serótipo (%) | | | | | | |
|------------------|----------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| | Ia | Ib | II | III | IV | V | VI |
| 2007 | 9/22 (41%) | 1/22 (4.5%) | 2/22 (9.1%) | 4/22 (18.2%) | 3/22 (13.6%) | 3/22 (13.6%) | 0/22 (0%) |
| 2008 | 6/40 (15%) | 2/40 (5%) | 5/40 (12.5%) | 9/40 (22.5%) | 7/40 (17.5%) | 11/40 (27.5%) | 0/40 (0%) |
| 2009 | 11/44 (25%) | 7/44 (15.9%) | 8/44 (18.2%) | 4/44 (9.1%) | 6/44 (13.6%) | 8/44 (18.2%) | 0/44 (0%) |
| 2010 | 9/38 (23.7%) | 2/38 (5.3%) | 7/38 (18.4%) | 5/38 (13.2%) | 7/38 (18.4%) | 7/38 (18.4%) | 1/38 (2.6%) |
| Total (%) | 35/144 (24.3%) | 12/144 (8.3%) | 22/144 (15.3%) | 22/144 (15.3%) | 23/144 (16%) | 29/144 (20.1%) | 1/144 (0.7%) |

A negrito encontra-se o serótipo mais prevalente por ano de estudo e na globalidade dos quatro anos.

A evolução da prevalência (%) de cada serótipo entre 2007 e 2010, assim como a prevalência (%) de cada serótipo no total dos quatro anos de estudo, encontram-se graficamente representadas nas figuras 7 e 8, respectivamente.

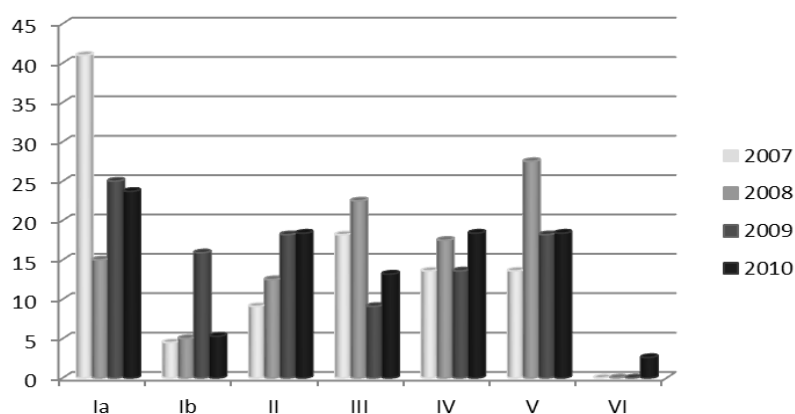


Figura 7 – Prevalência anual dos serótipos (%) de *S. agalactiae* entre 2007 e 2010

O serótipo VI foi o serótipo menos detectado, tendo sido identificado em apenas um isolado de *S. agalactiae*, no ano 2010. O serótipo Ib, apresentou baixa prevalência (4.5% em 2007, 5% em 2008, 5.3% em 2010), com exceção do ano 2009 em que foi detectado em 15.9% dos isolados. O serótipo II apresentou uma prevalência crescente (9.1% em 2007, 12.5% em 2008, 18.2% em 2009), chegando a atingir os 18.4% em 2010. Os serótipos Ia, III, IV e V foram os serótipos mais prevalentes. O serótipo Ia foi o serótipo dominante em todos os anos com exceção do ano 2008 (41% em 2007, 15% em 2008, 25% em 2009 e 23.7% em 2010) em que o serótipo mais prevalente foi o serótipo V (27.5% dos isolados). A prevalência do serótipo III oscilou entre 9.1% em 2009 e 22.5% em 2008. O serótipo IV foi identificado com frequência neste estudo, atingindo uma prevalência de 18.4% em 2010, ano em que, juntamente com os serótipos II e V foi o segundo serótipo mais detectado.

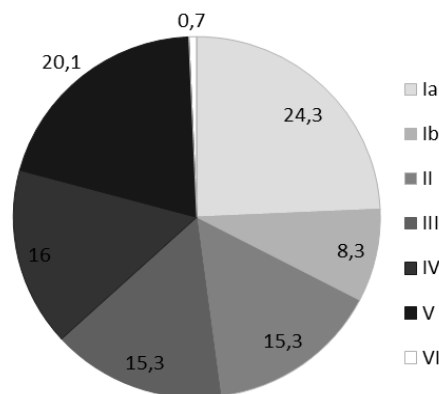


Figura 8 – Prevalência total (%) dos serótipos de *S. agalactiae* (2007 a 2010)

Considerando os quatro anos na sua totalidade, o serótipo dominante foi o serótipo Ia (24.3%) seguido dos serótipos V (20.1%), IV (16%), II e III (15.3%), Ib (8.3%) e VI (0.7%). O conjunto dos serótipos Ia, II, III, IV e V representa 91% da população de *S. agalactiae* caracterizada.

3. RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* AOS ANTIMICROBIANOS

Todos os isolados apresentaram susceptibilidade à penicilina, vancomicina e ofloxacina quando testados pelo método de Kirby-Bauer. Aos isolados que apresentaram resistência intermédia à eritromicina e/ou tetraciclina (15 isolados) foi efectuada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para estes antibióticos, cujos resultados estão discriminados na tabela 14. Foi ainda avaliada a indutibilidade da resistência à clindamicina em isolados que apresentaram resistência intermédia à eritromicina e susceptibilidade à clindamicina e que não apresentaram fenótipo iMLS_B de acordo com o método de difusão em disco.

Tabela 14 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados com resistência intermédia à eritromicina, clindamicina e/ou tetraciclina (no método de Kirby-Bauer)

| Identificação do Isolado | Medida do halo de inibição (mm) – Método Kirby-Bauer | | | Concentração Inibitória Mínima (µg/ mL) | | | Fenótipo |
|--------------------------|--|--------|--------|---|------------|------|------------------------|
| | E | DA | TET | E | E=0.1 + DA | TET | |
| GO9001V | 18mm:I | 28mm:S | 14mm:R | ≥2:R | 0.25:S | - | M+TET |
| GO8093U | 18mm:I | 24mm:S | 14mm:R | ≥2:R | 0.1:S | - | M+TET |
| GO8104R | 19mm:I | 25mm:S | 15mm:R | 1:R | - | - | iMLS _B +TET |
| GO8108U | 25mm:S | 23mm:S | 20mm:I | - | - | 4:I | TET*** |
| GO8109U | 16mm:I | 23mm:S | 14mm:R | 1:R | - | - | iMLS _B +TET |
| GO8110V | 19mm:I | 23mm:S | 16mm:R | 1:R | - | - | iMLS _B +TET |
| GO8113V | 16mm:I | 23mm:S | 10mm:R | ≥2:R | - | - | iMLS _B +TET |
| GO8117V | 25mm:S | 23mm:S | 20mm:I | - | - | 4:I | TET*** |
| GO9015U | 11mm:R | 20mm:S | 21mm:I | - | - | 10:R | iMLS _B +TET |
| GO9043R | 16mm:I | 25mm:S | 14mm:R | ≥2:R | 0.25:S | - | M+TET |
| GO9069R | 18mm:I | 19mm:S | 15mm:R | ≥2:R | 0.25:S | - | M+TET |
| GO10155V | 18mm:I | 24mm:S | 13mm:R | ≥2:R | 0.25:S | - | M+TET |
| GO10156R | 18mm:I | 25mm:S | 14mm:R | ≥2:R | 0.25:S | - | M+TET |
| GO10162V | 16mm:I | 24mm:S | 13mm:R | ≥2:R | 0.1:S | - | M+TET |
| GO10163R | 16mm:I | 24mm:S | 12mm:R | ≥2:R | 0.1:S | - | M+TET |

E=Eritromicina; TET=Tetraciclina; DA=Clindamicina; E0.1+DA=Concentração mínima inibitória para a Clindamicina na presença de uma concentração sub-inibitória de eritromicina (0.1µg/mL); TET***=Isolados com resistência intermédia à tetraciclina, incluídos no grupo dos isolados resistentes a este antimicrobiano; R=Resistente; I= Resistência intermédia; S= Susceptível; M (Macrolide); iMLS_B (inducible, Macrolide, Lincosamide and Streptogramins B); cMLS_B (constitutive, Macrolide, Lincosamide and Streptogramins B)

Os isolados GO9001V, GO8093U, GO9043R, GO9069R, GO10155V, GO10156R, GO10162V, GO10163R com resistência intermédia à eritromicina e susceptibilidade à clindamicina, sem achatamento do halo de inibição da clindamicina pelo método de difusão em disco, revelaram-se resistentes à eritromicina pela determinação da CIM por macrodiluição. Por outro lado, o teste de indutibilidade da resistência à clindamicina, na presença de uma concentração subinibitória de eritromicina foi negativo em todos, uma vez que não se verificou resistência destes isolados à clindamicina, na presença da concentração sub-inibitória de eritromicina, confirmando desta forma o fenótipo M observado no teste de difusão em disco. Os isolados GO8104R, GO8109U, GO8110V, GO8113V com resistência intermédia à eritromicina e achatamento do halo de clindamicina (fenótipo iMLS_B) pelo método de Kirby-Bauer revelaram resistência à eritromicina através da determinação da CIM. O isolado GO9015U com resistência intermédia à tetraciclina pelo método de difusão em disco, revelou resistência através da determinação da CIM por macrodiluição. Os isolados GO8108U e GO8117V apresentaram resistência intermédia à tetraciclina quer pelo método de Kirby-Bauer quer por determinação da CIM e foram agrupados juntamente com os isolados resistentes a este antimicrobiano.

Com base nos resultados obtidos com o método de difusão em disco e determinação da CIM, a evolução da resistência aos antimicrobianos entre 2007 e 2010 encontra-se discriminada na tabela 15 e, graficamente, na figura 9.

Tabela 15 – Resistência dos isolados de *S. agalactiae* à eritromicina, clindamicina e tetraciclina entre 2007 e 2010

| Ano | Nº de isolados resistentes (%) | | |
|-----------|--------------------------------|------------------|--------------------|
| | Tetraciclina | Clindamicina | Eritromicina |
| 2007 | 20/22 (90.9) | 0/22 (0) | 0/22 (0) |
| 2008 | 34/40 (85)* | 6/40 (15) | 7/40 (17.5) |
| 2009 | 41/44 (93.1) | 4/44 (9.1) | 8/44 (18.2) |
| 2010 | 30/38 (78.9) | 4/38 (10.5) | 6/38 (15.8) |
| Total (%) | 125/144 (86.8) | 14/144 (9.7) | 21/144 (14.6) |

Ver legenda da Figura 9. A negrito encontra-se o valor da prevalência mais elevada para cada antibiótico

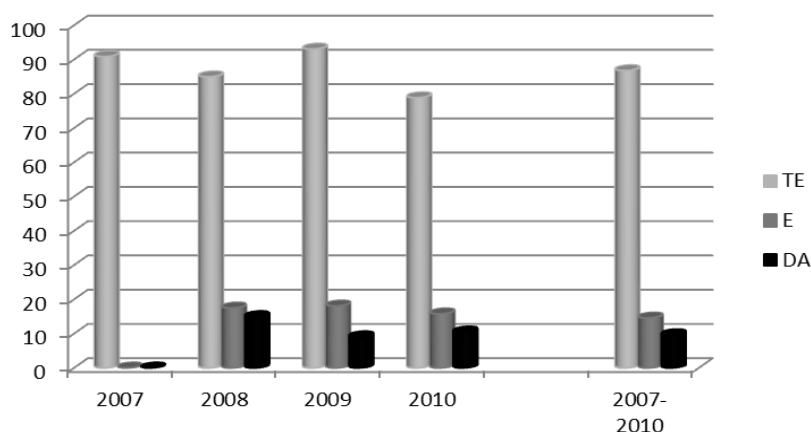


Figura 9 – Resistência dos isolados de *S. agalactiae* à eritromicina, clindamicina e tetraciclina (2007-2010). *Foram classificados como resistentes à tetraciclina os isolados que apresentaram resistência intermédia a este antibiótico quer pelo método de Kirby-Bauer quer pela determinação da concentração inibitória mínima por macrodiluição. No ano 2007 não foram identificados isolados resistentes à eritromicina e/ou clindamicina.

No ano 2007, dos 22 isolados estudados, nenhum (0%) apresentou resistência à eritromicina e/ou clindamicina. Em 2008, a percentagem de resistência à eritromicina foi de 17.5%, permanecendo constante em 2009 (18.2%) e 2010 (15.8%). Relativamente à clindamicina, a percentagem de resistência variou entre 9.1 % (2009) e 15% (2008). A percentagem de resistência à tetraciclina foi bastante elevada em todos os anos estudados chegando a alcançar os 93.1 % no ano 2009.

Considerando o total dos quatro anos (2007-2010), verificou-se que 86.8% dos isolados são resistentes à tetraciclina, enquanto que a percentagem de isolados resistentes à eritromicina e à clindamicina foi de 14.6% e 9.7%, respectivamente (ver Figura 9).

Aquando da realização do antibiograma pelo método de Kirby-Bauer, testou-se simultaneamente a indutibilidade da resistência à clindamicina, na presença de um macrólido (eritromicina) para discriminar entre o fenótipo M e o fenótipo iMLS_B, não excluindo os casos em que os isolados apresentam resistência constitutiva aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B (cMLS_B). Na figura 10 é possível

observar a evolução dos fenótipos de resistência à eritromicina, clindamicina e estreptograminas B.

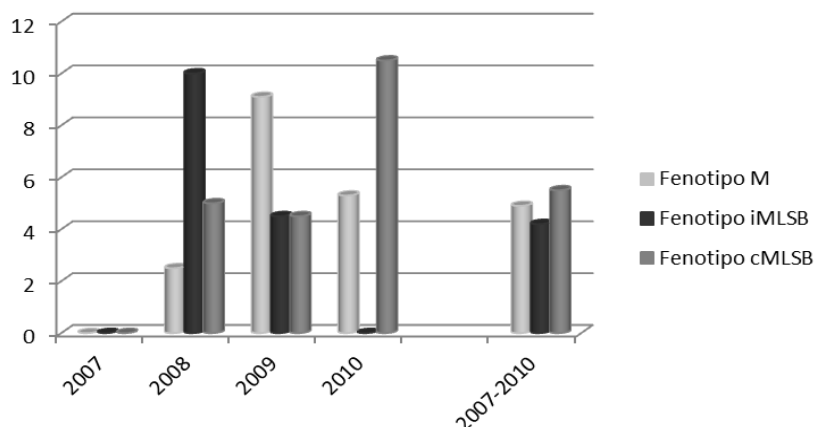


Figura 10 – Prevalência (%) dos fenótipos de resistência aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B, entre 2007 a 2010. M (Macrolide); iMLS_B (inducible, Macrolide, Lincosamide and Streptogramins B); cMLS_B (constitutive, Macrolide, Lincosamide and Streptogramins B)

Tal como referido anteriormente, no ano 2007 não foram detectados isolados com resistência à eritromicina e/ou clindamicina. Relativamente aos outros anos, verificou-se que o fenótipo iMLS_B foi o fenótipo dominante em 2008 (10%), enquanto que os fenótipos M e cMLS_B predominaram nos anos 2009 (9.1%) e 2010 (10.5%), respectivamente. No ano 2010 não se detectaram isolados com fenótipo iMLS_B.

Contudo, na totalidade dos quatro anos não foi possível identificar um fenótipo dominante uma vez que a diferença entre os diversos fenótipos foi no máximo de 2 isolados.

A relação entre os serótipos capsulares e os fenótipos de resistência à eritromicina, clindamicina e tetraciclina encontra-se na tabela 16.

Tabela 16 – Associação entre o serótipo capsular e os fenótipos de resistência à eritromicina, clindamicina e tetraciclina

| Fenótipo de resistência | Nº isolados resistentes (%) por serótipo: | | | | | | |
|-------------------------------|---|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| | Ia | Ib | II | III | IV | V | VI |
| M | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) |
| M+TET | 6/144 (4.2%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 1/144 (0.7%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) |
| cMLS_B | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 2/144 (1.4%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) |
| cMLS_B + TET | 0/144 (0%) | 2/144 (1.4%) | 0/144 (0%) | 2/144 (1.4%) | 0/144 (0%) | 2/144 (1.4%) | 0/144 (0%) |
| iMLS_B | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) |
| iMLS_B + TET | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 0/144 (0%) | 3/144 (2.1%) | 0/144 (0%) | 3/144 (2.1%) | 0/144 (0%) |
| TET | 27/144 (18.7%) | 9/144 (6.2%) | 18/144 (12.5%) | 17/144 (11.8%) | 17/144 (11.8%) | 17/144 (11.8%) | 1/144 (0.7%) |
| TOTAL (%) | 33/144 (22.9%) | 11/144 (7.6%) | 20/144 (13.9%) | 22/144 (15.3%) | 18/144 (12.5%) | 22/144 (15.3%) | 1/144 (0.7%) |

Ver legenda da Tabela 14. A negrito estão indicados os números e percentagens dos isolados de cada serótipo capsular de acordo com o fenótipo de resistência observado.

Entre os isolados caracterizados, 22.9% são de serótipo Ia e têm resistência a pelo menos um dos antibióticos testados, sendo assim o serótipo com maior prevalência de isolados com resistência aos antimicrobianos. Embora os serótipos II, III, IV e V apresentem uma prevalência de resistência aos antibióticos menor do que o serótipo Ia, a percentagem de isolados com resistência a pelo menos um dos antibióticos foi superior a 10 % [II (13.9%), III (15.3%), IV (12.5%) e V (15.3%)]. Todos os isolados com fenótipo M e iMLS_B revelaram também resistência à tetraciclina. O serótipo capsular mais prevalente entre os isolados de fenótipo M+TET foi o serótipo Ia, presente em seis dos sete isolados com este fenótipo. Os isolados com fenótipo iMLS_B+TET apresentaram, com igual prevalência, os serótipos III e V, representando 2.1% dos isolados cada um. Relativamente aos isolados com fenótipo cMLS_B (2 isolados), apresentaram serótipo capsular II (1.4%) e não possuem resistência à tetraciclina, enquanto que os isolados de fenótipo cMLS_B+TET (6 isolados) foram igualmente distribuídos pelos serótipos Ib, III e V (1.4%). Os isolados que possuem

fenótipo TET pertencem predominantemente ao serótipo Ia (18.7% dos isolados) sendo menos prevalentes, os serótipos II (12.5%), III (11.8%), IV (11.8%), V (11.8%), Ib (6.2%) e VI (0.7%).

A percentagem de isolados susceptíveis a todos os antibióticos foi de apenas 11.8% (17/144), pelo que 88.2% (127/144) dos isolados apresentou resistência a pelo menos um dos antibióticos testados.

Foram pesquisados os genes de resistência *erm(A)* [*erm(TR)*], *erm(B)* e *mef(A)*, por PCR, em todos os isolados que se revelaram resistentes à eritromicina ou à eritromicina e clindamicina (ver Figura 11).

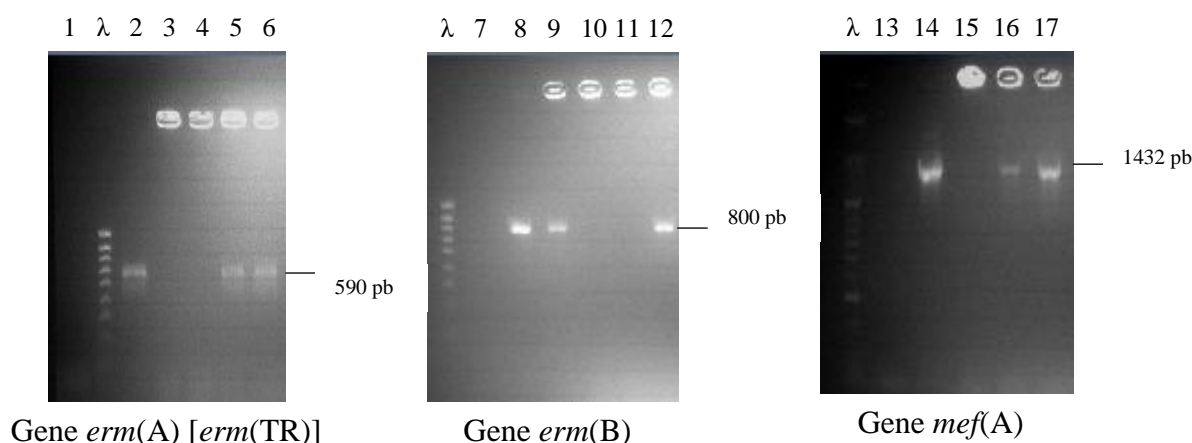


Figura 11 – Gel de visualização dos produtos de PCR para os genes *erm(A)* [*erm(TR)*], *erm(B)* e *mef(A)* de resistência aos macrólidos. λ =marcador de peso molecular (*HyperLadder* II e IV (Bioline)). 1, 7 e 13=controlo negativo; 2=*S. pyogenes* A200 (controlo positivo); 3=isolado GO10155V; 4= isolado GO9044R; 5= isolado GO9062V; 6= isolado GO9015U; 8=*S. pyogenes* 19D79 (controlo positivo); 9= isolado GO10144V; 10= isolado GO9069R; 11= isolado GO9045V; 12= isolado GO9041R; 14= isolado *S.pyogenes* 1A77 (controlo positivo); 15= isolado GO10144V; 16= isolado GO9069R; 17= isolado GO9045V. Os isolados GO9062V e GO9015U têm o gene *erm(A)* [*erm(TR)*]. Os isolados GO10144V e GO9041R possuem o gene *erm(B)* e os isolados GO9069R e GO9045V têm o gene *mef(A)*.

Na tabela 17 encontra-se a associação entre serótipo capsular, fenótipo de resistência aos antimicrobianos e o genótipo de resistência aos macrólidos.

Tabela 17 – Associação entre serótipo capsular, fenótipo e genótipo de resistência aos macrólidos

| Identificação do isolado | Ano | Serótipo capsular | Fenótipo de resistência aos antibióticos | Genótipo de resistência aos macrólidos |
|---------------------------------|------------|--------------------------|---|---|
| GO8093 | 2008 | Ia | M+TET | <i>mef(A)</i> |
| GO8091 | 2008 | III | cMLS _B +TET | <i>erm(B)</i> |
| GO8085 | 2008 | V | cMLS _B +TET | <i>erm(B)</i> |
| GO8056/GO8109 | 2008 | III | iMLS _B +TET | <i>erm(A)</i> [<i>erm(TR)</i>] |
| GO8104 | 2008 | III | iMLS _B +TET | <i>erm(A)</i> [<i>erm(TR)</i>] |
| GO8110 | 2008 | III | iMLS _B +TET | <i>erm(A)</i> [<i>erm(TR)</i>] |
| GO8113 | 2008 | V | iMLS _B +TET | <i>erm(A)</i> [<i>erm(TR)</i>] |
| GO9043 | 2009 | Ia | M+TET | <i>mef(A)</i> |
| GO9044/GO9045 | 2009 | Ia | M+TET | <i>mef(A)</i> |
| GO9069 | 2009 | Ia | M+TET | <i>mef(A)</i> |
| GO9001 | 2009 | IV | M+TET | <i>mef(A)</i> |
| GO9040/GO9041 | 2009 | Ib | cMLS _B +TET | <i>erm(B)</i> |
| GO9027 | 2009 | III | cMLS _B +TET | <i>erm(B)</i> |
| GO9015 | 2009 | V | iMLS _B +TET | <i>erm(A)</i> [<i>erm(TR)</i>] |
| GO9062 | 2009 | V | iMLS _B +TET | <i>erm(A)</i> [<i>erm(TR)</i>] |
| GO10155/GO10156 | 2010 | Ia | M+TET | <i>mef(A)</i> |
| GO10162/GO10163 | 2010 | Ia | M+TET | <i>mef(A)</i> |
| GO10145 | 2010 | Ib | cMLS _B +TET | <i>erm(B)</i> |
| GO10144 | 2010 | II | cMLS _B | <i>erm(B)</i> |
| GO10152 | 2010 | II | cMLS _B | <i>erm(B)</i> |
| GO10146/GO10151 | 2010 | V | cMLS _B +TET | <i>erm(B)</i> |

Ver legenda da Tabela 14.

A única associação que parece existir, considerando os isolados estudados, é entre os isolados de fenótipo M que apresentam o serótipo capsular Ia e têm o gene *mef(A)*. Relativamente aos outros fenótipos, apenas foi possível verificar que os isolados com fenótipo cMLS_B possuem o gene *erm(B)* e que o gene *erm(A)* [*erm(TR)*] está presente nos isolados de fenótipo iMLS_B. Todos os isolados que revelaram resistência à eritromicina e/ou clindamicina apresentaram apenas um dos três genes de resistência pesquisados.

4. CLONALIDADE DOS ISOLADOS DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Para análise dos perfis de macrorestrição com *Sma*I ou com o isosquisómero, *Cfr*9I, foram seleccionados os isolados recolhidos de amostras de uma mesma grávida e os isolados com resistência à eritromicina e/ou clindamicina. Assim, dos 179 isolados caracterizados, 86 (48%) foram analisados por PFGE.

A análise dos perfis de PFGE foi efectuada com recurso ao *software BioNumerics*® (Versão 6.5), utilizando uma optimização de 0% e uma tolerância de 1.5%. Foi estabelecido um *cut-off* de semelhança de 80%, em que os isolados com perfis de PFGE com uma semelhança igual ou superior a 80% foram considerados geneticamente relacionados, enquanto que os isolados que apresentaram menos de 80% de semelhança entre os seus perfis de restrição foram considerados como geneticamente não relacionados (Pires *et al.*, 2009). Isolados com 100% de semelhança entre os perfis de restrição, são considerados indistinguíveis (ver Figura 12).

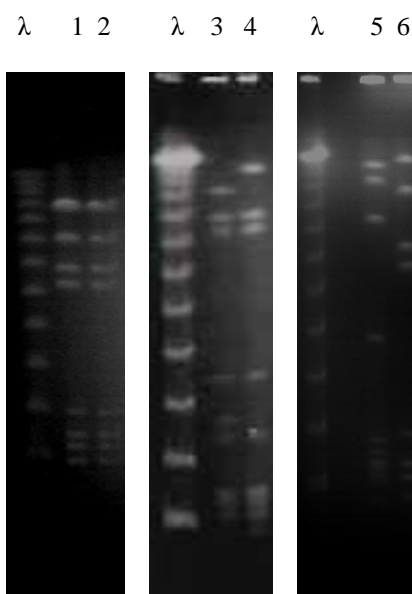


Figura 12 – Gel de visualização dos perfis de PFGE de *S. agalactiae*. λ = marcador de peso molecular (*Lambda Ladder PFG Marker* (New England BioLabs® Inc)). 1= isolado GO8078V; 2= isolado GO8079R; 3= isolado GO9037R; 4= isolado GO9039V; 5= isolado GO9008V; 6= isolado GO9009V. Os isolados GO8078V (poço 1) e GO8079R (poço 2) pertencem à mesma grávida e apresentam padrões de PFGE indistinguíveis. Os isolados GO9037R (poço 3) e GO9039V (poço 4) pertencem à mesma grávida e apresentam perfis de restrição geneticamente relacionados, enquanto que os isolados GO9008V (poço 5) e GO9009V (poço 6) pertencem a grávidas diferentes e os seus perfis de PFGE foram classificados como não relacionados (≥ 5 bandas de diferença). Exemplos de dendrogramas estão incluídos na pág. 76 e 77)

Os 86 isolados caracterizados por PFGE foram agrupados em 27 *clusters* (grupo de isolados com semelhança genética mínima de 80%), numerados de 1 a 27 com pelo menos dois isolados cada um. Verificou-se a existência de 18 *clusters* de dois isolados, 4 de três isolados, 3 de quatro isolados e dois *clusters* maiores, compostos por 8 e 11 isolados, 7 dos isolados não foram agrupados. Entre os 86 isolados, observaram-se 50 perfis de PFGE diferentes, isto é, que apresentam pelo menos uma banda diferente (ver Tabela 18 e anexo I).

Tabela 18 – Número de isolados e perfis de PFGE por *cluster* no período de 2007 a 2010

| <i>Cluster</i> | Nº isolados | Nº perfis PFGE | <i>Cluster</i> | Nº isolados | Nº perfis PFGE | <i>Cluster</i> | Nº isolados | Nº perfis PFGE |
|----------------|-------------|----------------|----------------|-------------|----------------|----------------|-------------|----------------|
| 1 | 11 | 6 | 10 | 2 | 1 | 19 | 2 | 1 |
| 2 | 4 | 2 | 11 | 2 | 1 | 20 | 2 | 1 |
| 3 | 4 | 2 | 12 | 2 | 1 | 21 | 8 | 5 |
| 4 | 3 | 2 | 13 | 2 | 2 | 22 | 2 | 1 |
| 5 | 3 | 2 | 14 | 2 | 1 | 23 | 2 | 1 |
| 6 | 2 | 1 | 15 | 2 | 1 | 24 | 3 | 2 |
| 7 | 2 | 1 | 16 | 2 | 1 | 25 | 2 | 1 |
| 8 | 2 | 1 | 17 | 4 | 1 | 26 | 2 | 1 |
| 9 | 2 | 1 | 18 | 2 | 1 | 27 | 3 | 1 |

Verificou-se que dos 18 *clusters* de dois isolados, 17 correspondem apenas a um perfil de PFGE, o que significa que a semelhança existente entre os isolados incluídos em cada um desses *clusters* foi de 100%. O *cluster* 13 foi a exceção, visto que os dois isolados que o constituem correspondem a dois perfis de restrição diferentes, contudo, relacionados entre si. Os dois isolados que pertencem a cada um dos 18 *clusters* pertencem à mesma grávida, estando assim não só relacionados geneticamente mas também epidemiologicamente. A grande maioria dos restantes isolados pertencentes à mesma grávida também foram classificados como geneticamente relacionados, apresentando quase sempre perfis de restrição indistinguíveis. As exceções foram a tripla de isolados GO7184U, GO7191V e GO7189U, em que os isolados GO7184U e GO7191V com serótipo II, resistentes à tetraciclina e perfis de PFGE indistinguíveis que foram agrupados no *cluster* 8, enquanto que o isolado GO7189U, pertencente à mesma grávida, de serótipo capsular Ia e resistência à tetraciclina, foi considerado não

relacionado geneticamente com os isolados anteriores. Salientamos que os isolados GO7191V (exsudado vaginal) e GO7189U (urina) tinham a mesma data de isolamento no HGO, contudo apresentaram serótipos capsulares e perfis de PFGE diferentes, o que sugere que a grávida em questão estaria colonizada com duas estirpes de *S. agalactiae* de dois serótipos diferentes.

Outra exceção foram os isolados GO10125R (exsudado rectal) e GO10126V (exsudado vaginal) pertencentes a uma mesma grávida que apresentaram serótipos capsulares, perfis de susceptibilidade aos antibióticos e perfis de PFGE diferentes, tendo sido considerados não relacionados geneticamente. Estes isolados com a mesma data de isolamento no HGO, sugerem que a grávida também poderia estar colonizada por duas estirpes de *S. agalactiae*, uma de serótipo capsular IV e sem resistência aos antibióticos testados (GO10125R) e outra de serótipo capsular V com resistência à tetraciclina (GO10126V).

Observou-se a existência de dois *clusters* maioritários, um de 11 isolados e outro de 8 isolados, dos quais resultaram 6 e 5 perfis de restrição diferentes, respectivamente. O *cluster* 17, constituído por 4 isolados, apresentou um único perfil de PFGE, existindo 100% de semelhança genética entre os quatro isolados.

Na tabela 19 encontra-se discriminada a prevalência de cada serótipo, fenótipo e genótipo de resistência e ano de isolamento por cada um dos *clusters*.

Tabela 19 – Análise dos *clusters* de PFGE no período de 2007 a 2010

| Cluster | Serótipo (nº isolados) | Fenótipo de Resistência (nº isolados) | Genótipo de Resistência (nº isolados) | Ano de isolamento (nº isolados) |
|---------|----------------------------|--|---|------------------------------------|
| 1 | Ia (10), IV (1) | TET (5), M+TET (6) | <i>mef</i> (A) (6) | 2008 (4), 2009 (5), 2010 (2) |
| 2 | Ia (4) | TET (4) | ND | 2009 (2), 2010 (2) |
| 3 | Ia (2), IV (2) | TET (4) | ND | 2008 (2), 2010 (2) |
| 4 | Ia (2), II (1) | TET (2), cMLS _B (1) | <i>erm</i> (B) (1) | 2009 (2), 2010 (1) |
| 5 | III (1), IV (1), Ia (1) | iMLS _B +TET (2), M+TET (1) | <i>erm</i> (A) (2), <i>mef</i> (A) (1) | 2008 (2), 2009 (1) |
| 6 | II (2) | TET (2) | ND | 2010 (2) |
| 7 | II (2) | TET (2) | ND | 2009 (2) |
| 8 | II (2) | TET (2) | ND | 2007 (2) |
| 9 | III (2) | TET (2) | ND | 2010 (2) |
| 10 | IV (2) | SR (2) | ND | 2010 (2) |

Tabela 19 – Análise dos *clusters* de PFGE no período de 2007 a 2010 (continuação)

| Cluster | Serótipo (n° isolados) | Fenótipo de Resistência (n° isolados) | Genótipo de Resistência (n° isolados) | Ano de isolamento (n° isolados) |
|----------------|-----------------------------------|---|--|--|
| 11 | Ia (2) | M+TET (2) | <i>mef</i> (A) (2) | 2010 (2) |
| 12 | Ia (2) | TET (2) | ND | 2008 (2) |
| 13 | V (2) | SR (2) | ND | 2009 (2) |
| 14 | V (2) | TET (2) | ND | 2008 (2) |
| 15 | III (2) | iMLS _B +TET (2) | <i>erm</i> (A) (2) | 2008 (2) |
| 16 | Ib (2) | TET (2) | ND | 2010 (2) |
| 17 | Ib (4) | TET (4) | ND | 2008 (4) |
| 18 | II (2) | TET (2) | ND | 2009 (2) |
| 19 | V (2) | SR (2) | ND | 2008 (2) |
| 20 | II (2) | TET (2) | ND | 2008 (2) |
| 21 | V (4), Ib (4) | cMLS _B + TET (3), iMLS _B +TET (1), TET (4) | <i>erm</i> (A) (1), <i>erm</i> (B) (3) | 2008 (1), 2009 (5), 2010 (2) |
| 22 | V (1), Ib (1) | cMLSB+ TET (1), iMLS _B +TET (1) | <i>erm</i> (A) (1), <i>erm</i> (B) (1) | 2009 (1), 2010 (1) |
| 23 | V (2) | SR (2) | ND | 2008 (2) |
| 24 | V (3) | cMLSB+ TET (2), TET (1) | <i>erm</i> (B) (2) | 2010 (3) |
| 25 | V (2) | TET (2) | ND | 2008 (2) |
| 26 | Ia (2) | TET (2) | ND | 2010 (2) |
| 27 | V (3) | TET (3) | ND | 2009 (3) |

Ver legenda Tabela 14. ND=Não determinado; SR=Sem resistência

Em 19 dos 27 *clusters*, os isolados apresentaram apenas um serótipo capsular assim como um único fenótipo e genótipo de resistência aos macrólidos. O *cluster* maioritário (11 isolados), *cluster* 1, apresentou uma prevalência de isolados de serótipo Ia. O *cluster* 21 (8 isolados) foi constituído pelo mesmo número de isolados de serótipo Ib e V. No *cluster* 2 dominou o serótipo capsular Ia, o qual foi detectado nos 4 isolados do grupo. O outro *cluster* (*cluster* 17) com mais de 3 isolados, apresentou como único serótipo capsular, o serótipo Ib. Os isolados que não apresentaram resistência a nenhum dos antibióticos encontram-se dispersos pelos *clusters* 10, 13, 19 e 23. O fenótipo M de resistência aos macrólidos foi detectado em isolados pertencentes aos *clusters* 1, 5 e 11 enquanto que o fenótipo iMLS_B foi identificado em isolados dos *clusters* 5, 15, 21 e 22. O fenótipo cMLS_B está presente nos *clusters* 4, 21, 22 e 24. Considerando o ano de isolamento dos isolados, verifica-se que isolados do mesmo ano encontram-se dispersos por diversos *clusters*.

Acedendo à base de dados (existente no *software BioNumerics* existente no Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT)) com imagens de perfis de PFGE de outros isolados de *S. agalactiae* de origem humana, associados à colonização da mulher grávida, foi possível gerar dendrogramas com os isolados que foram obtidos no HGO nos anos de 2004 a 2006 (Guimarães, 2008). Desta forma foi possível verificar a diversidade de perfis de PFGE entre 2004 e 2010 (ver Figura 13).

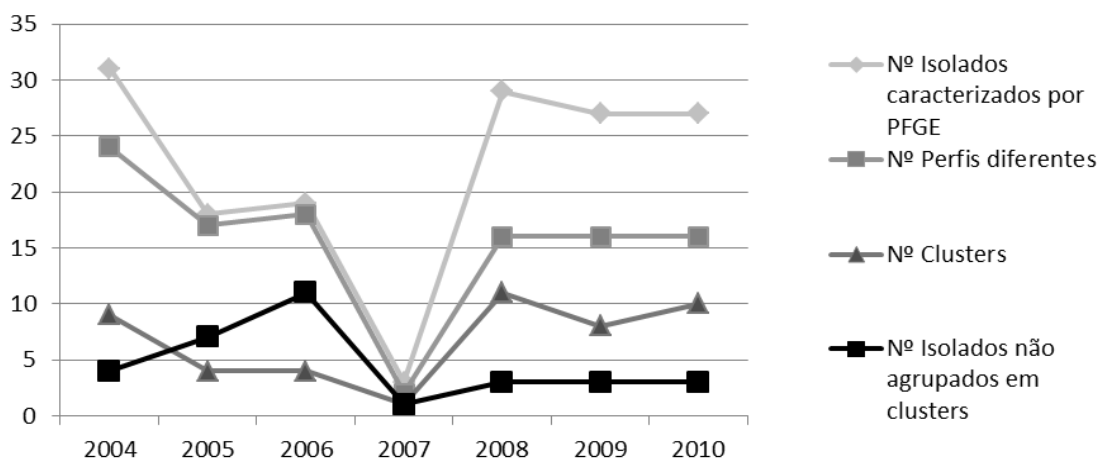


Figura 13 – Diversidade de perfis de macrorestrição de *S. agalactiae* entre 2004 e 2010. As endonucleases utilizadas foram *SmaI* ou o isóscisómero *Cfr9I*.

Verifica-se que o número de *clusters* (isolados agrupados com uma semelhança mínima de 80% entre perfis de macrorestrição) foi mais elevado no período de 2008 a 2010 (oscilando entre 8 e 11 *clusters*) comparativamente ao período de 2004 a 2006 (4 a 10 *clusters*). Em 2007, só foram caracterizados por PFGE três isolados o que pode justificar a existência apenas de um *cluster* e dois perfis de macrorestrição diferentes. Observou-se também que o número de isolados não agrupados em *clusters* foi maior nos anos de 2005 e 2006, sendo esse número inferior a 5 nos restantes anos. Considerando o número de perfis diferentes (perfis de macrorestrição com pelo menos uma banda de diferença) entre os isolados caracterizados em cada ano, observou-se em 2004 um número mais elevado (24) que nos anos seguintes (excepto 2007) em que o número de perfis diferentes não oscilou muito, estando compreendido entre 15 e 20 perfis de macrorestrição diferentes entre si. Desta forma, a diversidade de perfis foi

mais elevada em 2004 e permaneceu constante (15 a 20 perfis distintos) nos períodos de 2005 a 2006 e 2008 a 2010.

Para avaliar a diversidade dos isolados durante o período de 2004 a 2010 foi criado um dendrograma com todos os isolados caracterizados por PFGE resultantes de colonização de mulheres grávidas seguidas no Hospital Garcia de Orta. Observaram-se 109 perfis de restrição diferentes entre os 155 isolados caracterizados por PFGE e 15 dos isolados não foram agrupados em *clusters*. Os restantes isolados foram agrupados em 45 *clusters*, numerados de 1 a 45 (ver tabelas 20 e 21 e anexo II).

Tabela 20- Número de isolados e perfis de PFGE no período de 2004 a 2010

| <i>Cluster</i> | Nº isolados | Nº perfis PFGE | <i>Cluster</i> | Nº isolados | Nº perfis PFGE | <i>Cluster</i> | Nº isolados | Nº perfis PFGE |
|----------------|-------------|----------------|----------------|-------------|----------------|----------------|-------------|----------------|
| 1 | 4 | 4 | 16 | 6 | 3 | 31 | 5 | 2 |
| 2 | 2 | 1 | 17 | 6 | 3 | 32 | 2 | 1 |
| 3 | 2 | 1 | 18 | 2 | 2 | 33 | 2 | 1 |
| 4 | 3 | 2 | 19 | 4 | 3 | 34 | 2 | 1 |
| 5 | 2 | 1 | 20 | 5 | 4 | 35 | 2 | 1 |
| 6 | 2 | 1 | 21 | 4 | 2 | 36 | 3 | 2 |
| 7 | 2 | 2 | 22 | 3 | 2 | 37 | 2 | 1 |
| 8 | 3 | 2 | 23 | 3 | 3 | 38 | 2 | 2 |
| 9 | 4 | 3 | 24 | 2 | 1 | 39 | 9 | 6 |
| 10 | 3 | 3 | 25 | 4 | 3 | 40 | 2 | 2 |
| 11 | 3 | 2 | 26 | 4 | 3 | 41 | 3 | 2 |
| 12 | 2 | 1 | 27 | 3 | 3 | 42 | 2 | 1 |
| 13 | 2 | 2 | 28 | 2 | 2 | 43 | 2 | 1 |
| 14 | 2 | 1 | 29 | 2 | 2 | 44 | 2 | 1 |
| 15 | 9 | 6 | 30 | 2 | 1 | 45 | 3 | 1 |

Assim, os isolados de *S. agalactiae* foram agrupados em 23 *clusters* de dois isolados, 10 de três isolados, 6 de quatro isolados, 2 de cinco isolados, 2 de seis e 2 de nove isolados. Nos *clusters* 2, 3, 5, 6, 12, 14, 24, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 42, 43, 44, 45 observou-se um único perfil de restrição pelo que a semelhança genética entre os perfis dos isolados incluídos em cada um desses *clusters* é de 100%. Os *clusters* com maior diversidade de perfis foram o 15 e o 39, onde entre os 9 isolados que constituem cada

um dos grupos, existem 6 perfis de macrorestrição diferentes. Nos grupos 1, 10, 13, 18, 23, 27, 28, 29, 38 e 40 o número de isolados correspondem ao número de perfis de restrição diferentes.

Tabela 21- Análise dos *clusters* de PFGE no período de 2004 a 2010

| Cluster | Serótipo (n° isolados) | Fenótipo de Resistência (n° isolados) | Ano de isolamento (n° isolados) |
|----------------|------------------------------------|---|--|
| 1 | Ia (3), IV (1) | TET (4) | 2005 (2), 2006 (2) |
| 2 | II (2) | TET (2) | 2007 (2) |
| 3 | II (2) | TET (2) | 2008 (2) |
| 4 | V (1), NT (1), IV (1) | TET (2), cMLS _B +TET (1) | 2006 (3) |
| 5 | V (2) | TET (2) | 2006 (2) |
| 6 | V (2) | SR (2) | 2008 (2) |
| 7 | III (2) | TET (2) | 2005 (1), 2006 (1) |
| 8 | III (3) | TET (3) | 2005 (1), 2006 (2) |
| 9 | III (4) | TET (4) | 2004 (2), 2010 (2) |
| 10 | III (3) | TET (3) | 2004 (2), 2006 (1) |
| 11 | III (3) | TET (2), cMLS _B +TET (1) | 2004 (2), 2008 (1) |
| 12 | IV (2) | SR (2) | 2010 (2) |
| 13 | V (1), NT (1) | TET (2) | 2004 (2) |
| 14 | NT (1), III (1) | TET (1) | 2004 (2) |
| 15 | Ia (8), IV (1) | TET (6), M+TET (3) | 2004 (3), 2008 (4), 2009 (2) |
| 16 | Ia (6) | TET (6) | 2005 (1), 2006 (1), 2009 (4) |
| 17 | Ia (4), IV (2) | TET (5), M+TET (1) | 2004 (1), 2008 (2), 2010 (3) |
| 18 | Ia (2) | TET (1), M+TET (1) | 2005 (1), 2009 (1) |
| 19 | Ia (2), IV (2) | TET (4) | 2004 (2), 2010 (2) |
| 20 | NT (1), IV (1), III (2), Ia (1) | TET (3), M+TET (2) | 2005 (3), 2009 (2) |
| 21 | III (1), NT (1), IV (1), II (1) | TET (2), iMLS _B +TET (2) | 2004 (1), 2005 (2), 2008 (1) |
| 22 | Ia (2), II (1) | TET (2), cMLS _B (1) | 2009 (2), 2010 (1) |
| 23 | III (1), Ia (1), II (1) | TET (3) | 2004 (2), 2005 (1) |
| 24 | II (2) | TET (2) | 2010 (2) |
| 25 | II (4) | TET (4) | 2005 (1), 2006 (1), 2009 (2) |
| 26 | II (3), NT (1) | TET (4) | 2004 (2) |
| 27 | III (3) | iMLS _B +TET (2), cMLS _B +TET (1) | 2006 (1), 2008 (1), 2009 (1) |
| 28 | V (2) | SR (2) | 2009 (2) |
| 29 | II (1), Ib (1) | TET (2) | 2004 (1), 2006 (1) |

**Tabela 21- Análise dos *clusters* de PFGE no período de 2004 a 2010
(continuação)**

| Cluster | Serótipo (nº isolados) | Fenótipo de Resistência (nº isolados) | Ano de isolamento (nº isolados) |
|----------------|-----------------------------------|--|--|
| 30 | Ib (2) | TET (2) | 2010 (2) |
| 31 | Ib (4), NT (1) | TET (5) | 2004 (1), 2008 (4) |
| 32 | V (2) | TET (2) | 2008 (2) |
| 33 | IV (2) | TET (2) | 2004 (2) |
| 34 | III (2) | iMLS _B +TET (2) | 2008 (2) |
| 35 | II (2) | TET (2) | 2009 (2) |
| 36 | Ia (2), III (1) | M+TET (2), iMLS _B +TET (1) | 2005 (1), 2010 (2) |
| 37 | Ia (2) | TET (2) | 2008 (2) |
| 38 | Ia (1), III (1) | TET (2) | 2004 (2) |
| 39 | Ib (4), V (5) | TET (4), cMLS _B +TET (4), iMLS _B +TET (1) | 2005 (1), 2008 (1), 2009 (5), 2010 (2) |
| 40 | V (1), Ib (1) | iMLS _B +TET (1), cMLS _B +TET (1) | 2009 (1), 2010 (1) |
| 41 | V (3) | cMLS _B +TET (2), TET (1) | 2010 (3) |
| 42 | V (2) | TET (2) | 2008 (2) |
| 43 | V (2) | SR (2) | 2008 (2) |
| 44 | Ia (2) | TET (2) | 2010 (2) |
| 45 | V (3) | TET (3) | 2009 (3) |

Ver Fig.9. SR=Sem resistência. TET= resistência à tetraciclina. Os isolados considerados NT pertencem a 2004-2006

Os *clusters* majoritários foram constituídos por 9 isolados (*clusters* 15 e 39). No *cluster* 15 domina o serótipo Ia, estando presente em 8 dos 9 isolados. Neste grupo observou-se a presença de isolados de 2004 (três isolados), 2008 (quatro isolados) e 2009 (dois isolados) e que três desses isolados apresentam fenótipo de resistência M+TET (resistência à eritromicina e tetraciclina), enquanto que os restantes isolados apresentaram apenas resistência à tetraciclina. No *cluster* 39 (constituído por quatro isolados de serótipo capsular Ib e cinco de serótipo V). A resistência aos antimicrobianos em isolados deste *cluster* não é uniforme, existindo quatro isolados de fenótipo cMLS_B+TET, quatro isolados que possuem apenas resistência à tetraciclina e um isolado de fenótipo iMLS_B+TET. Os isolados deste *cluster* pertencem aos anos 2005 (um isolado), 2008 (um), 2009 (cinco) e 2010 (dois). O *cluster* 16, composto por seis

isolados de serótipo Ia resistentes apenas à tetraciclina. Estes isolados foram obtidos em 2005 (um isolado), 2006 (um) e 2009 (quatro).

Verificou-se 100% de semelhança entre os isolados GO138 de 2005, GO355 de 2006 e o isolado GO9063V do ano 2009, todos com serótipo capsular Ia e resistência à tetraciclina. No mesmo *cluster* (*cluster* 16) onde foram agrupados os isolados GO138, GO355 e GO9063V, observou-se que os restantes isolados também apresentaram o mesmo serótipo capsular e fenótipo de resistência aos antimicrobianos. Os *clusters* 7, 8, 9 e 10 foram constituídos apenas por isolados de serótipo capsular III com resistência apenas à tetraciclina. Como é possível verificar, a dispersão de cada serótipo pelos diversos *clusters* é grande, assim como a resistência aos antimicrobianos.

Os isolados que se revelaram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados encontram-se dispersos pelos *clusters* 6, 12, 28 e 43. Os isolados que apresentaram resistência à eritromicina (fenótipo M) encontram-se dispersos pelos *clusters* 15, 17, 18, 20 e 36 enquanto que os isolados que apresentam resistência constitutiva à eritromicina e clindamicina (fenótipo cMLS_B) estão presentes nos grupos 4, 11, 22, 27, 39, 40 e 41. Os isolados de fenótipo iMLS_B encontram-se nos grupos 21, 27, 34, 36, 39 e 40. Observou-se que isolados do mesmo ano se encontram dispersos por vários *clusters*.

Foram gerados dendrogramas com os isolados que apresentaram resistência à eritromicina e/ou clindamicina no período de 2004 a 2006 (ver Figura 14). Os perfis destes isolados, seleccionados no âmbito deste trabalho estão também incluídos na base de dados de *S. agalactiae* existente no ICAT, tendo sido caracterizados por Guimarães (2008). O dendrograma com os isolados resistentes à eritromicina nos anos 2007-2010 encontra-se na figura 15.

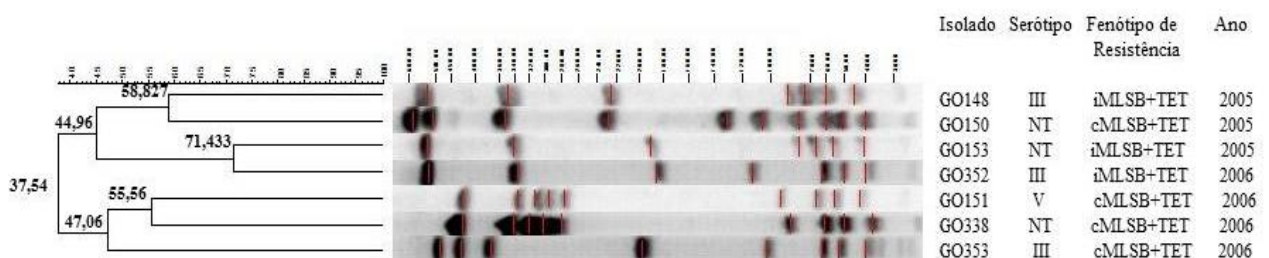


Figura 14 – Dendrograma representativo de isolados de *S. agalactiae* resistentes à eritromicina e/ou clindamicina recolhidos no período de 2004 a 2006, no HGO.

Considerando apenas os isolados presentes na base de dados, no ano 2004 não foram detectados isolados com resistência à eritromicina e/ou clindamicina e, no período de 2005 a 2006 a resistência à eritromicina não foi considerada associada a mecanismos de efluxo uma vez que não foi detectado o fenótipo M entre os isolados que foram caracterizados nesse período (Guimarães, 2008). A semelhança entre os perfis de restrição desses isolados é inferior a 80%, razão pela qual não existem isolados agrupados em *clusters*.

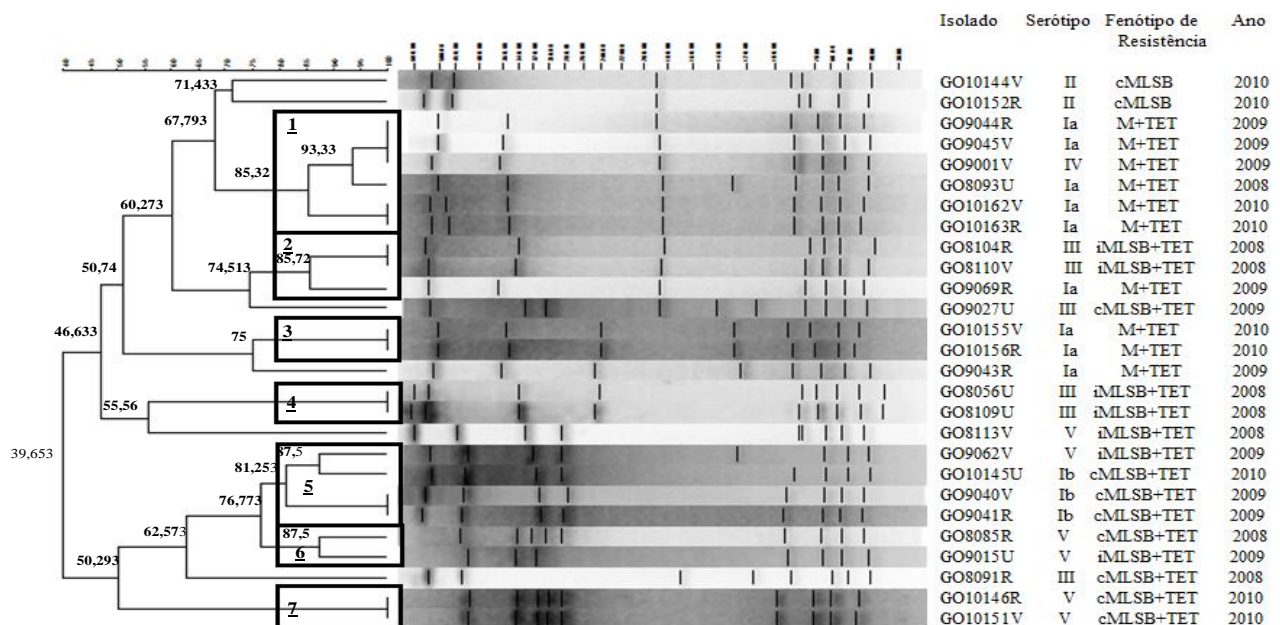


Figura 15 – Dendrograma representativo de isolados de *S. agalactiae* resistentes à eritromicina e/ou clindamicina recolhidos no período de 2007 a 2010, no HGO.

Entre os isolados caracterizados em 2007 não se observou resistência à eritromicina e/ou clindamicina. No período de 2008 a 2010, verificou-se que os isolados resistentes a estes antimicrobianos foram agrupados em sete *clusters*, um de seis isolados, um de quatro, um de três e quatro de dois, sendo que três dos *clusters* de dois, são constituídos por isolados com perfis de restrição com 100% de semelhança (*clusters* 3,4 e 7) e com o mesmo fenótipo de resistência. Os isolados destes grupos estão relacionados geneticamente e epidemiologicamente. O isolado GO9001V apresenta 100% de semelhança com os perfis GO9044R e GO9045V (pertencentes à mesma

grávida), tendo-se observado também uma semelhança de 100% entre os isolados GO8104R e GO8110V. Quatro dos isolados não foram agrupados em *clusters* e, observou-se a presença de 19 perfis de restrição diferentes. O *cluster* 1 é composto por seis isolados de fenótipo M+TET em que cinco isolados apresentam serótipo Ia. O *cluster* 5 é composto por quatro isolados em que três dos quais apresentam serótipo Ib e fenótipo iMLS_B.

IV-DISSCUSSÃO E CONCLUSÃO

S. agalactiae é, actualmente, responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade na grávida e no recém-nascido (Beitune *et al.*, 2005). Um dos principais factores de risco ao desenvolvimento de infecção neonatal é a colonização vaginal e/ou rectal da mulher grávida com *Streptococcus agalactiae* (CDC, 2010). Este microrganismo é também responsável por graves problemas de saúde na mulher grávida, adultos e mulheres não grávidas, contudo, a incidência de infecções por *S. agalactiae* é maior em recém-nascidos (CDC, 2010; Melin *et al.*, 2011). Este facto implica a necessidade de uma maior vigilância epidemiológica de forma a permitir acções preventivas adequadas (Neto, 2008), procurando reduzir, consequentemente, a taxa de transmissão vertical e complicações subsequentes.

Neste trabalho foi nosso objectivo conhecer a prevalência de colonização vaginal da mulher grávida, assim como a distribuição dos serótipos e a resistência aos antimicrobianos de isolados provenientes de colonização dos tratos genitourinário e gastrointestinal da mulher grávida, obtidos no HGO entre 2007 e 2010. Pretendeu-se também verificar a existência de associações entre todas as características anteriormente referidas e avaliar a diversidade genética entre os isolados caracterizados por PFGE.

No presente trabalho, com base no estudo de isolados provenientes do HGO observou-se uma percentagem de colonização vaginal da mulher grávida (2007 a 2010) de 12%, sendo este um dos valores mais baixos obtidos no nosso país. Com efeito, no Hospital Distrital de Santarém essa percentagem foi de 21.1% (Rodrigues, 2009), no Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga foi 19.7% (Araújo, 2010), no Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro (Pinheiro, 2009) e no Hospital Fernando da Fonseca (Mendinhos *et al.*, 2006, citado por Areal *et al.*, 2010) essa percentagem foi de 18%, alcançando os 34.9% no Hospital de São Marcos, em Braga (Areal *et al.*, 2010).

Considerando que as metodologias usadas nas várias instituições podem ser diferentes, em particular no tipo de colheita (apenas exsudado vaginal *versus* exsudado vaginal e rectal) podem limitar a comparação dos valores da frequência de colonização da mulher grávida, em Portugal e outros Países. No entanto, tendo em conta os estudos

acima referidos, observa-se um valor mínimo de 12% e um máximo de 34.9% de colonização da mulher grávida referente a Portugal. Esta variação parece estar concordante com a literatura referente à Europa em que está descrita uma percentagem de colonização de 8% em França (Mee-Marquet *et al.*, 2009), 29.3% na República Checa (Motlová *et al.*, 2004), 33 a 38% na Dinamarca (Hansen *et al.*, 2004), ou compreendida entre 10 e 37% em diversos Países europeus (Melin, 2011; El Aila *et al.*, 2010; El Helali *et al.*, 2009; Brimil *et al.*, 2005).

Embora muito pouco se conheça sobre os factores específicos da bactéria e do hospedeiro que determinam a colonização por *S. agalactiae* (Manning *et al.*, 2008), estas variações geográficas podem ser, em parte, justificadas por factores como a imunidade do hospedeiro, a presença de doenças sexualmente transmissíveis e a nutrição (Jahromi *et al.*, 2008), factores estes que acabam por estar relacionados com factores culturais de cada região. A obrigatoriedade do rastreio às 35-37 semanas de gestação com colheita dos exsudados vaginal e rectal, não só a nível nacional mas também internacional, permitiria um conhecimento mais real da prevalência da colonização da mulher grávida em todo o mundo, assim como, uma melhor racionalização do uso de antibióticos intraparto.

Os polissacáridos capsulares constituem um mecanismo de virulência de *S. agalactiae* e são o principal alvo dos anticorpos produzidos pelo sistema imunitário do hospedeiro (Martins *et al.*, 2010), assim como das vacinas glicoconjugadas (Ramaswamy *et al.*, 2006). Está descrito para a Europa Ocidental, EUA e Australásia que os serótipos mais detectados são os serótipos Ia, II, III e V (Florindo *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2008) Tal como se verificou em outros estudos efectuados a nível nacional realizados com estirpes obtidas entre 2004 e 2010 (Guimarães, 2008; Rodrigues, 2009; Martins *et al.*, 2007; Florindo *et al.*, 2010), também no presente estudo, a prevalência destes serótipos foi elevada, com predomínio do serótipo Ia [Ia (24.3%), II (15.3%), III (15.3%) e V (20.1%)], contudo, tal como se observou no estudo efectuado por Rodrigues (2009), também o serótipo IV foi detectado com frequência (16%) no nosso estudo, e, considerando a globalidade dos quatro anos, o serótipo IV (16%) revelou-se mais prevalente que os serótipos II e III (15.3% cada). Os serótipos Ib e VI

apresentaram prevalências inferiores a 10%. A elevada prevalência de isolados de serótipo capsular IV detectados neste estudo, contraria a baixa prevalência deste serótipo na Europa e EUA (Uh *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2008; Brimil *et al.*, 2005). Embora a prevalência de isolados de serótipo II tenha sido crescente e o serótipo IV pareça estar a emergir em Portugal, mais estudos serão necessários para comprovar se estamos realmente perante uma tendência para que estes serótipos sejam mais prevalentes na população portuguesa, entre estudos de serotipagem, resistência a antimicrobianos e pesquisa de factores de virulência.

Aliada à variação temporal, também a região geográfica parece contribuir para a variação na prevalência de cada serótipo em todo o mundo, como acontece por exemplo com a elevada prevalência do serótipo V em Inglaterra, País de Gales e EUA, contrariamente à baixa prevalência detectada na África do Sul, Malawi (Madzivhandila *et al.*, 2011). Embora se desconheçam as razões que estão na origem destas variações na prevalência dos serótipos, pensa-se que fenómenos de transferência horizontal de genes e recombinação entre serótipos de *S. agalactiae* podem justificar a diversidade estrutural existente entre os polissacáridos (Cieslewicz *et al.*, 2005). Entre os serótipos mais associados a infecção neonatal encontram-se os serótipos Ia, III e V (Gherardi *et al.*, 2007). Em Portugal, observou-se que os serótipos Ia e III apresentam um elevado potencial invasivo, nomeadamente as linhagens ST23 e ST24 (ST, Sequência Tipo) de serótipo Ia e a linhagem ST17 de serótipo III, enquanto que a linhagem ST19 de serótipo III está mais associada a colonização (Martins *et al.*, 2007). Estes resultados são concordantes com outros estudos (Bisharat *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2003), embora a linhagem ST23 esteja associada quer a colonização quer a infecção (Jones *et al.*, 2003). No mesmo estudo de Martins e colegas (2007), em Portugal, foi ainda possível concluir que as linhagens ST23 e ST24 de serótipo Ia apresentam maior potencial invasivo para causar DNP, enquanto que a linhagem ST17 de serótipo III apresenta capacidade de causar DNP e DNT (Martins *et al.*, 2007). O facto de duas linhagens diferentes do mesmo serótipo capsular, uma estar mais associada a colonização e outra a infecção, levanta a hipótese do potencial invasivo não estar directamente associado ao serótipo capsular (Bisharat *et al.*, 2005). Contudo, o potencial de virulência de cada serótipo é discutível uma vez que depende da região geográfica, como se observa, por

exemplo com o serótipo Ia, que é menos virulento que o serótipo III na África do Sul, Taiwan e Holanda e, mais invasivo em Portugal, Israel e Suécia. Os serótipos Ib, II e V também apresentam um potencial invasivo inferior ao descrito para o serótipo III (Madzivhandila *et al.*, 2011). No Japão (Murayama *et al.*, 2009), na África do Sul (Madzivhandila *et al.*, 2011) e França (Poyart *et al.*, 2008) o serótipo III foi o mais detectado em isolados causadores de DNP e DNT, o que vai de encontro aos resultados obtidos em estudos efectuados em Portugal por Martins e colaboradores (2007). Vários estudos seriam interessantes de realizar com os isolados incluídos neste estudo, como por exemplo, a determinação das suas sequências tipo, procurar saber a percentagem de recém-nascidos colonizados e infectados (DNP ou DNT) (filhos das mulheres grávidas incluídas no estudo) de forma a verificar a percentagem de transmissão vertical e o potencial invasivo de cada serótipo para causar DNP e DNT, nomeadamente para o serótipo IV que parece começar a emergir em Portugal.

No presente estudo obteve-se uma percentagem de 2.8% de isolados não serotipáveis, valor muito semelhante ao obtido por Rodrigues (2009) na região de Santarém (1.75%), percentagens bastante inferiores à detectada por Martins e colaboradores (2009) (14.1%), o que está de acordo com Margarit e colegas (2009) que referem uma percentagem de isolados NT de 8-14% para a Europa e EUA (Margarit *et al.*, 2009). No presente estudo, todos os isolados NT foram tipados por PCR e sequenciação do *locus cps* D-E-F. A discrepância detectada em dois isolados entre o método de serotipagem por aglutinação e a genotipagem por PCR e sequenciação pode dever-se a erros associados à execução da serotipagem convencional assim como à inexperiência do observador. Embora a base genética do fenótipo NT não seja conhecida (Ramaswamy *et al.*, 2006), o défice na produção de polissacáridos capsulares, a variação na expressão dos genes que codificam para a produção dos polissacáridos (Martins *et al.*, 2007) assim como a existência de mutações ou a inserção de elementos genéticos móveis no *locus cps* de *S. agalactiae* de origem humana ou bovina são explicações possíveis para a ausência de reacção com os anti-soros disponíveis (Martins *et al.*, 2010; Rato *et al.*, 2012).

Apesar da antibioprofilaxia intraparto ser a medida preventiva recomendada pelo CDC, existem limitações associadas à sua utilização, tais como a possibilidade do aumento da resistência aos antibióticos, não só pelo microrganismo que se pretende combater mas também por parte das bactérias comensais que habitam o organismo humano. Uma outra desvantagem associada a esta medida preventiva é a dos efeitos secundários inerentes à toma dos antibióticos, assim como o facto de não prevenir DNT (Melin, 2011; Kasper *et al.*, 1996).

O desenvolvimento de uma vacina glicoconjugada permitirá ultrapassar as limitações associadas à antibioprofilaxia intraparto. Assim, encontra-se em desenvolvimento uma vacina conjugada multivalente proteína-polissacárido capsulares para a prevenção da DNP, em que os serótipos considerados são o Ia, Ib, II, III e V (Brimil *et al.*, 2005). Uma vacina com estes serótipos seria eficaz na população caracterizada no presente estudo, uma vez que cobriria mais de 80% dos isolados. Contudo, se fosse considerada apenas a população de *S. agalactiae* neste estudo, a substituição do serótipo Ib pelo serótipo IV seria mais adequada, pois permitiria cobrir 91% dos isolados estudados. A utilização de proteínas conservadas entre estirpes de *S. agalactiae* na construção de uma vacina parece uma alternativa promissora, como por exemplo as proteínas dos pili de *S. agalactiae*, dado se pensar estarem conservadas entre estirpes e se ter observado que podem apresentar pelo menos uma das três ilhas cromossómicas (PI-1, PI-2a e PI-2b) que codificam para as proteínas dos pili (*Backbone Protein* (BP) e *Ancillary Protein* (AP) 1 e 2) (Margarit *et al.*, 2009), mais estudos são necessários para corroborar estas observações.

Antes de se proceder à administração de antibióticos, independentemente da circunstância, deve ser conhecida *à priori*, sempre que possível, a susceptibilidade do microrganismo ao antimicrobiano para desta forma se poderem aplicar medidas preventivas e/ou terapêuticas adequadas. A resistência de *S. agalactiae* aos antimicrobianos encontra-se descrita em vários estudos, sendo de 7 a 25% para a eritromicina e de 3 a 15% para a clindamicina (Motlová *et al.*, 2004). No presente estudo as percentagens de resistência à eritromicina e à clindamicina no ano 2007 foram de 0%, contudo é de salientar que apenas 22 isolados foram caracterizados, o que pode justificar a ausência de isolados com resistência a estes antimicrobianos. Nos restantes

anos as percentagens de resistência mantiveram-se concordantes com o descrito na literatura. Assim, considerando a globalidade dos quatro anos de estudo, observou-se que 14.6% dos isolados apresentaram resistência à eritromicina e 9.7% à clindamicina. Considerando os resultados obtidos no nosso estudo, assim como os de outros estudos efectuados em Portugal, observa-se que a resistência à eritromicina e à clindamicina apresentam variações, oscilando, por exemplo entre 8.3 e 22.9% (Guimarães, 2008; Araújo, 2010; Florindo *et al.*, 2010; Rodrigues, 2009; Pinheiro, 2009). Embora a resistência aos macrólidos e lincosamidas esteja disseminada pelo mundo inteiro, existem ainda regiões onde a resistência de *S. agalactiae* a estes antibióticos é pouco frequente, como acontece na Australásia (Zhao *et al.*, 2008) e na República Checa (Motlová *et al.*, 2004) onde se detectou uma percentagem de resistência à eritromicina e clindamicina de 3.8% e 3.2 %, respectivamente. O oposto acontece na Coreia do Sul em que a percentagem de isolados resistentes à eritromicina e à clindamicina é superior a 30% (Uh *et al.*, 2005).

A resistência à eritromicina e à clindamicina tem sido associada a determinados serótipos capsulares, nomeadamente o serótipo V (Beitune *et al.*, 2005; Brzychczy-Wtoch *et al.*, 2010; Farley, 2001), contudo, no presente estudo, o serótipo mais frequentemente associado a resistência à eritromicina foi o serótipo Ia tendo todos os isolados apresentado mecanismo de efluxo da eritromicina pelas proteínas Mef (A), seguido dos serótipos III e V (3.47% cada). Contudo, o serótipo Ib também foi detectado em isolados com resistência a estes antimicrobianos e, no ano 2010 o serótipo II foi o serótipo mais prevalente entre os isolados com resistência à eritromicina e/ou clindamicina. Estes resultados são preocupantes uma vez que os serótipos Ia e III foram dos serótipos mais prevalentes durante este estudo, não menosprezando o carácter invasivo que tem sido descrito para estes serótipos. Também noutros estudos efectuados em Portugal se verificou que o serótipo III (Florindo *et al.*, 2010; Guimarães, 2008) e V (Rodrigues, 2009; Guimarães, 2008) estiveram associados à resistência à eritromicina, assim como o serótipo II (Guimarães, 2008). Os estudos acima mencionados, sugerem que a resistência à eritromicina e clindamicina em Portugal está associada não só ao serótipo V, mas também aos serótipos III, Ia e II.

Tal como a percentagem de resistência aos antimicrobianos e a prevalência de cada serótipo pelo mundo, também a frequência dos fenótipos de resistência aos macrólidos é variável. Contudo, o fenótipo cMLSB tem sido o mais frequentemente detectado, tal como se verificou no Brasil (Palmeiro *et al.*, 2010), Taiwan (Wang *et al.*, 2010), República Checa (Motlová *et al.*, 2004), Itália (Gherardi *et al.*, 2007) e Portugal (Araújo, 2010; Florindo *et al.*, 2010; Pinheiro, 2009). No presente estudo, não foi encontrado nenhum fenótipo de resistência à eritromicina dominante, existindo apenas uma diferença máxima de 2 isolados entre os fenótipos de resistência. Contrariamente ao observado em outros estudos, o fenótipo M apresentou percentagens bastante próximas aos outros fenótipos de resistência aos macrólidos. Estudos futuros de prevalência dos fenótipos de resistência aos macrólidos, dirão se este aumento de isolados de *S. agalactiae* com fenótipo M é pontual ou se será acentuado ao longo do tempo. No presente estudo, este aumento é acompanhado também pela elevada prevalência do serótipo capsular Ia e pela presença do gene *mef(A)*. Tem sido descrita a presença de genes *mef* em estirpes bacterianas que colonizam o trato intestinal e, sendo este o principal reservatório e fonte de colonização vaginal com *S. agalactiae*, as bactérias comensais de outras espécies, tais como *Enterococcus spp.*, *Streptococcus viridans*, podem servir de reservatório e dadores destes genes para *S. agalactiae*, sendo uma justificação possível para o aumento gradual do fenótipo M ao longo dos anos. Outra situação pode estar relacionada com a transferência horizontal de genes, como por exemplo, o gene *mef(A)* que pode estar integrado no transposão Tn1207.3 que apresenta mais de 99% de semelhança com o fragmento correspondente ao Tn1207.3 detectado em *S. pyogenes* (Marimón *et al.*, 2005). Num estudo efectuado em Itália, com *Streptococcus pyogenes*, verificou-se que o gene *mef(A)* estava inserido em elementos genéticos móveis diferentes consoante as estirpes eram ou não resistentes à tetraciclina, pelo que os isolados que apresentaram resistência à tetraciclina, apresentaram o gene *mef(A)* no elemento genético *tet(O)-mef(A)* enquanto que as estirpes susceptíveis à tetraciclina apresentaram o gene *mef(A)* integrado no transposão Tn1207.1 (idêntico ao detectado em *S. pneumoniae*), inserido no Tn1207.3 identificado em *S. pyogenes* ou no elemento quimérico de 58.8Kb (ϕ 10394.4) (Brenciani *et al.*, 2004). Por este motivo, seria interessante pesquisar a presença de elementos genéticos móveis associados à resistência simultânea à tetraciclina e eritromicina por meio das proteínas Mef(A), uma

vez que em *S. agalactiae* a principal associação descrita entre os genes de resistência aos macrólidos e à tetraciclina é entre os genes *erm(B)* e *tet(M)* (Culebras *et al.*, 2002).

O gene *erm(B)* tem sido o principal determinante genético detectado em isolados resistentes à eritromicina, o que se observou em estudos efectuados na Coreia do Sul (Uh *et al.*, 2005), no Japão (Murayama *et al.*, 2009), em Itália (Gherardi *et al.*, 2007), no Brasil (Palmeiro *et al.*, 2010) e em Portugal (Florindo *et al.*, 2010; Pinheiro, 2009). Tal não se verificou, por exemplo, em estudos efectuados no Canadá (de Azavedo *et al.*, 2001) e em França (Poyart *et al.*, 2008), nos quais os determinantes genéticos encontrados como responsáveis pela resistência à eritromicina foram os genes *erm(A)* [*erm(TR)*] e *mef(A)*, respectivamente. Contudo, é necessário não esquecer que a mesma estirpe pode adquirir mais do que um determinante genético que lhe confira resistência, como observado num estudo efectuado em Madrid por Culebras e colaboradores (2002), os quais encontraram 44.5% dos isolados com mais do que um gene de resistência aos macrólidos (Culebras *et al.*, 2002). No presente estudo, cada isolado apresentou apenas um dos três genes pesquisados para resistência aos macrólidos. Observou-se que todos os isolados de fenótipo M, cMLS_B e iMLS_B apresentaram os genes *mef(A)*, *erm(B)* e *erm(A)* [*erm(TR)*], respectivamente. Assim, considerando o facto de não se ter encontrado nenhum fenótipo de resistência dominante, também não se detectou a predominância de um único determinante genético de resistência aos macrólidos.

A resistência à tetraciclina em *S. agalactiae* tem-se revelado bastante elevada, superior a 80% em muitas regiões do mundo, chegando mesmo a atingir valores de 96% como se verificou na Coreia do Sul (Uh *et al.*, 2005) e na França (Poyart *et al.*, 2008) enquanto que noutras regiões como a Itália (Gherardi *et al.*, 2007) a resistência embora elevada é um pouco mais baixa (68.1%). No presente estudo a resistência à tetraciclina foi também elevada independentemente do ano, estando compreendida entre 78.9% e 93.1%. Considerando a totalidade dos quatro anos, a percentagem de isolados que apresentaram resistência a este antimicrobiano foi de 86.8%, com predomínio de isolados de serótipo capsular Ia (22.9%), sendo também o serótipo com maior prevalência de resistência aos macrólidos. Noutros estudos efectuados em Portugal, a percentagem de resistência à tetraciclina não apresenta grandes variações, com valores

de 82.4 % (Guimarães, 2008) e 80% (Rodrigues, 2009). O determinante genético mais prevalente entre as bactérias de coloração gram positiva que apresentam resistência à tetraciclina é o *tet(M)*, embora os genes *tet(O)*, *tet(K)* e *tet(L)* também possam estar a ela associada (Culebras *et al.*, 2002). Está descrita uma associação entre os genes *erm(B)* e *tet(M)* (Culebras *et al.*, 2002), podendo estes genes estar inseridos no mesmo transposão conferindo desta forma resistência simultânea à eritromicina e tetraciclina. No presente estudo, apenas dois dos isolados com resistência à eritromicina não apresentaram resistência à tetraciclina. A elevada resistência a este antimicrobiano não deve ser causada pelo consumo uma vez que não é utilizado como medida preventiva nem terapêutica e/ou profiláctica (CDC, 2010).

Considerando as características estudadas por isolado, procurou-se verificar a existência de associação entre elas. Assim, de acordo com os resultados obtidos, conclui-se que, apenas para os isolados caracterizados no presente estudo, existe uma associação entre o serótipo capsular Ia, o fenótipo M e a presença do gene *mef(A)*, não tendo sido detectado o serótipo capsular Ia em nenhum dos restantes fenótipos de resistência aos macrólidos. Esta associação foi constante em todo o estudo, com excepção do ano 2007, em que não foram detectados isolados resistentes à eritromicina e/ou clindamicina. Não foi possível determinar outras associações devido à dispersão dos restantes serótipos capsulares pelos fenótipos de resistência aos macrólidos. Contudo, observou-se uma associação entre os fenótipos M, cMLS_B e iMLS_B e os genes *mef(A)*, *erm(B)* e *erm(A)* [*erm(TR)*], respectivamente. No estudo efectuado por Guimarães (2008), também com estirpes isoladas em Portugal, embora não se tenha observado uma correlação constante ao longo do estudo, considerando a globalidade dos anos estudados, a autora sugere a existência de uma associação entre o fenótipo iMLS_B e o serótipo capsular III e o fenótipo cMLS_B e os tipos capsulares II e III. Tendo sido apenas detectado um isolado de fenótipo M, não foi possível estabelecer associações entre este fenótipo e os serótipos capsulares.

No presente estudo, mediante análise dos dendrogramas gerados com os perfis de PFGE, verificou-se que praticamente todos os isolados provenientes da mesma

grávida foram classificados como geneticamente relacionados, apresentando o mesmo serótipo capsular e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Contudo, ocorreram duas exceções em que tudo parece indicar que as duas grávidas em questão estivessem colonizadas com mais do que uma estirpe de *S. agalactiae*. Uma dessas situações foi a tripla de isolados GO7184U, GO7191V e GO7189U, em que os isolados GO7184U e GO7191V apresentaram serótipo II, resistência à tetraciclina e perfis de PFGE indistinguíveis, agrupados no *cluster* 8, enquanto que o isolado GO7189U, pertencente à mesma grávida, de serótipo capsular Ia e resistência à tetraciclina, foi considerado não relacionado geneticamente com os isolados anteriores. É ainda necessário referenciar que os isolados GO7191V (exsudado vaginal) e GO7189U (urina) têm a mesma data de isolamento no HGO, contudo apresentam serótipos capsulares e perfis de PFGE diferentes, o que sugere que a grávida em questão provavelmente apresentava colonização vaginal por duas estirpes de *S. agalactiae* diferentes. A outra exceção relaciona-se com os isolados GO10125R (exsudado rectal) e GO10126V (exsudado vaginal) pertencentes a outra grávida e que apresentaram serótipos capsulares, perfis de susceptibilidade aos antibióticos e perfis de PFGE diferentes, tendo sido considerados não relacionados geneticamente, o que é sugestivo de que a grávida em questão também se apresentava colonizada por duas estirpes de *S. agalactiae*, uma no trato gastrointestinal e outra no trato genitourinário. O facto do aparelho gastrointestinal ser a principal fonte de colonização vaginal e o facto de uma estirpe ter sido isolada no exsudado rectal e outra no exsudado vaginal parece sugerir que a estirpe vaginal possa ter sido adquirida por outra via, como por exemplo, por via sexual. Desta forma, verifica-se que a mesma grávida pode apresentar diferentes estirpes de *S. agalactiae* no trato gastrointestinal e no trato genitourinário, assim como também pode apresentar duas estirpes diferentes por exemplo, no trato genitourinário, como se verificou no presente estudo.

Dos 179 isolados caracterizados nesse estudo, 86 foram caracterizados por PFGE (48%). Foram gerados dendrogramas no *software BioNumerics* utilizando uma optimização de 0% e uma tolerância de 1.5% e um *cut-off* de semelhança de 80% para avaliar a clonalidade dos isolados. Os 86 isolados foram agrupados em 27 *clusters* compostos por um número mínimo de dois isolados, tendo-se verificado a existência de 50 perfis de PFGE diferentes (que apresentam pelo menos uma banda de diferença entre

si). Em 19 dos 27 *clusters* os isolados apresentaram um único serótipo capsular assim um único fenótipo e genótipo de resistência. Apesar de o *cluster* maioritário, apresentar predomínio de isolados de serótipo capsular Ia, este serótipo encontra-se disperso por muitos outros *clusters*, não havendo por isso associação entre o serótipo Ia com nenhum *cluster*, tendo o mesmo sido verificado para os restantes serótipos capsulares. Estes dados sugerem que a população de *S. agalactiae* caracterizada neste estudo é bastante heterogénea, tal como já se tinha verificado em outros estudos efectuados em Portugal [Guimarães (2008), Rodrigues (2009)]. Em Espanha, num período de 18 anos (1992-2009) observou-se que apesar de ter sido detectado um largo número de linhagens distintas, os autores concluíram que a população de *S. agalactiae* responsável por infecção neonatal precoce ao longo do tempo era uma população clonal estável (Martins *et al.*, 2011). No presente estudo, do ponto de vista da resistência à eritromicina e/ou clindamicina, verificou-se também uma grande dispersão dos isolados com estas características, independentemente do fenótipo de resistência apresentado, o mesmo aconteceu quando se analisou a dispersão dos isolados de acordo com o ano de isolamento, o que permite afirmar que, de acordo com os perfis de PFGE, a população de *S. agalactiae* caracterizada é bastante heterogénea e, no que diz respeito à resistência à eritromicina e/ou clindamicina é possível afirmar que a sua disseminação tem origem multiclonal e não na propagação de um único clone, tal como aconteceu por exemplo em Espanha (Culebras *et al.*, 2002). Considerando os isolados provenientes do HGO (2004-2006) caracterizados por Guimarães (2008), foi criado um dendrograma total, que permitiu avaliar a clonalidade dos isolados de *S. agalactiae* obtidos no HGO entre 2004 e 2010. Os 155 isolados foram agrupados em 45 *clusters*, tendo-se observado a presença de 109 perfis de PFGE distintos. Tal como no presente estudo (2007 a 2010), a dispersão de cada serótipo pelos diversos *clusters* foi grande, assim como a resistência aos antimicrobianos.

Mediante análise dos dendrogramas dos isolados de resistência aos macrólidos de 2004 a 2006 e de 2007 a 2010, obtidos no HGO, verificou-se que no período de 2004-2006 os isolados não foram classificados como geneticamente relacionados, enquanto que no período de 2007-2010, detectaram-se 7 *clusters*, um deles maioritário constituído por 6 isolados de fenótipo M+TET. A presença destes 7 *clusters* entre os 21 isolados detectados como resistentes à eritromicina (2007-2010) e, o facto de os

isolados com resistência aos macrólidos no período de 2004 a 2006 não serem agrupados em nenhum *cluster* permite concluir que a resistência aos macrólidos na população estudada não é derivada da disseminação de um único clone, mas sim resultado de disseminação multiclonal de *S.agalactiae*.

Em conclusão, o desenvolvimento de estudos epidemiológicos longitudinais constitui uma ferramenta indispensável para o conhecimento das estirpes de *S. agalactiae* dispersas em Portugal e no resto do mundo. É com base neste tipo de estudos que é possível analisar a evolução das prevalências de cada serótipo, a resistência aos diversos antimicrobianos e a diversidade genética entre os isolados de *S. agalactiae*. A análise conjunta destes estudos permitirá inferir sobre qual a melhor estratégia a seguir para o desenvolvimento de uma vacina eficaz e adequada à variabilidade populacional de *Streptococcus agalactiae*.

Relativamente ao presente estudo, foi possível concluir que os serótipos mais prevalentemente detectados foram os serótipos Ia (24.3%), II (15.3%), III (15.3%), IV (16%) e V (20.1%), embora o serótipo IV não tenha sido frequentemente associado a colonização na Europa. Entre os isolados de *S. agalactiae* caracterizados, detectou-se uma percentagem de isolados resistentes à eritromicina, clindamicina e tetraciclina de 14.6%, 9.7% e 86.8%, respectivamente. O serótipo mais frequentemente associado à resistência à eritromicina foi o serótipo Ia, tendo-se verificado uma associação entre este serótipo, o fenótipo M e o gene de resistência *mef(A)*. Contudo, não se encontrou nenhum fenótipo de resistência à eritromicina dominante. A análise por PFGE permitiu concluir que a população de *S. agalactiae* caracterizada neste estudo é heterogénea e que a resistência aos macrólidos não é causada pela disseminação de um único clone. O acesso à base de dados existente no *software BioNumerics* (existente no ICAT), que contém perfis de PFGE e outras informações relativas a isolados de *S agalactiae* de origem humana e bovina, revelou-se uma mais valia pois permitiu que fosse efectuada uma análise abrangendo isolados obtidos no HGO entre 2004 e 2010, permitindo reforçar os nossos resultados.

V-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABARZÚA C., F.; GUZMÁN, A.M.; BELMAR, C.; BECKER, J.; GARCÍA, P.; RIOSECO, A.; OYARZÚN, E.; 2002; Prevalencia de Colonización por *Streptococcus agalactiae* (Grupo B) en el tercer trimestre del embarazo. Evaluación del Cultivo Selectivo. Experiencia en 2192 Pacientes; *Rev Chil Obstet Ginecol* **67**(2):89-93
2. ADDERSON, E.E.; TAKAHASHI, S.; BOHNSACK, J.F.; 2000; Bacterial Genetics and Human Immunity to Group B Streptococci; *Molecular Genetics and Metabolism* **71**:451-454
3. ALMEIDA, A.; AGRO, J.; FERREIRA, L.; Estreptococo β Hemolítico do grupo B: Protocolo de Rastreamento e Prevenção de doença Perinatal [WWW]. Consensos Nacionais de Neonatologia (2004), Sociedade Portuguesa de Perinatologia. Disponível em http://www.spp.pt/UserFiles/File/Consensos_Nacionais_Neonatologia_2004/Estreptococo_Hemolitico_GrupoB.pdf. Consultado a 30/08/2012
4. AMIN, A.; ABDULRAZZAQ, Y.M.; UDUMAN, S.; 2002; Group B Streptococcal Serotype Distribution of Isolates from Colonized Pregnant Women at the time of delivery in United Arab Emirates; *Journal of Infection* **45**:42-46
5. ARAÚJO, M.J.O.; 2010; Perfil de susceptibilidade do *Streptococcus agalactiae* a antimicrobianos. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Universidade de Aveiro
6. AREAL, A.; NUNES, S.; MOREIRA, M.; FAUSTINO, M.A.; CARDOSO, L.; SÁ, C.; 2010; Infecção perinatal por *Streptococcus agalactiae* pode ser evitada: Prevalência da colonização em parturientes no Hospital São Marcos, factores de risco e a sua relação com a infecção perinatal; *Acta Pediátrica Portuguesa* **41**(1):16-21
7. ARPIN, C.; DAUBE, H.; TESSIER, F.; QUENTIN, C.; 1999; Presence of *mefA* and *mefE* Genes in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(4):944-946

8. BAKER, C.J.; CLARK, D.J.; BARRETT, F.F., 1973; Selective Broth Medium for Isolation of Group B Streptococci. *Applied Microbiology*.**26**(6):884-885
9. BEITUNE, P.; DUARTE, G.; MAFFEI, C.M.L.; 2005; Colonization by *Streptococcus agalactiae* During Pregnancy: Maternal and Perinatal Prognosis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. **9**(3):276-282
10. BENSON, J.A.; FERRIERI, P.; 2001; Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Method for Group B *Streptococcus* Isolates. *Journal of Clinic Microbiology* **39**(8):3006-3008
11. BETRIU, C.; CULEBRAS, E.; GÓMEZ, M.; RODRÍGUEZ-AVIAL, I.; SÁNCHEZ, B.A.; ÁGREDA, M.C.; PICAZO, J.J.; 2003; Erythromycin and Clindamycin Resistance and Telithromycin Susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**(3):1112-1114
12. BISHARAT, N.; JONES, N.; MARCHAIM, D.; BLOCK, C.; HARDING, R.M.; YAGUPSKY, P., PETO, T.; CROOK, D.W.; 2005; Population structure of group B streptococcus from low-incidence region for invasive neonatal disease; *Microbiology* **151**:1875-1881
13. BRENCIANI, A.; OJO, K.K.; MONACHETTI, A.; MENZO, S.; ROBERTS, M.C.; VARALDO, P.E.; GIOVANETTI, E.; 2004; Distribution and molecular analysis of *mef*(A)-containing elements in tetracycline-susceptible and-resistant *Streptococcus pyogenes* clinical isolates with efflux-mediated erythromycin resistance; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**(6):991-998
14. BRIMIL, N.; BARTHELL, E.; HEINDRICHS, U.; KUHN, M.; LÜTTICKEN, R.; SPELLERBERG, B.; 2005; Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany; *International Journal of Medical Microbiology* **296**:39-44
15. BRZYCHCZY-WTOCH, M.; GOSIEWSKI, T.; BODASZEWSKA, M.; PABIAN, W.; BULANDA, M.; KOCHAN, P.; STRUS, M.; HECZKO,P.B.; 2010; Genetic characterization and diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates with macrolide resistance; *Journal of Medical Microbiology* **59**:780-786
16. BURDETT, V.; 1980; Identification of Tetracycline-Resistant R-Plasmids in *Streptococcus agalactiae* (Group B); *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **18**(5):753-760

17. C. CASCONI; M. SANTAGATI; S. NOVIELLO; F. IANNELLI; S. ESPOSITO; G. POZZI; S. STEFANI; 2002; Macrolide-resistance genes in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*; *Microbial Drug Resistance*. **8**(2): 129-132
18. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION; 2007; Perinatal Group B Streptococcal Disease After Universal Screening Recommendations – United States, 2003-2005 [WWW].MMWR. Weekly. **56**(28):701-705. Disponível em <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5628a1.htm>. [Consultado dia 13/12/2011]
19. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010: Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. MMWR **59**(10): 1-23.
20. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION; Group B Strep Infection in Adults [WWW]. Disponível em <http://www.cdc.gov/groupbstrep/about/adults.html>. Consultado a 05/10/2012;
21. CHUNG, M.; LENCASTRE, H.; MATTHEWS, P.; TOMASZ, A.; ADAMSSON, I.; SOUSA, M.A.; CAMOU, T.; COCUZZA,C.; CORSO, A.; COUTO, I; DOMINGUEZ, A.; GNIADKOWSKI, M.; GOERING, R.; GOMES, A.; KIKUCHI, K.; MARCHESE, A.; MATO, R.; MELTER, O.; OLIVEIRA, D.; PALACIO, R.; SÁ-LEÃO, R., SANCHES, I.S.; SONG, J-H.; TASSIOS, P.T.; VILLARI, P.; 2000; Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Comparison of Results Obtained in a Multilaboratory Effort Using Identical Protocols and MRSA Strains. *Microbial Drug Resistance* **6**(3):189-198
22. CHURCH, D.L.;BACTER, H.; LLYOD, T.;MILLER, B.; ELSAYED. S, 2008; Evaluation of StrepB Carrot Broth versus Lim Broth for Detection of Group B Streptococcus Colonization Status of Near-Term pregnant Women. *Journal of Clinical Microbiology*.**46**(8):2780-2782
23. CIESLEWICZ, M.J.; CHAFFIN, D.; GLUSMAN, G.; KASPER, D.; MADAN, A.; RODRIGUES, S.; FAHEY, J.; WESSELS,M.R.; RUBENS, C.E.; 2005; Structural and Genetic Diversity of Group B *Streptococcus* Capsular Polysaccharides; *Infection and Immunity* **73**(5):3096-3103

24. CLANCY, J.; DIB-HAJJ, F.; PETITPAS, J.W.; YUAN, W.; 1997; Cloning and Characterization of a Novel Macrolide Efflux Gene, *mreA*, from *Streptococcus agalactiae*; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**(12):2719-2723
25. CLAREBOUT, G.; VILLERS, C.; LECLERCQ, R.; 2001; Macrolide Resistance Gene *mreA* of *Streptococcus agalactiae* Encodes a Flavokinase; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(8): 2280-2286
26. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; 2005. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma aprovada – Sexta edição, vol. 23, no. 2 (M7-A6). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
27. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; 2005. Normas de desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo, vol. 25, no. 1 (M100-S15). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
28. COSTA, M. (2000); *Streptococcus e outros Cocos Gram positivos Associados*. In: FERREIRA, W.C. & SOUSA, J.C.F.; *Microbiologia Volume 2*; Lidel; pp. 51-62
29. CRESTI, S.; LATTANZI, M.; ZANCHI, A.; MONTAGNANI, F.; POLLINI, S.; CELLESI, C.; ROSSOLINI, G.M.; 2002; Resistance Determinants and Clonal Diversity in Group A Streptococci Collected during a Period of Increasing Macrolide Resistance; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**(6):1816-1822
30. CULEBRAS, E.; RODRIGUEZ-AVIAL, I.; BETRIU, C.; REDONDO, M.; PICAZO, J.J.; 2002; Macrolide and Tetracycline Resistance and Molecular Relationships of Clinical Strains of *Streptococcus agalactiae*; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**(5):1574-1576
31. DANIELS, J.P.; GRAY, J.; PATTISON, H.M.; GRAY, R.; HILLS, R.K.; KHAN, K.S. on behalf of the GBS Collaborative Group; 2011; Intrapartum tests for group B streptococcus: accuracy and acceptability of screening; *BJOG* **118**:257-265

32. de AZAVEDO, J.C.S.; MCGAVIN, M.; DUNCAN, C.; LOW, D.E.; MCGEER, A.; 2001; Prevalence and Mechanisms of Macrolide Resistance in Invasive and Noninvasive Group B Streptococcus Isolates from Ontario, Canada; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(12):3504-3508
33. de-PARIS,F.; MACHADO, A.B.M.P.; GHENO, T.C.; ASCOLI, B.M.; OLIVEIRA, K.R.P.; BARTH, A.L.; 2011; Group B *Streptococcus* detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women; *Braz J Infect Dis* **15**(4):323-327
34. DELA CRUZ, W.P.; RICHARDSON, J.Y.; BROESTLER, J.M.; THORNTON, J.A.; DANAHER, J.M.; 2007; Rapid Determination of Macrolide and Lincosamide Resistance in Group B Streptococcus Isolated from Vaginal-Rectal Swabs; *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*; **2007**; Article ID 46581
35. De SOUSA, J.C.F. & PEIXE, L.V. (2010); Antibióticos Antibacterianos. In: FERREIRA, W.F.C. *et al.*; *Microbiologia*; Lidel; pp. 453-469
36. DOMELIER, A-S; MEE-MARQUET, N.; ARNAULT, L.; MEREGHETTI, L.; LANOTTE, P.; ROSENAU, A.; LARTIGUE, M-F.; QUENTIN, R.; 2008; Molecular characterization of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **62**:1227-1233
37. EL AILA, N. A.; TENCY, I.; CLAEYS, G.; SAERENS, B.; COOLS, P.; VERSTRAELEN, H.; TEMMERMAN, M.; VERHELST, R.; VANEECHOUTTE, M.; 2010; Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B streptococcus carriage in pregnant women; *BMC Infectious Diseases* **10**(285)
38. EL AILA, N.A., TENCY, I.; CLAEYS, G.; SAERENS, B.; DE BAKER, E.; TEMMERMAN, M.; VERHELST, R.; VANEECHOUTTE, M.; 2009; Genotyping of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) isolated from vagina and rectal swabs of women at 35-37 weeks of pregnancy; *BMC Infectious Diseases* **9**(153)
39. EL HELALI, N.; NGUYEN, J-C.; LY, A.; GIOVANGRANDI, Y.; TRINQUART, L.; 2009; Diagnostic Accuracy of a Rapid Real-Time

- Polymerase Chain Reaction Assay for Universal Intrapartum Group B Streptococcus Screening; *Clinical Infectious Diseases* **49**:417-423
40. FARLEY M.M.; 2001; Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults. *Clinical Infections Diseases* **33**:556-561
 41. FERRIERI, P.; BLAIR, L.L.; 1977; Pharyngeal Carriage of Group B Streptococci: Detection by Three methods; *Journal of Clinical Microbiology* **6**(2):136-139
 42. FIGUEIREDO, T.A.; AGUIAR, S.I.; MELO-CRISTINO, J.; RAMIREZ, M.; 2006; DNA methylase activity as a marker for the presence of a family of phage-like elements conferring efflux-mediated macrolide resistance in Streptococci; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**(11): 3689-3694
 43. FLORINDO, C.; VIEGAS, S.; PAULINO, A.; RODRIGUES, E.; GOMES, J.P.; BORREGO, M.J.; 2010; Molecular characterization and antimicrobial susceptibility profiles in *Streptococcus agalactiae* colonizing strains: association of erythromycin resistance with subtype III-I genetic clone family; *Clin Microbiol Infect.* **16**:1458-1463
 44. FLORINDO, C.; GOMES, J.P.; RATO, M.G.; BERNARDINO, L.; SPELLERBERG, B.; SANTOS-SANCHES, I.; BORREGO, M.J.; 2011; Molecular epidemiology of group B streptococcal meningitis in children beyond the neonatal period from Angola; *Journal of Medical Microbiology* **60**:1276-1280
 45. FLUEGGE, K.; SIEDLER, A.; HEINRICH, B.; SCHULTE-MOENTING, J.; MOENING, M-J.; BARTELS, D.B.; DAMMANN, O.; von KRIES, R.; BERNER, R.; 2006; Incidence and Clinical Presentation of Invasive Neonatal Group B Streptococcal Infections in Germany; *Pediatrics.* **117**(6):1138-1146
 46. FOXMAN, B.; GILLESPIE, B.W.; MANNING, S.D.; MARRS, C.F.; 2007; Risk Factors for Group B Streptococcal Colonization: Potential for Different Transmission Systems by Capsular Type; *Ann Epidemiol.* **17**(11):854-862
 47. GHERARDI, G.; IMPERI, M.; BALDASSARRI, L.; PATARACCHIA, M.; ALFARONE, G.; RECCHIA, S.; OREFICI, G.; DICUONZO, G.; CRETI, R.; 2007; Molecular Epidemiology and Distribution of Serotypes, Surface proteins,

- and Antibiotic Resistance among Group B Streptococci in Italy; *Journal of Clinical Microbiology* **45**(9): 2909-2916
48. GIEDRAITIENĖ, A.; VITKAUSKIENĖ, A.; NAGINIENĖ, R.; PAVILONIS, A.; 2011; Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria; *Medicina (Kaunas)* **47**(3):137-146
49. GLASER, P.; RUSNIOK, C.; BUCHRIESER, C.; CHEVALIER, F.; FRANGEUL, L.; MSADEK, T.; ZOUINE, M.; COUVÉ, E.; LALIOUI, L.; POYART, C.; TRIEU-CUOT, P.; KUNST, F.; 2002; Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease; *Molecular Microbiology* **45**(6):1499-1513
50. GORDILLO, M.E.; SINGH, K.V.; BAKER, C.J.; MURRAY, B.E.; 1993; Typing of Group B *Streptococci*: Comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Conventional Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* **31**(6):1430-1434
51. GUIMARÃES, P.C.M.; 2008; Caracterização de estirpes de *Streptococcus agalactiae* de Colonização Vaginal e/ou Rectal da Grávida. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Universidade Nova de Lisboa)
52. GYGAX, S.E.; SCHUYLER, J.A.; KIMMEL, L.E.; TRAMA, J.P.; MORDECHAI, E.; ADELSON, M.E.; 2006; Erythromycin and Clindamycin Resistance in Group B Streptococcal Clinical Isolates; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**(5): 1875-1877
53. HANNOUN, A., SHEHAB, M.; KHAIRALLAH, M-T.; SABRA, A.; ABIRACHED, R., BAZI, T.; YUNIS, K.A.; ARAJ, G.F.; MATAR, G.M.; 2009; Correlation between Group B Streptococcal Genotypes, Their Antimicrobial Resistance Profiles, and Virulence Genes among Pregnant Women in Lebanon; *International Journal of Microbiology*; **2009**; Article ID 796512
54. HANSEN, S.M.; ULDBJERG, N.; KILIAN, M.; SØRENSEN, U.B.S.; 2004; Dynamics of *Streptococcus agalactiae* Colonization in Women during and after Pregnancy and in Their Infants; *Journal of Clinical Microbiology* **42**(1): 83-89

55. HEELAN, J.S.; HASENBEIN, M.E.; McADAM, A.J.; 2004; Resistance of Group B Streptococcus to Selected Antibiotics, Including Erythromycin and Clindamycin. *Journal of Clinical Microbiology* **42**(3):1263-1264
56. HONEST, H.; SHARMA, S.; KHAN, K.S.; 2006; Rapid Tests for Group B *Streptococcus* Colonization in Laboring Women: A Systematic review; *Pediatrics* **117**(4):1055-1066
57. HOOBKAMP-KORSTANJE, J.A.A.; GERARDS, L. J.; CATS, B.P.,1982; Maternal Carriage and Neonatal Acquisition of Group B Streptococci. *The Journal of Infectious diseases.* **145**(6):800-803;
58. JAHROMI, B. N.; POORARIAN, S.; POORBARFEHEE, S.; 2008; The Prevalence and Adverse Effects of Group B Streptococcal Colonization during Pregnancy; *Archives of Iranian Medicine* **11**(6):654-657
59. JOACHIM, A.; MATEE, M.I.; MASSAWE, F.A.; LYAMUYA, E.F.; 2009; Maternal and neonatal colonisation of group B Streptococcus at Muhimbili National Hospital in Dar es Saalam, Tanzania: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance; *BMC Public Health* **9**:437
60. 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.; 2003; Multilocus Sequence Typing System for Group B Streptococcus; *Journal of Clinical Microbiology* **41**(6):2530-2536
61. KASPER, D.L.; PAOLETTI, L.C.; WESSELS, M.R.; GUTTORMSEN, H-K.; CAREY, V.J.; JENNINGS, H.J.; BAKER, C.J.; 1996; Immune Response to Type III Group B Streptococcal Polysaccharide-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine; *J. Clinic. Invest* **98**(10):2308-2314
62. KAWAMURA, Y.; FUJIWARA, H.; MISHIMA, N.; TANAKA, Y.; TANIMOTO, A.; IKAWA, S.; ITOH, Y.; EZAKI, T.; 2003; First *Streptococcus agalactiae* Isolates Highly Resistant to Quinolones, with Point Mutations in *gyrA* and *parC*; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**(11): 3605-3609
63. KIMURA, K.; SUZUKI, S.; WACHINO, J-i.; KUROKAWA, H.; YAAMANE, K.; SHINATA, N.; NAGANO, N.; KATO, H.; SHIBAYAMA, K.; ARAKAWA, Y.; 2008; First molecular characterization of Group B

- Streptococci with reduced Penicillin Susceptibility; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**(8): 2890-2897
64. KLUGMAN, K.P.; CAPPER, T.; WIDDOWSON, C.A.; KOORNHOF, H.J.; MOSER, W.; 1998; Increased activity of 16-membered lactone ring macrolides against erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of South African isolates; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **42**:729-734
65. KOENING, J.M., KEENAN, W.J., 2009; Group B *Streptococcus* and Early-Onset Sepsis in the Era of Maternal Prophylaxis. *Pediatr Clin North Am.* **56**(3):689
66. KONG, F.; GOWAN, S.; MARTIN, D.; JAMES, G.; GILBERT, G.L.; 2002; Serotype Identification of Group B Streptococci by PCR and Sequencing; *Journal of Clinical Microbiology* **40**(1):216-226
67. KONG, F., LAMBERTSEN, L.M.; SLOTVED, H-C.; KO, D.; WANG, H.; GILBERT, G.L.; 2008; Use of Phenotypic and Molecular Serotype Identification Methods To Characterize Previously Nonserotypeable Group B Streptococci; *Journal of Clinical Microbiology* **46**(8):2745-2750
68. KONG, F., MA, L.; GILBERT, G.L.; 2005; Simultaneous detection and serotype identification of *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization; *Journal of Medical Microbiology* **54**:1133-1138
69. KUNZE, M.; ZIEGLER, A.; FLUEGGE, K.; HENTSCHEL, R.; PROEMPELER, H.; BERNER, R.; 2011; Colonization, serotypes and transmission rates of group B streptococci in pregnant women and their infants born at a single University Center in Germany; *J Perinat Med* **39**(4):417-422
70. LACHENAUER, C.S.; KASPER, D.L.; SHIMADA, J.; ICHIMAN, Y.; OHTSUKA, H.; KAKU, M.; PAOLETTI, L.C.; FERRIERI, P.; MADOFF, L.C.; 1999; Serotypes VI and VIII Predominate among Group B Streptococci Isolated from Pregnant Japanese women; *The Journal of Infectious Diseases* **179**:1030-1033
71. LECLERCQ, R.; 2002; Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of The Resistance Elements and Their Clinical Implications; *Clinical Infectious Diseases* **34**:482-492

72. LEVINSON, W. (2004); Medical Microbiology & Immunology: Examination & Board Review (8th edition); EUA: Lange; pp.107-112
73. LIN, F-Y.C.; WEISMAN, L.E.; TROENDLE, J.; ADAMS, K.; 2003; Prematurity Is the Major Risk Factor for Late-Onset Group B Streptococcus Disease; *The Journal of Infectious Diseases* **188**:267-271
74. LINDAHL, G.; STÅLHAMMAR-CARLEMALM, M.; ARESCHOUG, T.; 2005; Surface Proteins of *Streptococcus agalactiae* and Related Proteins in Other Bacterial Pathogens; *Clinical Microbiology Reviews* **18**(1):102-127
75. LONGTIN, J.; VERMEIREN, C.; SHAHINAS, D.; TAMBER, G.S.; MCGEER, A.; LOW, D.E.; KATZ, K.; PILLAI, D.R.; 2011; Novel Mutations in a Patient Isolate of *Streptococcus agalactiae* with reduced Penicillin susceptibility emerging after long-term oral suppressive therapy; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**(6):2983-2985
76. MADZIVHANDILA, M.; ADRIAN, P.V.; CUTLAND, C.L.; KUWANDA, L.; SCHRAG, S.J.; MADHI, S.A.; 2011; Serotype distribution and invasive potential of group B *Streptococcus* isolates causing disease in infants and colonizing maternal-newborn dyads; *Plos One*; **6**(3) e17861
77. MAIONE, D.; MARGARIT, I.; RINAUDO, C.D.; MASIGNANI, V.; MORA, M.; SCARSELLI, M.; TETTELIN, H.; BRETTONI, B.; IACOBINI, E.T.; ROSINI, R.; D'AGOSTINO, N.; MIORIN, L.; BUCCATO, S.; MARIANI, M.; GALLI, G.; NOGAROTTO, R.; DEI, V.N.; VEGNI, F.; FRASER, C.; MANCUSO, G.; TETI, G.; MADOFF, L.C.; PAOLETTI, L.C.; RAPPUOLI, R.; KASPER, D.L.; TELFORD, J.L.; GRANDI, G.; 2005; Identification of a Universal Group B Streptococcus Vaccine by Multiple Genome Screen; *SCIENCE* **309**:148-150
78. MALBRUNY, B.; WERNO, A.M.; ANDERSON, T.P.; MURDOCH, D.R.; LECLERCQ, R.; 2004; A new phenotype of resistance to lincosamide and streptogramin A-type antibiotics in *Streptococcus agalactiae* in New Zealand. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**(6):1040-1044
79. MANNING, S.D.; LACHER, D.W.; DAVIES, H.D.; FOXMAN, B., WHITTAM, T.S.; 2005; DNA Polymorphism and Molecular Subtyping of the

- Capsular Gene Cluster of Group B *Streptococcus*; *Journal of Clinical Microbiology* **43**(12):6113-6116
80. MANNING, S.D.; LEWIS, M.A.; SPRINGMAN, A.C.; LEHOTZKY, E.; WHITTAM, T.S.; DAVIES, H.D.; 2008; Genotypic Diversity and Serotype Distribution of Group B *Streptococcus* Isolated from Women Before and After Delivery; *Clinical Infectious Diseases* **46**:1829-1837
 81. MANNING, S.D.; NEIGHBORS, K.; TALLMAN, P.A.; GILLESPIE, B.; MARRS, C.F.; BORCHARDT, S.M.; BAKER, C.J.; PEARLMAN, M.D.; FOXMAN, B.; 2004; Prevalence of Group B *Streptococcus* Colonization and Potential for Transmission by Casual Contact in Healthy Young Men and Women; *Clinical Infectious Disease* **39**:380-388
 82. MARCHESE, A.; RAMIREZ M.; SCHITO, G.C.; TOMASZ, A.; 1998; Molecular Epidemiology of Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates Recovered in Italy from 1993 to 1996; *Journal of Clinical Microbiology* **36**(10):2944-2949
 83. MARGARIT, I.; RINAUDO, C.D.; GALEOTTI, C.L.; MAIONE, D.; GHEZZO, C.; BUTTAZZONI, E.; ROSINI, R.; RUNCI, Y.; MORA, M.; BUCCATO, S.; PAGANI, M.; TRESOLDI, E.; BERARDI, A.; CRETÌ, R.; BAKER, C.J.; TELFORD, J.L.; GRANDI, G.; 2009; Preventing Bacterial Infections with Pilus-Based Vaccines: the group B *Streptococcus* Paradigm; *The Journal of Infectious Diseases* **199**: 108-115
 84. MARIMÓN, J.M.; VALIENTE, A.; ERCIBENGOA, M.; GARCÍA-ARENZANA, J.M.; PÉREZ-TRALLERO, E.; 2005; Erythromycin Resistance and Genetic Elements Carrying Macrolide Efflux Genes in *Streptococcus agalactiae*; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**(12):5069-5074
 85. MARTINS, E.R.; ANDREU, A.; CORREIA, P.; JUNCOSA, T.; BOSCH, J.; RAMIREZ, M.; MELO-CRISTINO, J. on behalf of the Microbiologists Group for the study of Vertical Transmission Infections from the Catalan Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2011; Group B *Streptococci* Causing Neonatal Infections in Barcelona Are a Stable Clonal Population: 18-year surveillance; *Journal of Clinical Microbiology* **49**(8): 2911-2918

86. MARTINS, E.R.; MELO-CRISTINO, J.; RAMIREZ, M.; 2010; Evidence for Rare Capsular Switching in *Streptococcus agalactiae*; *Journal of Bacteriology* **192**(5):1361-1369
87. MARTINS, E.R.; FLORINDO, C.; MARTINS, F.; ALDIR, I.; BORREGO, M.J.; BRUM, L.; RAMIREZ, M.; MELO-CRISTINO, J.; 2007; *Streptococcus agalactiae* Serotype Ib as an agente of meningitis in two adult nonpregnant women; *Journal of Clinical Microbiology* **45**(11): 3850-3852
88. MARTINS, E.R.; PESSANHA, M.A.; 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; *Journal of Clinical Microbiology* **45**(10):3224-3229
89. MATUSHEK, M.G.; BONTEN, M.J.M.; HAYDEN, M.K.;1996;Rapid Preparation of Bacterial DNA for Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* **34**(10):2598-2600
90. MCKENNA, D.S.; MATSON, S.; NORTHERN, I.,2003; Maternal group B streptococcal (GBS) genital tract colonization at term in women who have asymptomatic GBS bacteriúria. *Infect Dis. Obstet. Gynecol.* **11**:203-207
91. MEE-MARQUET, N.V.D.; JOUANNET, C; DOMELIER, A-S; ARNAULT, L.; LARTIGUE, M-F.;QUENTIN, R.; 2009; Genetic diversity of *Streptococcus agalactiae* strains and density of vaginal carriage; *Journal of Medical Microbiology* **58**:169-173
92. MELIN, P; 2011; Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies; *Clinical Microbiology and Infeccion*
93. MEYN, L.A.; MOORE, D.M.; HILLIER, S.L.; KROHN, M.A.; 2002; Association of Sexual Activity with colonization and Vaginal Acquisition of Group B *Streptococcus* in Nonpregnant Women; *American Journal of Epidemiology* **155**(10):949-957
94. MIRÓ, E. REBOLLO, M.; RIVERA, A.; ÁLVAREZ, M.T.;NAVARRO, F.; MIRELIS, B.; COLL, P.; 2006; *Streptococcus agalactiae* altamente resistente a fluoroquinolonas; *Enferm Infecc Microbiol Clin* **24**(9):562-563

95. MOTLOVÁ, J.; STRAKOVÁ, L.; URBÁŠKOVÁ, P.; SAK, P.; SEVER, T.; 2004; Vaginal & Rectal carriage of *Streptococcus agalactiae* in the Czech Republic: incidence, serotypes distribution & susceptibility to antibiotics; *Indian J Med Res* **119**:84-87
96. MOUY, D.; CAVALLO, J-D.; LECLERCQ, R.; FABRE, R.; THE AFORCOPI-BIO NETWORK; 2001; Antibiotic Susceptibility and Mechanisms of Erythromycin Resistance in Clinical Isolates of *Streptococcus agalactiae*: French Multicenter Study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(8):2400-2402
97. MURAYAMA, S.Y.; SEKI, C.; SAKATA, H.; SUNAOSHI, K.; NAKAYAMA, E.; IWATA, S., SUNAKAWA, K.; UBUKATA, K.; THE INVASIVE STREPTOCOCCAL DISEASE WORKING GROUP; 2009; Capsular Type and Antibiotic Resistance in *Streptococcus agalactiae* Isolates from Patients, Ranging from Newborns to the Elderly, with Invasive Infections; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**(6):2650-2653
98. NETO, M.T.; 2008; Group B streptococcal disease in Portuguese infants younger than 90 days; *Arch Dis Child Fetal Neonatal* **93**:F90-F93
99. NOMURA, M.L.; JÚNIOR, R.P.; OLIVEIRA, U.M.; CALIL, R.; 2009; Colonização materna e neonatal por estreptococo do grupo B em situações de ruptura pré-termo de membranas e no trabalho de parto prematuro; *Rev Bras Ginecol Obstet* **31**(8):397-403
100. OVERMAN, S.B.; ELEY, D.D.; JACOBS, B.E.; RIBES, J.A.; 2002; Evaluation of Methods To Increase The Sensitivity and Timeliness of Detection of *Streptococcus agalactiae* in Pregnant Women; *Journal of Clinical Microbiology* **40**(11): 4329-4331
101. 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.; 2010; Phenotypic and Genotypic Characterization of Group B Streptococcal Isolates in Southern Brazil; *Journal of Clinical Microbiology* **48**(12):4397-4403
102. PINHEIRO, S.M.O.S.; 2009; Caracterização genética da resistência à eritromicina em *Streptococcus agalactiae* de gestantes saudáveis; Dissertação

para obtenção do grau de Mestre em Biologia Clínica e Laboratorial,
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

103. PIRES, R.; ROLO, D.; MATO, R.; ALMEIDA, J.F.; JOHANSSON, C.; HENRIQUES-NORMARK, B.; MORAIS, A.; BRITO-AVÔ, A.; GONÇALO-MARQUES, J.; SANTOS-SANCHES, I.; 2009; Resistance to bacitracin in *Streptococcus pyogenes* from oropharyngeal colonization and noninvasive infections in Portugal was caused by two clones of distinct virulence genotypes; *FEMS Microbiol Lett* **296**:235-240
104. PIRES, R.; ROLO, D.; GAMA-NORTON, L.; MORAIS, A.; LITO, L.; SALGADO, M.J.; JOHANSSON, C.; MÖLLERBERG, G.; HENRIQUES-NORMARK, B.; GONÇALO-MARQUES, J.; SANTOS-SANCHES, I.; 2005; Group A Streptococci from Carriage and Disease in Portugal: Evolution of Antimicrobial Resistance and T Antigen Types during 2000-2002; *Microbial Drug Resistance* **11**(4): 360-370
105. POYART, C.; RÉGLIER-POUPET, H.; TAZI, A.; BILLÖET, A.; DMYTRUK, N.; BIDET, P.; BINGEN, E.; RAYMOND, J.; TRIEU-COUT, P.; 2008; Invasive Group B Streptococcal Infections in Infants, France; *Emerging Infectious Diseases* **14**(10):1647-1649
106. POYART, C.; TAZI, A.; RÉGLIER-POUPET, H.; BILLOËT, A.; TAVARES, N.; RAYMOND, J.; TRIEU-CUOT, P.; 2007; Multiplex PCR Assay for Rapid and Accurate Capsular Typing of Group B Streptococci; *Journal of Clinical Microbiology* **45**(6):1985-1988
107. RALLU, F., BARRIGA, P.; SCRIVO, C. MARTEL-LAFERRIÈRE, V.; LAFERRIÈRE, C.; 2006; Sensitivities of Antigen Detection and PCR Assays Greatly Increased Compared to That of the Standard Culture Method for Screening for Group B Streptococcus Carriage in Pregnant Women; *Journal of Clinical Microbiology* **44**(3):725-728
108. RAMASWAMY, S.V.; FERRIERI, P.; FLORES, A.E.; PAOLETTI, L.C.; 2006; Molecular Characterization of Nontypable Group B Streptococcus; *Journal of Clinical Microbiology* **44**(7):2398-2403
109. RAMASWAMY, S.V.; FERRIERI, P.; MADOFF, L.C.; FLORES, A.E., KUMAR, N.; TETTELIN, H.; PAOLETTI, L.C.; 2006; Identification of a novel

cps locus polymorphisms in nontypable group B *Streptococcus*; *Journal of Medical Microbiology* **55**:775-783

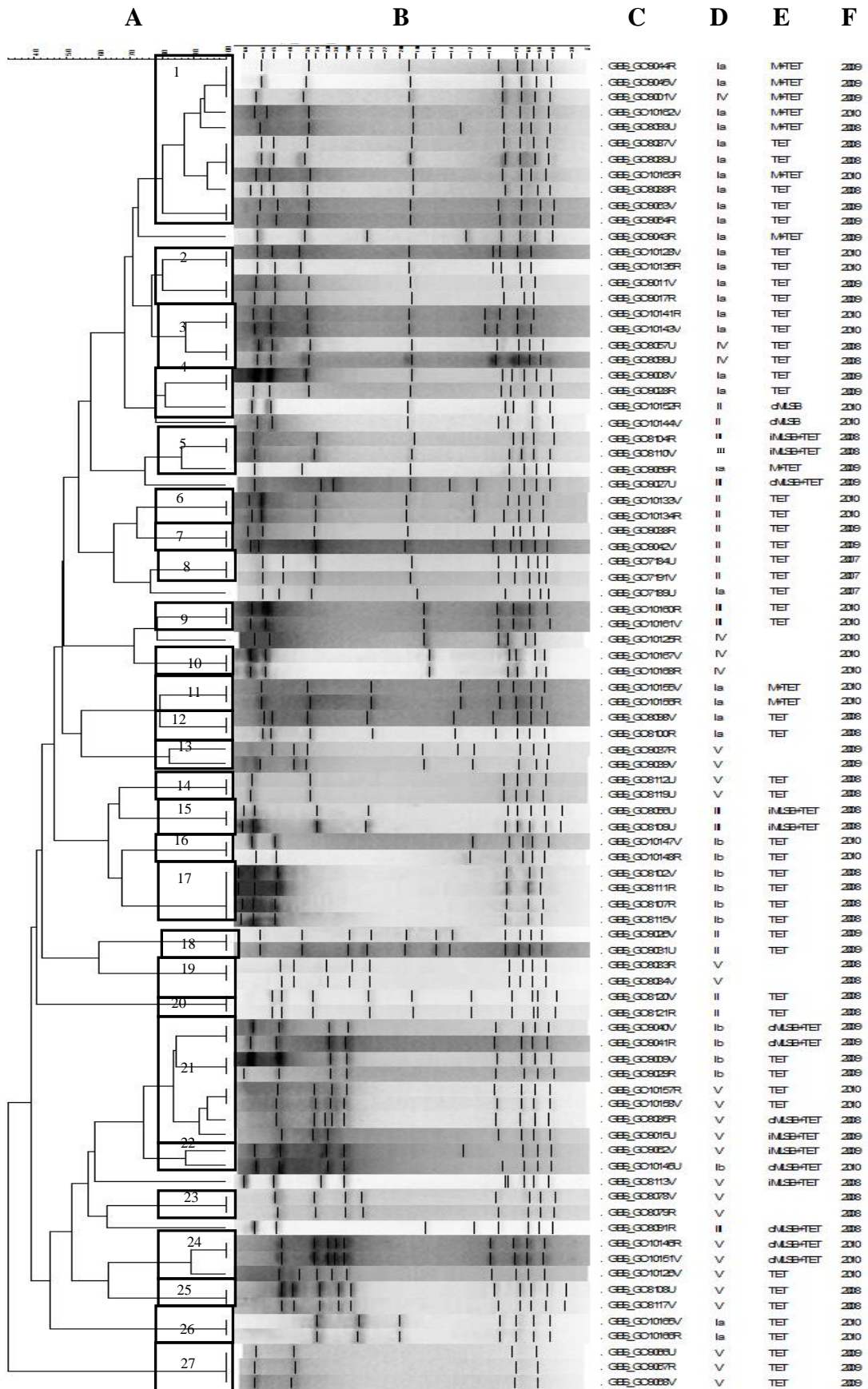
110. RATO, M.G.; BEXIGA, R.; FLORINDO, C.; CAVACO, L.M.; VILELA, C.L.; SANTOS-SANCHES, I.; Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis; *Veterinary Microbiology*. 2012 Aug 3. [Epub ahead of print]. In press
111. RODRIGUES, F.B.; 2009; Estudo da Colonização e Infecção por Estreptococos do Grupo B em Grávidas e Recém-nascidos do Distrito de Santarém. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Universidade Nova de Lisboa)
112. ROLLAND K.; MAROIS, C.; SIQUIER, V.; CATTIER, B.; QUENTIN, R.; 1999; Genetic Features of *Streptococcus agalactiae* Strains Causing Severe Neonatal Infections, as Revealed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and *hylB* Gene Analysis; *Journal of Clinical Microbiology* **37**(6):1892-1898
113. SCHRAG, S.J.; ZELL, E.R.; LYNFIELD, R.; ROOME, A.; ARNOLD, K.E.; CRAIG, A.S.; HARRISON, L.H.; REINGOLD, A.; STEFONEK, K.; SMITH, G.; GAMBLE, M.; SCHUCHAT, A., 2002; A Population-Based comparison of Strategies to Prevent Early-Onset Group B Streptococcal Disease in Neonates. *The New England Journal of Medicine*. **347**(4):233-239
114. SCHRAG, S.J.; ZYWICKI, S.; FARLEY, M.M.; REINGOLD, A.L.; HARRISON, L.H.; LEFKOWITZ, L.B.; HADLER, J.L., DANILA, R.; CIESLAK, P.R., SCHUCHAT, A.; 2000; Group B Streptococcal Disease in The Era of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis; *The New England Journal of Medicine* **342**(1):15-20
115. SLOTVED, H-C.; KONG, F.; LAMBERTSEN, L.; SAUER, S.; GILBERT, G.L.; 2007; Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype; *Journal of Clinical Microbiology* **45**(9):2929-2936
116. STAN, C.M.; BOULVAIN, M.; BOVIER, P.A.; AUCKENTHALER, R.; BERNER, M.; IRION, O.; 2001; Choosing a strategy to prevent neonatal early-onset group B streptococcal sepsis: economic evaluation; *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. **108**:840-847

117. STONER, K.A.; RABE, L. K.; HILLIER, S.L. 2004; Effect of Transport Time, Temperature, and Concentration on the Survival of Group B Streptococci in Amies Transport Medium. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**(11):5385-5387
118. TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D., GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B.; 1995; Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**(9):2233-2239
119. TERAOKUBO, S.; ICHIMAN, Y.; TAKEMURA, H., YAMAMOTO, H.; SHIMADA, J.; NAKASHIMA, H.; 2003; Serotypes and antibody levels of group B Streptococci in pregnant women; *Kansenshogaku Zasshi* **77**(3):121-126
120. TETTELIN, H.; MASIGNANI, V.; CIESLEWICZ, M.J.; EISEN, J.A.; PETERSON, S.; WESSELS, M.R.; PAULSEN, I.T.; NELSON, K.E.; MARGARIT, I.; READ, T.D.; MADOFF, L.C.; WOLF, A.M.; BEANAN, M.J.; BRINKAC, L.M.; DAUGHERTY, S.C.; DEBOY, R.T.; DURKIN, A.S.; KOLONAY, J.F.; MADUPU, R.; LEWIS, M.R.; RADUNE, D.; FEDOROVA, N.B.; SCANLAN, D.; KHOURI, H.; MULLIGAN, S.; CARTY, H.A.; CLINE, R.T.; VAN AKEN, S.E.; GILL, J.; SCARSELLI, M.; MORA, M.; IACOBINI, E.T.; BRETTONI, C.; GALLI, G.; MARIANI, M.; VEGNI, F.; MAIONE, D.; RINAUDO, D.; RAPPUOLI, R.; TELFORD, J.L.; KASPER, D.L.; GRANDI, G.; FRASER, C.M.; 2002; Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*; *PNAS* **99**(19): 12391-12396
121. TETTELIN, H.; MASIGNANI, V.; CIESLEWICZ, M.J.; DONATI, C.; MEDINI, D.; WARD, N, L.; ANGIOULI, S.V.; CRABTREE, J.; JONES, A.L.; DURKIN, A.S.; DeBOY, R.T.; DAVIDSEN, T.M.; MORA, M.; SCARSELLI, M.; MARGARIT Y ROS, I.; PETERSON, J.D.; HAUSER, C.R.; SUNDARAM, J.P.; NELSON, W.C.; MADUPU, R.; BRINKAC, L.M.; DODSON, R.J.; ROISOVITZ, M.J.; SULLIVAN, S.A.; DAUGHERTY, S.C.; HAFT, D.H.; SELENGUT, J.; GWINN, M.L., ZHOU, L., ZAFAR, N., KHOURI, H.; RADUNE, D.; DIMITROV, G.; WATKINS, K.; O'CONNOR, K.J.B.; SMITH, S.; UTTERBACK, T.R.; WHITE, O.; RUBENS, C.E.; GRANDI, G.; MADOFF,

- L.C.; KASPER, D.L.; TELFORD, J.L.; WESSELS, M.R.; RAPPUOLI, R.; FRASER, C.M.; 2005; Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial “pan-genome”; *PNAS* **102**(39):13950-13955
122. TSOLIA, M.; PSOMA, M.; GAVRILI, S.; PETROCHILOU, V.; MICHALAS, S.; LEGAKIS, N.; TH. KARPATIOS; 2003; Group B Streptococcus colonization of Greek pregnant women and neonates: prevalence, risk factors and serotypes; *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **9**:832-838
123. UH, Y.; KIM, H.Y.; JANG, I.H.; HWANG, G.Y.; YOON, K.J.; 2005; Correlation of Serotypes and Genotypes of Macrolide-Resistant *Streptococcus agalactiae*. *Yonsei Medical Journal* **46**(4):480-483
124. Van BELKUM, A.; TASSIOS, P.T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N.K.; FUSSING, V.; GREEN, J.; FEIL, E.; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE, S.; STRUELENS, M. for the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers(ESGEM); 2007; Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology; *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **13**(3):1-46
125. VAN DYKE, M.K.; PHARES, C.R.; LYNFIELD, R.; THOMAS, A.R.; ARNOLD, K.E.; CRAIG, A.S.; MOHLE-BOETANI, J.; GERSHMAN, K.; SCHAFFNER, W.; PETIT, S.; ZANSKY, S.M.; MORIN, C.A.; SPINA, N.L.; WYMORE, K.; HARRISON, L.H.; SHUTT, K.A.; BARETA, J.; BULENS, S.N.; ZELL, E.R.; SCHUCHAT, A.; SCHRAG, S. J.; 2009; Evaluation of Universal Antenatal Screening for Group B Streptococcus. *The New England Journal of Medicine* **360**(25):2626-2636
126. WANG, Y.-H.; SU, L.-H.; HOU, J.-N.; YANG, T.-H.; LIN, T.-Y.; CHU, C.; CHIU, C.-H.; 2010; Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Patients: Emergence of Highly Resistant Strains of Serotype Ib in Taiwan in 2006 to 2008; *Journal of Clinical Microbiology* **48**(7):2571-2574
127. WEN, L.; WANG, Q.; LI, Y.; KONG, F.; GILBERT, G.L.; CAO, B., WANG, L.; FENG, L.; 2006; Use of a Serotype-Specific DNA Microarray for

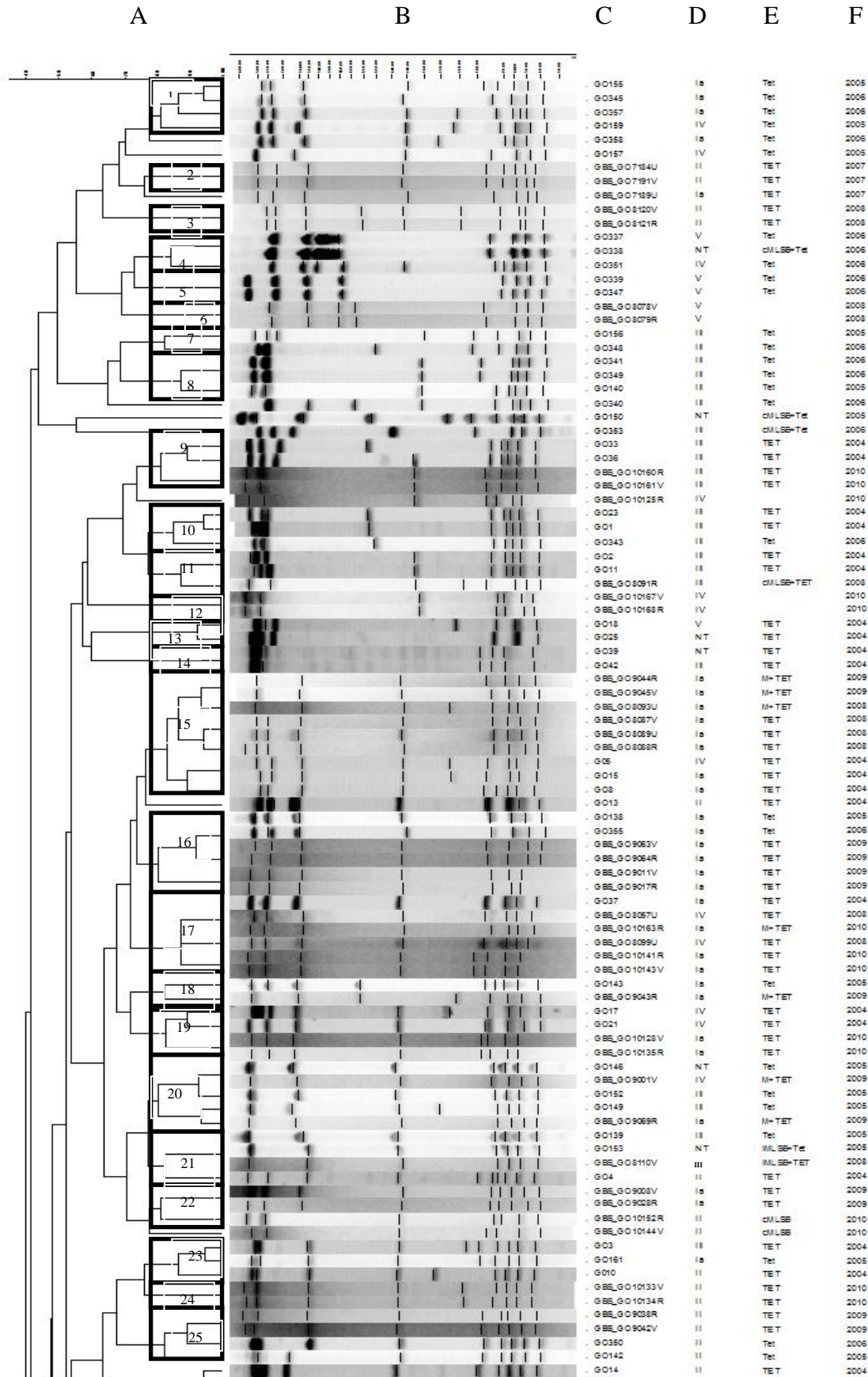
- Identification of Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*); *Journal of Clinical Microbiology* **44**(4):1447-1452
128. WILKINSON, H.W.; 1977; CAMP-Disk Test for Presumptive Identification of Group B Streptococci; *Journal of Clinical Microbiology* **6**(1):42-45
129. YANCEY, M.K.; SCHUCHAT, A.; BROWN, L. K.; VENTURA, V.L.; MARKENSON, G.R.; 1996; The accuracy of late antenatal screening cultures in predicting genital group B streptococcal colonization at delivery. *Obstet Gynecol.***88**(5):811-815
130. ZHAO, Z.; KONG, F.; ZENG, X.; GIDDIND, H.F.; MORGAN, J.; GILBERT, G.L.; 2008; Distribution of genotypes and antibiotic resistance genes among invasive *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) isolates from Australasian patients belonging to different age groups; *Clinical Microbiology and Infection* **14**:260-267

ANEXO I – DENDROGRAMA TOTAL (2007-2010)

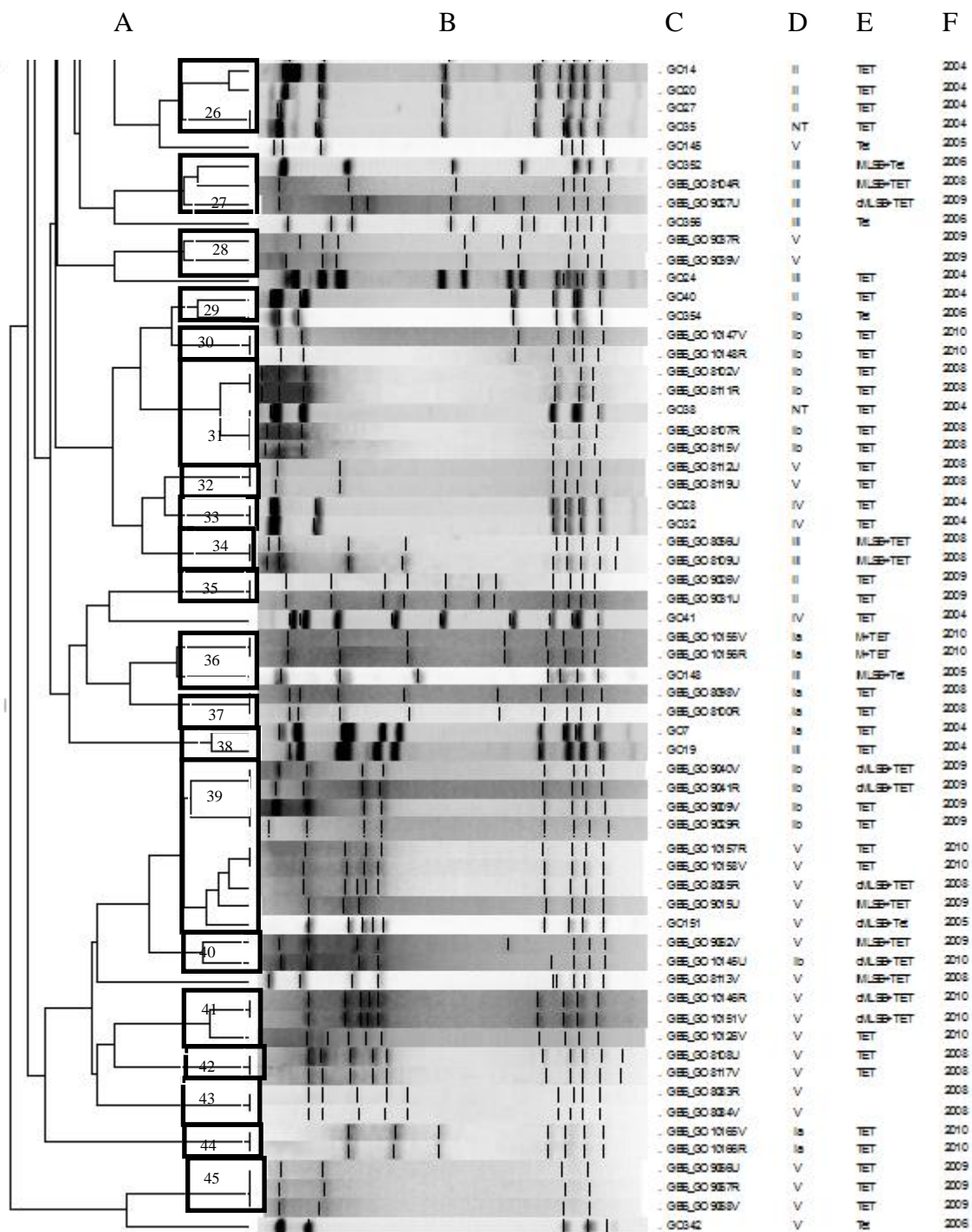


Dendrograma representativo de isolados de *Streptococcus agalactiae* recolhidos no período de 2007 a 2010, no Hospital Garcia de Orta. Perfis de macrorestrição obtidos com as endonucleases *Sma*I ou *Cfr*I91. Para a construção do dendrograma foi utilizado o coeficiente de semelhança de Dice e uma otimização de 0% e tolerância de 1.5%. O método de aglomeração foi UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic average*). A=Porcentagem de semelhança; B=Perfis de macrorestrição; C=Código do isolado; D=Serótipo capsular; E= Fenótipo de resistência; F= Ano. **A negrito encontram-se os 27 clusters** constituídos por isolados com uma semelhança mínima de 80% entre os seus perfis de macrorestrição.

ANEXO II – DENDROGRAMA TOTAL (2004-2010)



ANEXO II – DENDROGRAMA TOTAL (2004-2010) (continuação)



Dendrograma representativo de isolados de *Streptococcus agalactiae* recolhidos no período de 2004 a 2010, no Hospital Garcia de Orta. Perfis de macrorestrição obtidos com as endonucleases *Sma*I ou *Cfr*I9I. Para a construção do dendrograma foi utilizado o coeficiente de semelhança de Dice e uma optimização de 0% e tolerância de 1.5%. O método de aglomeração foi UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic average*). A=Porcentagem de semelhança; B=Perfis de macrorestrição; C=Código do isolado; D=Serótipo capsular; E= Fenótipo de resistência; F= Ano. A negrito encontram-se os 45 clusters constituídos por isolados com uma semelhança mínima de 80% entre os seus perfis de macrorestrição.