

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**Perfil de Suscetibilidade e Detecção de Marcadores Genéticos de
Resistência em *Streptococcus agalactiae* Isolados de Amostras
Animais e Humanas**

Cléia Maria Monteiro da Cunha

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E DETECÇÃO DE
MARCADORES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA EM
STREPTOCOCCUS AGALACTIAE ISOLADOS DE AMOSTRAS
ANIMAIS E HUMANAS**

CLÉIA MARIA MONTEIRO DA CUNHA

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

Dissertação submetida
como requisito parcial
para obtenção do grau
de Mestre em
Microbiologia
Veterinária.

Seropédica, RJ

Outubro de 2008

636.089696

9

C972p

T

Cunha, Cléia Maria Monteiro da,
1961-

Perfil de suscetibilidade e
detecção de marcadores genéticos de
resistência em *Streptococcus*
Agalactiae isolados de amostras
animais e humanas / Cléia Maria
Monteiro da Cunha - 2008.

44f. : il.

Orientador: Miliane Moreira
Soares de Souza.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Microbiologia Veterinária.

Bibliografia: f. 37-44

1. Microbiologia veterinária -
Teses. 2. *Streptococcus agalactiae*
- Teses. 3. *Streptococcus*
agalactiae - Genética - Teses. I.
Souza, Miliane Moreira Soares de,
1970-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Microbiologia
Veterinária. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

CLÉIA MARIA MONTEIRO DA CUNHA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, em 09 de outubro de 2008.

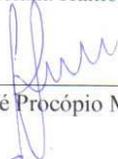
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09/10/08.



Prof.^ª Miliane Moreira Soares de Souza (Ph.D) UFRRJ – Brasil



Prof.^ª Adriana Hamond Régua (Ph.D) UFRJ – Brasil



Prof. José Procópio Moreno Senna (Ph.D) Institut Pasteur, IP - França



Prof.^ª Ângela de Oliveira (Ph.D) UFRRJ - Brasil

*Ao meu marido
Luiz Antônio, meu filho
Mário Henrique e
minha mãe Honorina.*

AGRADECIMENTOS

Ao companheiro de jornada Luiz Antônio da Cunha, presença fundamental na minha vida.

À professora e orientadora Miliane Moreira Soares de Souza pela oportunidade na execução desse trabalho, pela paciência, incentivo e carinho dispensados.

Ao chefe do Departamento de Patologia Clínica do Instituto Fernandes Figueira Janio Alves Cordeiro, pelo apoio pessoal e profissional.

Ao grupo de funcionários do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Fernandes Figueira, Jocerlan Quintiliano da Silva Santos, Francisca Neta, Jaíra Maia Lopes Ferreira da Silva e Fabíola Kegele pela compreensão e apoio.

Ao Dr. Geraldo Garcia Armoa e à amiga Maria Luiza Azevedo do Laboratório de Tecnologia de Recombinante - FioCruz, pela preciosa colaboração na execução das práticas moleculares.

Aos amigos Lidiane de Castro Soares e Marcelo Santos de Oliva, pelo constante incentivo e apoio em todos os passos necessários para este objetivo ser alcançado.

Ao amigo Rodrigo Fonseca, pela participação no fornecimento de material técnico.

Às amigas Teresinha Elisa de Brito, Silvana Lourenço da Silva, Silvana Duarte e a Maria Aparecida Oliveira de Castro Soares pelos momentos importantes de descontração e incentivo.

À Ingrid Annes Pereira e Shana de Mattos Oliveira Coelho pelo apoio técnico e agradável estímulo nas etapas executadas.

À Isabela Poubel pelo auxílio no trabalho com os isolados de animais.

Ao amigo Rafael Silva Duarte que, mesmo distante, esteve presente em todas as etapas como inspiração e exemplo.

A todos aqueles que participaram de alguma forma para tornar esse trabalho possível.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 01** Método de difusão em disco. 23
- Figura 02** Caracterização genotípica dos isolados de *S. agalactiae* através da detecção dos genes de resistência à tetraciclina pela técnica de PCR. 35
- Figura 03** Eletroforese em gel de agarose dos produtos das reações de PCR para amplificação do gene *tet(M)*.
- Figura 04** Eletroforese em gel de agarose dos produtos das reações de PCR para amplificação do gene *tet(O)*.

ÍNDICE DE QUADROS

- Quadro 01** Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro (mm) dos antibióticos utilizados. 15
- Quadro 02** Relação entre genes de resistência à tetraciclina e seqüências de oligonucleotídeos iniciadores usados na reação de PCR. 18

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Gráfico 01 | Perfil fenotípico da resistência antimicrobiana dos isolados de EGB de leite bovino e espécimes clínicos humanos. | 29 |
|-------------------|---|----|

ÍNDICE DE TABELAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 01 | Caracterização fenotípica dos isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> de origem animal e humana | 19 |
| Tabela 02 | Perfil de resistência dos isolados de EGB a diferentes antibióticos pela técnica de disco de difusão. | 21 |
| Tabela 03 | Perfil de resistência de isolados de EGB à tetraciclina pela técnica da concentração mínima inibitória. | 29 |
| Tabela 04 | Caracterização do fenótipo MLS _B em isolados de EGB através do estabelecimento do padrão de resistência aos macrolídeos pela técnica de difusão pelo método do duplo disco. | 30 |
| Tabela 05 | Distribuição de características genotípicas de resistência à tetraciclina entre os isolados de EGB estudados. | 33 |

ÍNDICE DE ABREVIACÕES

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC: American Type Culture Collection - Coleção de cultura americana
CAMP: Christie, Atkins e Munch-Peterson
CDC: Centers for Diseases Control and Prevention - Centro de controle e prevenção de doenças
CIM: Concentração inibitória mínima
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CMT: California Mastitis Test
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
EGB: Estreptococos do grupo b
INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
M: Fenótipo de resistência apenas a eritromicina
MH: Müeller Hinton
MLS_B: Macrolídeos, lincosamídeos e estreptogramina B
cMLS_B: Fenótipos de resistência concomitante a eritromicina e clindamicina
iMLS_B: Fenótipos de resistência a eritromicina indutivo
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards
Pb: Pares de base
PCR: Reação em Cadeia de Polimerase
Rpm: Rotações por minuto
TSB: Caldo Trypticase-Soja
UFC: Unidade Formadora de Colônia
°C : Graus Centígrados
µg/mL: microgramas por mililitro
µg: microgramas

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 01 |
| | 02 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 03 |
| 2.1 Gênero <i>Streptococcus</i> | 03 |
| 2.2 A importância clínica do gênero <i>Streptococcus</i> | 04 |
| 2.3 <i>Streptococcus agalactiae</i> | 05 |
| 2.3.1 Aspectos taxonômicos e evolutivos dos EGB | 05 |
| 2.3.2 Importância clínica e epidemiológica dos EGB | 07 |
| 2.3.2.1 Clínica animal | 07 |
| 2.3.2.2 Clínica humana | 08 |
| 2.3.3 Estratégias para profilaxia e prevenção | 10 |
| 2.3.4 Resistência antimicrobiana dos EGB | 10 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 13 |
| 3.1. Amostras | 13 |
| 3.1.1. Amostras de Origem Animal | 13 |
| 3.1.2. Amostras de Origem Humana | 13 |
| 3.3. Isolamento e Identificação de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 13 |
| 3.4. Teste de suscetibilidade aos fármacos de eleição | 14 |
| 3.4.1. Preparo de placas para o teste de suscetibilidade antimicrobiana | 14 |
| 3.4.2. Controle | 14 |
| 3.4.3. Antibióticos | 15 |
| 3.4.4. Teste de sensibilidade antimicrobiana por difusão em disco | 15 |
| 3.5. Teste de suscetibilidade à oxitetraciclina | 16 |
| 3.5.1 Microdiluição em ágar (determinação da concentração inibitória mínima) | 16 |
| 3.5.2. Avaliação do fenótipo de resistência aos macrolídeos (método do duplo disco) | 17 |
| 3.6. Caracterização de marcadores genotípicos de resistência à tetraciclina em isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 17 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 19 |
| 4.1. Caracterização dos isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 19 |
| 4.2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 21 |
| 4.3. Caracterização dos isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> com base no perfil de resistência a tetraciclina e ao fenótipo MLS _B | 29 |
| 4.4. Caracterização genotípica dos isolados de <i>S. agalactiae</i> através da detecção dos genes de resistência à tetraciclina pela técnica de PCR | 31 |
| 5. CONCLUSÕES | 35 |
| 6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA | 36 |

RESUMO

Os *Streptococcus agalactiae*, também designados como estreptococos do grupo B (EGB), são microrganismos comensais adaptados para fazer a colonização assintomática do tubo digestivo, e do trato geniturinário de mamíferos. Inicialmente, reconhecida como um dos mais importantes agentes etiológicos da mastite bovina, esta espécie foi também implicada como uma das principais causas de infecções invasivas em recém-nascidos humanos. As razões para a rápida e consistente evolução do EGB como importante agente causal de infecções neonatais ainda não foram completamente elucidadas, uma vez que as subpopulações de EGB nos isolados de humanos e bovinos são independentes e distintas com base no reconhecimento da diversidade de suas características fisiológicas. Com o objetivo de contribuir para a caracterização das duas subpopulações de *S. agalactiae* que coexistem no Estado do Rio de Janeiro, este estudo avaliou aspectos da diversidade genética e fenotípica de dois grupos de EGB regionais, sendo o primeiro composto por 50 isolados obtidos a partir de espécimes clínicos humanos, e o segundo constituído por 36 isolados a partir de leite de vacas leiteiras com indícios de mastite clínica ou subclínica. A caracterização fenotípica dos isolados foi baseada em testes sorológicos e fisiológicos, testes de suscetibilidade antimicrobiana realizados com técnica padronizada para utilização de disco de difusão e pelo método de microdiluição. O aspecto genético foi avaliado pela aplicação de PCR para detecção de genes associados à resistência à tetraciclina. Os testes fisiológicos demonstraram que a capacidade de promover β -hemólise era uma característica partilhada por cerca de 28% dos isolados a partir do material de natureza bovina, mas que manifestava-se em todos os isolados de origem humana. Os isolados de EGB bovinos também mostraram um perfil diferente quanto à sensibilidade à bacitracina, uma vez que apenas 33% delas se revelaram suscetíveis a esse antibiótico contra 100% de sensibilidade para os isolados de origem humana. O percentual de 100% de sensibilidade à penicilina demonstrado por todos os isolados analisados neste estudo, também corrobora a importância do uso desse antibiótico como procedimento geral na terapia de infecções por EGB. De uma forma geral, neste estudo foi observado que os isolados originados de material bovino demonstraram percentuais de resistência ao conjunto de antibióticos analisados (cefalexina, eritromicina, clindamicina, sulfametoxazol, azitromicina e ciprofloxacina) superiores aos observados em isolados de material humano. Foi também observado que 13,9% dos isolados de EGB animais examinados expressaram o fenótipo cMLS_B e 2,8% o fenótipo M. O fenótipo M foi o único parâmetro MLS_B expresso entre os isolados de *S. agalactiae* humanos, com um percentual de 6%. Quanto à presença de genes de resistência a tetraciclina entre as subpopulações de EGB, detectou-se percentuais de 13,8% (5/36) e 14% (7/50) para *tet*(M), e 30,5% (11/36) e 10% (5/50) para *tet*(O), respectivamente, nos isolados bovinos e humanos avaliados. Estes genes estão implicados na resistência à tetraciclina por um mecanismo de proteção ribossomal, pela alteração estrutural mediada por ação enzimática.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*, caracterização fenotípica, gene *tet*

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae, also referred as group B streptococci (GBS) are commensals microorganisms adapted to asymptomatic colonization of the mammals gut and genitourinary tract. Initially, this specie was recognized as a major etiologic agent for bovine mastitis but has becoming a leading cause of invasive infections in human neonates. The reasons behind the prompt and persistent emergence of GBS neonatal disease have not been completely elucidated, once human and bovine GBS populations are assumed be distinct and unrelated by divergence on their own physiological characters. Aiming to contribute for the characterization of the two *S. agalactiae* sub-populations that are in a proximal coexistence in the Rio de Janeiro state, this study evaluated phenotypic and genotypic diversity aspects of regional groups of GBS. The first made up of 50 isolates obtained from human specimens whilst the other group was constituted of 36 isolates from milk of dairy cows presenting clinical or sub clinical mastitis. Phenotypic characterization was based on physiological and serological tests, antimicrobial susceptibility assays were carried out by the disk standard procedure and microdilution method. The genetic aspect was assessed by PCR for detection of genes associated with resistance to tetracycline. According to the results of physiologic tests, β -hemolysis was a faculty shared by about 28% of bovine isolates and 100% of human isolates. GBS bovine isolates also shows different profile of sensitivity to bacitracin, only 33% of them were susceptible to the antibiotic, regardless of the whole human isolates set had demonstrated a 100% susceptible pattern to this substance. A 100% sensitivity percentual to penicillin was shared by all isolates assayed in this study corroborating the general procedure for antibiotic therapy of GBS infection. Otherwise, and in an overall view, bovine isolates showed higher resistance rates to a set of antibiotics, including cephexitin, erythromycin, clyndamicin, sulphamethoxazole, azithromycin and ciprofloxacin than in their human counterparts. In a similar sense, it was observed in this study that 13,9% of the animal GBS isolates expressed cMLS_B and 2,8 % M phenotypes. The M phenotype was expressed in 6% of the human related isolates as the unique MLS_B parameter. Genetical assays performed detected 13,8% (5/36) and 14% (7/50) for *tet* (M), and 30,5% (11/36) and 10% (5/50) for *tet* (O), respectively, in bovine and human isolates. These genes are implicated in tetracycline resistance by ribosome protection mechanism through enzymatic structural modification.

Key-words: *Streptococcus agalactiae*, fenotypic characterization, gene *te*

1. INTRODUÇÃO

Os *Streptococcus agalactiae*, também definidos como estreptococos do grupo B (EGB), estão presentes em diversas partes do corpo dos humanos e animais, na condição de componentes usuais da microbiota anfíbiota. Em humanos, os EGB participam na colonização das mucosas intestinais, das vias aéreas superiores, e especialmente do trato genitourinário feminino. Sua presença pode manter-se de forma assintomática ou ocasionar eventuais infecções leves, caracterizando o estado de portador de EGB, uma condição considerada como fator de origem para meningites, septicemias, endocardites e pneumonias usualmente atribuídas a esses microrganismos. Para os humanos, a relevância médica dos EGB, rotineiramente, está associada a casos de contaminações de neonatos e parturientes, entretanto a sua importância como patógeno também tem sido reconhecida para a população adulta não grávida, e de forma mais acentuada aos imunossuprimidos. A quimioprofilaxia aplicada às portadoras de EGB, identificadas através do isolamento desses microrganismos no trato gastrointestinal e genitourinário de gestantes no período final da gravidez, tem sido considerada a conduta recomendável para se evitar complicações para as crianças e parturientes no período imediatamente pós-natal. Nesses casos, a profilaxia é feita com penicilina ou ampicilina, e para os casos de reações alérgicas aos β -lactâmicos é recomendado o uso de clindamicina e eritromicina. No campo da medicina veterinária o EGB está implicado em processos infecciosos de uma variedade de hospedeiros, envolvendo eqüídeos, bovídeos, canídeos, felinos, suínos, primatas, roedores, répteis e peixes. Nesse contexto, a importância do *S. agalactiae* é ressaltada através do seu reconhecimento como uma das principais causas de mastite bovina, um importante problema de saúde pública que, no aspecto econômico, tem grande repercussão na indústria do leite em praticamente todos os países do mundo. O EGB é relacionado às formas contagiosas da mastite bovina, em especial, aquelas caracterizadas por serem provocadas por agentes infecciosos que necessitam do ambiente do órgão animal para sobreviver. Nessas condições, prevalecem as formas subclínicas de infecção, que geralmente apresentam quadros infecciosos de longa duração ou crônicos, que resultam em maiores perdas econômicas, uma vez que a produção de leite declina de forma consistente, sem que haja uma sintomatologia evidente a se tratar. O combate à colonização do úbere bovino por EGB e conseqüentemente, das formas de mastite provocadas por este agente, se faz de modo preferencial, através de um procedimento

conhecido como *blitz terapia* ou terapia de ataque, que consiste da aplicação intramamária de penicilina ou de uma associação de antibióticos – penicilina/novobiocina. Essa prática comum de tratar, os humanos e animais de interesse veterinários acometidos por infecções por EGB com penicilina, está diretamente relacionada à trivial sensibilidade do gênero *Streptococcus* a esse fármaco, e demonstra ser um tratamento eficiente apesar de décadas de aplicação. Entretanto, o EGB no que se refere à sensibilidade a outros antimicrobianos, mostra um comportamento bastante complexo e pode apresentar resistência múltipla a antibióticos como tetraciclina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, estreptomicina ou cloranfenicol. O perfil de resistência antimicrobiana de amostras de EGB pode ser resultante da aquisição de genes de resistência inseridos em transposons ou plasmídeos conjugativos proporcionando a esses microrganismos um parâmetro diferenciador entre amostras ou cepas bacterianas de grande utilidade para estudos epidemiológicos. Este estudo lança mão da caracterização fisiológica, do perfil de resistência e da detecção dos principais genes de resistência à tetraciclina para caracterizar amostras de EGB isolados de espécimes clínicos humanos, na cidade do Rio de Janeiro e de quadros de mastite bovina em fazendas de leite na região Sul Fluminense.

No âmbito da vigilância sanitária direcionada à saúde pública e veterinária, a importância desse estudo pode ser identificada em sua organização, como uma contribuição para o estabelecimento de padrões de monitoramento da distribuição e dispersão das amostras bovinas e humanas de EGB no conjunto das condições, agroindustriais e nosocomiais, vigentes na região centro-sul do Estado do Rio de Janeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Streptococcus*

Os estreptococos constituem um grupo de microrganismos caracterizados por se apresentarem na forma de cocos Gram positivos, imóveis, que se dispõem aos pares ou em cadeias quando em crescimento, e por não serem reativos para a prova da catalase. São bactérias nutricionalmente exigentes, que em condições laboratoriais requerem o enriquecimento do meio de crescimento para a evolução de suas culturas (KONNEMAN et al., 2001). Essa exigência nutricional restringe a presença dos estreptococos na natureza, na maioria das vezes, em associação com um animal hospedeiro, em detrimento de formas livres como observadas em outras espécies bacterianas (MUNDT, 1982).

A denominação desse grupo teve origem no termo *Streptococcus*, aplicado por Billroth, em 1874, para descrever os microrganismos esféricos presentes em exsudatos purulentos de feridas infectadas que cresciam formando alinhamentos (apud MAJNO; JORIS, 1979). Taxonomicamente, *Streptococcus* define um dos gêneros da família Streptococcaceae, que conta com dezenas de espécies bacterianas distribuídas em seis grupos. A heterogeneidade das espécies que compõem o gênero *Streptococcus* tem sido responsável por várias mudanças na classificação dessas bactérias (HARDIE; WHILEY, 1997; KONNEMAN et al., 2001; FACKLAM, 2002; KÖHLER, 2007).

Em um contexto histórico, a primeira classificação das espécies que compõem o gênero *Streptococcus* foi proposta por Schottmuller, em 1903, baseando-se na capacidade hemolítica desses microrganismos. Em 1919 foi introduzida a terminologia alfa, beta e gama para descrever os tipos de atividade hemolítica observadas em placas de agar sangue (BROWN, 1920; MCCARTHY, 1978). Uma classificação dos *Streptococcus* em grupos sorológicos, identificados através das características antigênicas do carboidrato C de suas espécies foi proposta em 1933 (LANCEFIELD, 1933). Estudos complementares efetuados por Rebecca Lancefield permitiram classificar estreptococos hemolíticos isolados de bovinos, como pertencentes ao grupo B (LANCEFIELD, 1934). Em 1937, Sherman propôs a diferenciação dos *Streptococcus* em quatro grupos: piogênico, viridans, lático e enterococo, baseando-se na classificação sorológica proposta por Rebecca Lancefield e em expressões fenotípicas como o padrão hemolítico e a resistência a certos antibióticos

(HARDIE; WHILEY, 1997). Nessa classificação as espécies promotoras de β hemólise foram reunidas na divisão piogênica (HARDIE; WHILEY, 1997; FACKLAM, 2002; KÖHLER, 2007).

A identificação das espécies de estreptococos usando testes fenotípicos é possível na maioria das oportunidades (HARDYE; WHYLEY, 1997) porém, algumas dessas propriedades avaliadas, como a resistência a antimicrobianos, pode ser controlada por genes segregados em plasmídeos (MUNDT, 1982).

A partir dos estudos de Kawamura et al. (1995), o grau de homologia das seqüências do rRNA 16S passou a ser usado para definir parâmetros taxonômicos (HARDYE; WHYLEY, 1997). O procedimento descrito por Kawamura possibilitou sistematizar as espécies de estreptococos em seis grupos taxonomicamente definidos: grupo “*bovis*”, grupo “*salivarius*”, grupo “*mutans*”, grupo “*mitis*”, grupo “*anginosus*” ou “*mileri*” e o grupo “*pyogenes*” (KAWAMURA, 1995).

Entre as técnicas moleculares desenvolvidas para identificar ou definir espécies pelo grau de homologia de material genético de estreptococos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem uma grande aplicabilidade, devido à maior facilidade de sua execução em relação a outros procedimentos (MARTINEZ et al., 2000; MEIRE-BENDEK et al., 2002; PICARD; BERGERON, 2004). Em relação aos estreptococos a técnica de PCR e suas derivações, também tem sido de grande importância na detecção de genes de resistência a antimicrobianos (DUARTE et al., 2005).

2.2. A importância clínica do gênero *Streptococcus*

A importância clínica do gênero *Streptococcus* tem sido ressaltada pela forma como a variedade das manifestações patológicas originadas por infecções estreptocócicas predomina sobre as provocadas pela maioria dos outros gêneros bacterianos (FACKLAM, 2002) e justifica a sua presença entre os principais temas abordados pela clínica médica humana e veterinária.

Os estreptococos constituem a microbiota anfíbio predominante nas membranas mucosas do trato respiratório superior, alimentar e geniturinário, bem como da pele dos humanos e de forma correlata, na maioria dos animais de interesse veterinário (MUNDT, 1982). Esses ambientes, especialmente nos animais homeotérmicos, representam nichos ecológicos específicos nos quais os estreptococos estabelecem uma relação compulsória de dependência em relação aos hospedeiros. (MUNDT, 1982; DEVRIESE, 1991; KÖHLER, 2007). Essa relação, embora tenha um

perfil de comensalidade, frequentemente toma um caráter contraproducente porque a virulência do microrganismo pode levar a morte dos hospedeiros (MUNDT, 1982).

A importância dos estreptococos como agente etiológico para humanos foi originalmente reconhecida por Pasteur e outros pesquisadores, ainda no século XIX, quando observaram microrganismos com o encadeamento típico de crescimento do gênero em amostras clínicas, obtidas de mulheres com febre puerperal (SCHUCHAT; WENGER, 1994).

O primeiro relato que permite associar esses microrganismos e sua importância para clínica animal pode ser atribuído a Nocard; Mollereau que em 1887, descreveram a presença de estreptococos à mastite bovina (apud SCHUCHAT; WENGER, 1994).

Várias espécies de estreptococos são associadas, de forma particular, a infecções de bovinos, eqüinos, suínos, ovinos, pássaros, mamíferos aquáticos e peixes (HARDIE; WHILEY, 1997; KÖHLER, 2007). A maioria das espécies estreptocócicas envolvidas nessas infecções mantém uma relação epidemiológica limitada a um dado hospedeiro (MUNDT, 1982; FACKLAM, 2002), e não representam grandes riscos para os humanos (HARDIE; WHILEY, 1997). Em alguns casos, as barreiras interespecies, são sobrepujadas e pode-se verificar que algumas das espécies estreptocócicas de origem animal podem infectar humanos, a exemplo de *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. dysgalactiae*. (DEVRIESE, 1991; HARDIE; WHILEY, 1997; KÖHLER, 2007). Verifica-se também que dentro do gênero dos estreptococos, várias espécies podem estar implicadas em determinados quadros infecciosos, a exemplo da mastite bovina, um mal de grande importância para a indústria leiteira, onde podem estar envolvidos: *S. canis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* e *S. uberis* (HARDIE; WHILEY, 1997).

2.3. *Streptococcus agalactiae*

2.3.1. Aspectos taxonômicos e evolutivos dos EGB

A classificação dos *Streptococcus agalactiae* como componente único do grupo B dos estreptococos fundamenta-se na propriedade comum entre suas amostras, em compartilhar os antígenos específicos de grupo na estrutura da parede celular (KONNEMAN et al., 2001). Os antígenos específicos do grupo B são compostos por polissacarídeos constituídos por uma estrutura primária central formada por ramnose, glucose e fosfato, onde se agregam cadeias laterais contendo ramnose, galactose e N-acetilglucosamina organizados na forma de trissacarídeos (PRITCHARD et al.,1984).

Essa organização estrutural manifesta uma antigenicidade exclusiva da espécie que pode ser detectada sorologicamente. Entretanto, nos EGB existe diversidade intragrupo que pode ser revelada de diferentes formas. A cápsula polissacarídica, que permite o microrganismo evadir-se do mecanismo de defesa dos hospedeiros, também apresenta uma composição variável que possibilita a diferenciação dos EGB em nove sorotipos diferentes: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII. (JOHRI et al., 2006). No entanto, a sorotipagem, nem sempre é sensível de forma suficiente para detectar importantes diferenças entre amostras de EGB epidemiologicamente distintas, e sua aplicação não resulta na caracterização de grupos homogêneos, que possam ser considerados variedades genéticas identificáveis por outras técnicas (MARTINEZ et al., 2000; MANNING et al., 2003; TETTELIN et al., 2005). Uma variedade de métodos moleculares, baseados nas estruturas primárias das proteínas e DNA, destacando-se entre esses a tipagem por seqüenciamento *multilocus* (MLST), tem sido usada para definir as relações filogenéticas entre amostras de um mesmo tipo de EGB (MARTINEZ et al., 2000, THONG et al., 2004; BROCHET et al., 2006). Os resultados obtidos a partir da aplicação dessas técnicas indicam que a sorotipagem de EGB não correlaciona de forma absoluta o parentesco evolucionário de diferentes amostras de *Streptococcus agalactiae* (HAUGE et al., 1996; MANNING et al., 2003; TETTELIN et al., 2005). A diferenciação das amostras de EGB através de suas características genótípicas e fenótípicas, incluindo-se entre elas a resistência antimicrobiana, possibilitou o delineamento dos *Streptococcus agalactiae* em duas populações distintas, compreendendo um número limitado de linhagens de origem bovina e outro número restrito de linhagens procedentes de nichos humanos (FINCH; MARTIN, 1984; DEVRIESE, 1991; BOHNSACK et al., 2004; DOGAN et al., 2005; HÉRY-ARNAUD et al., 2007). Além desses hospedeiros, são freqüentes os relatos de colonização por EGB de outros animais como: cães, cavalos, cobaias, gatos, macacos e peixes (YILDIRIM et al., 2002; BROCHET et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2006; JOHRI et al., 2006). As características das amostras isoladas a partir de cães, cavalos, gatos e macacos, se aproximam das observadas nas linhagens originadas em humanos (YILDIRIM et al., 2002). Para assinalar a diferenciação intra-espécie dos EGB, alguns autores adotam definições próprias ou assimilam conceitos como biotipos, *ecovars* ou subtipos (DEVRIESE; 1991; MARTINEZ et al., 2000; DUARTE et al., 2004; SUKHANANAND et al., 2005). Uma maior compreensão desse diagrama biológico foi possível de ser alcançado a partir da determinação da seqüência genômica completa do

EGB, bem como da análise da sua organização genética (MEDINI et al., 2005; TETTELIN et al., 2005; BROCHET et al., 2006). O genoma da espécie contém 2713 genes, dos quais 1806 formam o core genômico que compreende um conjunto de genes essenciais para a manutenção dos aspectos básicos da biologia da espécie (MEDINI et al., 2005; TETTELIN et al., 2005). A diversidade intra-espécie tem sua origem no genoma não essencial que codificam vias bioquímicas não essenciais ao crescimento bacteriano, mas que podem conferir vantagens seletivas, tais como a adaptação a diferentes nichos, resistência antimicrobiana ou a colonização de novos hospedeiros (MEDDINI et al., 2005, TETTELIN et al., 2005; BROCHET et al., 2006). Os genes não essenciais são segregados de forma agrupada e organizados como estruturas denominadas ilhas genômicas (MEDINI et al., 2005, TETTELIN et al., 2005; BROCHET et al., 2006).

2.3.2. Importância clínica e epidemiológica dos EGB

As demonstrações iniciais da importância clínica do EGB são atribuídas a Nocard e Mollereau que, em 1887, identificaram o microrganismo como um patógeno animal e causa de mastite bovina, enquanto que as primeiras infecções humanas só foram descritas 50 anos depois, durante a terceira década do século XX (BISHARAT et al., 2004). Uma grande incidência de infecções de neonatos humanos por EGB foi observada a partir da sexta década do século passado, nos anos seguintes houve um agravamento desse quadro e, esse microrganismo tornou-se o principal patógeno para os recém-nascidos (SCHUCHAT, 1998; BISHARAT et al., 2004).

O conceito de que os *Streptococcus agalactiae* eram formados por duas populações distintas foi mantido, apesar do esforço para se determinar um caráter zoonótico entre amostras associadas à mastite bovina e aos quadros mais invasivos de doença humana (FINCH; MARTIN, 1984; MARTINEZ et al., 2000; MANNING et al., 2003; BOHNSACK et al., 2004; SUKHNANAND et al., 2005; HÉRY-ARNAUD et al., 2007).

2.3.2.1. Clínica animal

No âmbito da ciência veterinária, o interesse pelo estudo de EGB tem se mantido por todos os continentes, em razão de sua significativa participação como agente causal de mastite bovina (KEEFE et al., 1997; BRADLEY 2002; ESTUNINGSIH et al., 2002; ANDERSEN et al., 2003; MERL et al., 2003, CARNEIRO, 2006). A mastite bovina

permanece como a maior causa de perdas econômicas associadas à cadeia produtiva do leite, mesmo depois do advento das técnicas de controle e tratamento do rebanho (DINSMORE et al., 1991; KEEFE et al., 1997; ANDERSEN et al., 2003; BRADLEY, 2002; ESTUNINGSIH et al., 2002; MERL et al., 2003; CARNEIRO, 2006). *Streptococcus agalactiae* pode permanecer por longos períodos na glândula mamária de um animal infectado, que se não for identificado e isolado para tratamento poderá se converter em reservatório de infecção para o rebanho (MERL et al., 2003; CARNEIRO, 2006). Entretanto, verifica-se que, o desvio da condição de alta prevalência de infecções subclínicas por EGB nos rebanhos bovinos, observada na sétima e oitava década do século passado, para uma condição de baixa prevalência na década subsequente (KEEFE et al., 1997) e corroborada nos primeiros anos deste século (ANDERSEN et al., 2003; BRADLEY, 2002; ESTUNINGSIH et al., 2002; MERL et al., 2003, CARNEIRO, 2006), demonstram a eficiência das práticas de prevenção e controle da disseminação de EGB, bem como pelo tratamento do gado infectado, com o propósito de erradicação da mastite bovina. No Brasil, onde as primeiras comunicações da presença de *Streptococcus agalactiae* como agente etiológico de mastite bovina, datam da primeira metade do século XX, estudos desenvolvidos no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, se alinham com as políticas de controle microbiológico do rebanho leiteiro, adotadas em diferentes países. Nesses estudos, a viabilidade técnica e o impacto econômico da erradicação de *Streptococcus agalactiae* em rebanhos bovinos, são examinados com base na realidade da pecuária brasileira (CARNEIRO, 2006).

2.3.2.2. Clínica humana

A importância clínica dos EGB para os humanos se relaciona principalmente, ao envolvimento dessa espécie bacteriana com doenças invasivas, de alta morbidade e mortalidade (POGERE et al., 2005). Os neonatos são afetados com maior frequência às infecções por EGB e, em especial, os prematuros e os menos desenvolvidos ao nascer estão sujeitos a maior risco de desenvolverem quadro graves como septicemias, pneumonias e meningites (BERALDO et al., 2004; POGERE et al., 2005). Há registros que a incidência de infecção global em neonatos, tem variado entre 0,5 e 0,6 casos para cada 1000 nascimentos vivos (HANSEN et al., 2004), nos Estados Unidos esses índices variavam entre 1,0 e 4,7 casos/1000 nascimentos (BAKER, 1979) enquanto na Europa se registrava entre 0,2 e 2,0 casos/1000 nascimentos (TRIJBELS-SMEULDERS et al.,

2004). Parturientes também estão incluídas nos altos índices de morbidade associados às infecções por EGB e podem ser causa de síndromes como cistite, pielonefrite, endocardite, endometrite, corioaminionite. Em ambas as situações, a origem predominante das infecções é a microbiota dos tratos geniturinário e gastrointestinal, onde os EGB tomam parte e estabelecem uma relação comensal e, usualmente, assintomática com os hospedeiros. Os índices de colonização assintomática entre adultos saudáveis variam entre 16% e 40% (SCHUCHAT, 1998; BLISS et al., 2002, MANNING et al, 2003; HANSEN et al., 2004). A prevalência de colonização entre idosos saudáveis, com taxas próximas a 25%, aproxima-se das observadas nas mulheres em idade fértil (EDWARDS; BAKER, 2005). A transição entre o estado de portador saudável, para o quadro de doença é pouco esclarecida em relação à significância da densidade da colonização, da diversidade da virulência entre os clones de EGB, e da suscetibilidade à infecção para determinados indivíduos (HANSEN et al., 2004). Fatores geográficos, étnicos e socioeconômicos também exercem grandes influências nessa relação, uma vez que podem determinar variações ambientais ou flutuações temporárias na composição da flora anfibionte do hospedeiro (BAKER, 1979; SCHUCHAT, 1998; BLISS et al., 2002; HANSEN et al, 2004; BORGER et al., 2005; POGERE et al., 2005).

As infecções neonatais por EGB podem evoluir para duas síndromes distintas: precoce e tardia. A síndrome precoce manifesta-se em 80% dos casos infecciosos em neonatos por *Streptococcus agalactiae* e desenvolve-se na primeira semana de vida, normalmente, nas primeiras 24 horas (BAKER, 1979; SCHUCHAT, 1998). Atribui-se a origem da síndrome precoce à transmissão vertical do EGB a partir de mães portadoras do microrganismo no trato geniturinário durante o parto. Essa síndrome caracteriza-se por uma disseminação bacteriana ascendente para o fluido amniótico (BAKER, 1979; SCHUCHAT, 1998). A aspiração do fluido contaminado desencadeia a infecção das vias aéreas do recém-nato e proporciona a via de acesso às doenças invasivas, sobretudo pneumonia. A transposição da barreira da mucosa pulmonar é a via de acesso para o EGB provocar septicemias (BAKER, 1979; SCHUCHAT, 1998). A taxa de fatalidade das síndromes precoces da infecção por EGB nos EUA foi estimada em 5% (DERMER et al., 2004).

A síndrome de ocorrência tardia caracteriza-se por ocorrer, no intervalo entre a primeira semana e o terceiro mês após o nascimento. O processo infeccioso geralmente está associado ao contato íntimo com a mãe portadora de EGB nos primeiros dias de

vida, entretanto, a transmissão horizontal, principalmente de natureza nosocomial, tem sido registrada. As meningites representam o quadro clínico predominante da síndrome de ocorrência tardia, que sobrecarrega os sobreviventes com uma significativa taxa de seqüelas neurológicas. (BAKER, 1979; SCHUCHAT, 1998).

No Brasil os dados a respeito da colonização de adultos e infecção de neonatos são escassos, além disso, os índices observados apresentam grande variabilidade, que pode representar realidades regionais específicas, ou em particular, onde as taxas de colonização são baixas em relação a outras regiões ou países, pode representar problemas metodológicos de avaliação (BERALDO et al., 2004; AMARAL, 2005; BORGER et al., 2005; POGERE et al., 2005)

2.3.5 Estratégias para profilaxia e prevenção

A incidência de doença neonatal por EGB declinou consideravelmente nos EUA a partir de 1990, como resultado da introdução do programa de vigilância e a implantação da profilaxia antimicrobiana intra-parto (SCHUCHAT, 1998; MOORE et al., 2003; BLISS et al., 2002; MANNING et al., 2003). Na Europa, estratégias de prevenção similares foram adotadas em outras partes tomando como base os resultados americanos (HANSEN et al., 2004). Nos EUA a incidência da síndrome precoce declinou 70% como consequência da adoção de medidas profiláticas, entretanto os índices relativos à síndrome de ocorrência tardia pouco se alteraram (SCHRAG et al., 2000).

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos através da aplicação profilática antimicrobiana, o procedimento suscitou preocupações com respeito a seleção de bactérias resistentes e o risco de reações alérgicas nas mães (LAW et al., 2005).

2.3.4. Resistência antimicrobiana dos EGB

O comportamento da espécie *S. agalactiae* frente aos antimicrobianos não se diferencia significativamente dos outros componentes do gênero estreptococos e, pelo senso comum, a penicilina é a droga indicada para a profilaxia e tratamento das doenças causadas por EGB (BAKER, 1979; BETRIU et al., 1994; FERNANDEZ et al., 1998; AZAVEDO et al., 2001). O sucesso de procedimentos como a profilaxia antibiótica intraparto e a *blitz* terapia, aplicados respectivamente no controle das infecções neonatais por EGB em humanos (BAKER, 1979; SCHUCHAT, 1998; JAURÉGUY et al., 2004; MONEY; DOBSON, 2004; MARLE et al., 2005) e na erradicação da mastite

bovina em rebanhos leiteiros (KEEFE, 1997; GRUET et al., 2001; CARNEIRO, 2006) demonstram que a resistência à penicilina e seus derivados não é um evento comum na fisiologia desses microrganismos. Entretanto, nas infecções em humanos, a evolução da resistência antimicrobiana dos EGB às lincosamidas e aos macrolídeos tem sido percebida com grande preocupação em diversos países, por serem as drogas recomendadas como alternativas para casos de alergia aos antibióticos β -lactâmicos, (FERNANDEZ et al., 1998; BORGER et al., 2005; MARIMÓN et al., 2005).

Diferentes estudos sobre a segregação de marcadores de resistência em EGB demonstram que, a resistência antimicrobiana, em si, pode ser reconhecida como fenótipo bacteriano e ser adotada como um parâmetro passível de ser usado na diferenciação entre amostras ou cepas dessa espécie (DOGAN et al., 2005; DUARTE et al., 2005). O processo de manifestação da resistência aos macrolídeos e as lincomicinas geralmente envolve a expressão de proteínas específicas, que atuam como metilases do rARN ou parte do mecanismo, próton dependente, de efluxo do antibiótico através de membranas. Nessas circunstâncias, as metilases protegem os ribossomos bacterianos opondo-se diretamente a ação das drogas, enquanto que as bombas de efluxo afastam a droga da fisiologia microbiana (SALYERS et al., 1995; MARIMOM et al., 2005). Na estrutura do DNA dos EGB, os genes codificantes desses promotores de resistência se agrupam no genoma não essencial. Organizam-se em ilhas genômicas, freqüentemente flanqueadas por elementos de inserção, que apresentam composições de nucleotídeos atípicas e sugerem a possibilidade de serem características genéticas adquiridas por mecanismos de transferência horizontal (MEDINI et al., 2005; TETTELIN et al., 2005). A viabilidade desse mecanismo ganha sustentação quando se observa a presença de elementos de resistência à tetraciclina na seqüência de Tn916, um transposon conjugativo freqüente entre os cocos Gram positivos, em diferentes amostras de EGB (SALYERS et al., 1995; POYART et al., 2003; TETTELIN et al., 2005). O arquétipo da organização genômica do EGB resulta em uma dualidade funcional e distingue um processo evolutivo acelerado baseado na presença de elementos genéticos móveis, associados a agrupamentos de genes dispensáveis, e na manutenção de uma estrutura genética básica, fundamentada na manutenção dos genes essenciais, para garantir a sobrevivência da espécie (BROCHET et al., 2006). A tradução das informações contidas nos genes dispensáveis, entre elas a resistência antimicrobiana, promove a variação intra-espécie, enquanto que na organização dos genes essenciais, a presença de seqüências peculiares contribui para caracterizar a espécie e determina o espectro da

relação do microrganismo com o seu hospedeiro e o ambiente (MEDINI et al., 2005; TETTELIN et al., 2005; BROCHET et al., 2006). Esse potencial tem sido usado para agrupar amostras, de origem bovina ou humana, em determinados biotipos ou ecovars, tomando como referência o compartilhamento de características fenotípicas e marcadores genéticos de resistência antimicrobiana (AZAVEDO et al., 2001; MERL et al., 2003; DOGAN et al., 2005; DUARTE et al., 2005). Esse procedimento tem se mostrado particularmente importante na caracterização de amostras originadas de animais de uma dada região, em função da maioria dessas amostras se mostrarem refratárias ao procedimento de sorotipagem (MARTINEZ et al., 2000; MERL et al., 2003; EKIN; GURTURK, 2006). Por outro lado verifica-se que a maioria das amostras de EGB tem sido caracterizada como resistentes as tetraciclinas (SALYERS et al., 1995; AZAVEDO et al., 2001; CHOPRA; ROBERTS, 2001; CULEBRAS et al., 2002). Os determinantes de resistência mais comuns aos EGB são codificados pelos genes *tet(M)* e *tet(O)* que são proteínas que protegem os sítios de ligação das tetraciclinas aos ribossomos bacterianos protegendo-os contra a ação antimicrobiana da droga. De forma menos freqüente, porém usual, o mecanismo de resistência dos EGB as tetraciclinas pode ser determinado pela expressão de proteínas codificadas pelos genes *tet(K)* ou *tet(L)* que promovem o bombeamento do antibiótico para fora das células (SALYERS et al., 1995; CHOPRA; ROBERTS, 2001; CULEBRAS et al., 2002; ZENG et al., 2006). O gene de resistência *tet(M)* é freqüentemente segregado por transposons conjugativos da família Tn916, que também estão envolvidos na segregação de genes do tipo *erm* que promovem a resistência à eritromicina (SALYERS et al., 1995; CHOPRA; ROBERTS, 2001; CULEBRAS et al., 2002; ZENG et al., 2006).

O perfil de resistência antimicrobiano, dentre eles à tetraciclina, tem sido associado às características fenotípicas de amostras de EGB, isoladas de animais ou humanos, como um procedimento muito útil para se estabelecer relações filogenéticas, identificar ou caracterizar amostras identificadas como de maior potencial patogênico, ou mesmo para estudos epidemiológicos (BETRIU et al., 1994; AZAVEDO et al., 2001; CULEBRAS et al., 2002; MERL et al., 2003; POYART et al., 2003; DOGAN et al., 2005; DUARTE et al., 2005; ZENG et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo foram utilizados 86 isolados de *Streptococcus agalactiae*, dos quais 50 de espécimes clínicos humanos e 36 de animais.

3.1. Amostras

3.1.1. Amostras de Origem Animal

As amostras de origem animal foram provenientes do leite de vacas com sinais evidentes de mastite, obtidas de propriedades rurais produtoras de leite bovino em municípios da Região Sul-Fluminense do Estado do Rio de Janeiro. O material analisado foi coletado no período entre abril e setembro de 2007. A evidência da mastite nesses animais foi determinada pelo método “*California Mastitis Test*” (CMT). Técnicas de assepsia e antisepsia peculiares à prática de ordenha foram aplicadas na coleta das amostras de leite, que acondicionadas em recipientes estéreis e mantidas sob refrigeração foram encaminhadas para processamento no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.1.2. Amostras de Origem Humana

As amostras de origem humana foram obtidas a partir de espécimes clínicos encaminhados para análise no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Fernandes Figueira IFF / FIOCRUZ – Rio de Janeiro no período entre fevereiro de 2006 e janeiro de 2007. As amostras foram catalogadas segundo os espécimes clínicos de onde foram originados: sangue (04), proveniente de crianças internadas, urina (18) de mulheres adultas internadas ou não e (28) secreções de mulheres adultas internadas ou não, as amostras após serem coletadas foram encaminhadas para análise laboratorial.

3.3. Isolamento e Identificação de *Streptococcus agalactiae*

O isolamento bacteriano foi realizado em ágar azida suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. As placas foram incubadas a 35°C em ambiente de microaerofilia (de modo a obter 3-5% de CO₂) por 18 a 24 horas e, posteriormente

observadas as características das colônias conforme descrito por (KONEMAN et al., 2001).

A identificação inicial de cada isolado foi realizada a partir da observação da morfologia colonial e do padrão hemolítico em ágar sangue, associados à coloração pelo método de Gram e prova da catalase. Para identificação de espécie, foram realizados os seguintes testes: resistência à bacitracina, a detecção do fator CAMP (assim denominado por Christie, Atkins e Munch-Peterson), a hidrólise do hipurato e da bile-esculina. Para classificação dos isolados segundo o agrupamento de Lancefield, foi utilizado o kit comercial Slidex Strepto Plus (bioMerioux, França) de acordo com as recomendações do fabricante. Os isolados identificados como *Streptococcus agalactiae* foram mantidos congelados entre -18°C e -20°C, sob forma de suspensões densas em leite desnatado Molico (Nestlé, Araçatuba, São Paulo) a 10% (p/v) acrescido de glicerol a 10% (v/v).

3.4. Teste de suscetibilidade aos fármacos de eleição

Após identificação, os isolados de *Streptococcus agalactiae* foram submetidos aos testes de suscetibilidade segundo os padrões da (CLSI, 2006). Que sucintamente são descritos a seguir.

3.4.1. Preparo de placas para o teste de suscetibilidade antimicrobiana

Para o teste de suscetibilidade antimicrobiana as placas foram preparadas segundo um mesmo padrão, isto é, as bactérias testadas foram suspensas em caldo Trypticase-Soja (TSB, Merck), incubadas durante 24 horas à temperatura de 35°C e diluídas ao nível de turvação de 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a $1,5 \times 10^6$ células/mL.

3.4.2. Controle

Para estabelecer parâmetros comparativos e controlar os testes de identificação e caracterização das amostras de EGB, foram utilizadas amostras-padrão de *Streptococcus agalactiae* (CL-5305, CL-5808 e CL-5848) e *S. aureus* (ATCC 25923 e MB-42) obtidas respectivamente do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/UFRJ e do Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ.

3.4.3. Antibióticos

Para o teste de antibiograma foram utilizados os seguintes discos de antibióticos (SENSIFAR-CEFAR[®]): penicilina (10UI), eritromicina (15µg), clindamicina (2µg), cefotaxima (30µg), tetraciclina (30µg), novobiocina (5µg), cefoxitina (30µg), sulfametoxazol-trimetoprim (25µg), azitromicina (15µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg) e vancomicina (30µg), para todas as amostras.

3.4.4. Teste de sensibilidade antimicrobiana por difusão em disco

Nesse procedimento a suspensão bacteriana (0,5 mL) foi distribuída sobre as placas em meio sólido (ágar Mueller Hinton (MH)/Merck acrescido de 5% de sangue de carneiro). Foram avaliadas as concentrações terapêuticas das drogas testadas já presentes em discos de sensibilidade. Após incubação por 18-24 horas a 35^oC, os diâmetros da zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos foram observados e medidos. O quadro 01 especifica as zonas de inibição do diâmetro avaliado em milímetros dos antibióticos utilizados.

Quadro 01. Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro (mm) dos antibióticos utilizados.

| Antibióticos | Zonas de Inibição | | |
|----------------------------|-------------------|---------------|----------|
| | Resistente | Intermediário | Sensível |
| Tetraciclina | ≤18 | 19-22 | ≥23 |
| Eritromicina | ≤15 | 16-20 | ≥21 |
| Azitromicina | ≤13 | 14-17 | ≥18 |
| Penicilina | - | - | ≥24 |
| Cefotaxima | ≤25 | 26-27 | ≥28 |
| Cefoxitina | ≤14 | 15-17 | ≥18 |
| Clindamicina | ≤15 | 16-18 | ≥19 |
| Novobiocina | ≤17 | 18-21 | ≥22 |
| Vancomicina | - | - | ≥17 |
| Sulfametoxazol-trimetoprim | ≤10 | 11-15 | ≥15 |
| Gentamicina | ≤12 | 13-14 | ≥15 |
| Ciprofloxacina | ≤15 | 16-20 | ≥21 |

3.5. Teste de suscetibilidade a oxitetraciclina

Para a realização dos testes de suscetibilidade à oxitetraciclina, usou-se uma solução padrão do antibiótico (1,0mg/mL), a partir da qual foram feitas diluições seriadas. Essas diluições foram usadas para preparar as placas e determinar a concentração mínima do antibiótico inibitória do crescimento das amostras de EGB.

3.5.1. Microdiluição em ágar (determinação da concentração inibitória mínima)

O desenvolvimento desta técnica se fez através de uma concentração inicial de 0,01mg/mL de oxitetraciclina que foi diluída em ágar MH acrescido de 5% de sangue de carneiro às concentrações de 0,25µl/mL; 0,5µl/mL; 1,0µl/mL; 2,0µl/mL; 4,0µl/mL; 8,0µl/mL; 16µl/mL e 32µl/mL. O resultado foi obtido pela avaliação do crescimento de colônias que indicou resistência à concentração e a CIM foi considerada como a primeira concentração de oxitetraciclina que não apresentou crescimento. Como controle positivo foi utilizado ágar MH sem antibiótico (MANN; MARKHMAN, 1998). Isolados que cresceram em ágar contendo valores de CIM maior ou igual a 8,0µg/mL foram considerados resistentes (CLSI, 2006).

3.5.2. Avaliação do fenótipo de resistência aos macrolídeos (método do duplo disco)

Os fenótipos de resistência aos macrolídeos nos isolados de EGB foram avaliados através do método do duplo disco. Para tanto, placas de Petri com meio de ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro foram inoculadas com suspensões bacterianas contendo entre 1 a 2×10^8 UFC/mL; sobre a semeadura foi disposto um disco impregnado com 15 µg de eritromicina distanciado por 15 mm de outro disco impregnado com 2 µg de clindamicina. Após um período de 24 horas de incubação a 35°C, as placas foram analisadas para se detectar sinais de resistência antimicrobiana, na forma de halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor dos discos. Define-se o fenótipo MLS_B pela constatação de resistência aos dois antimicrobianos testados. O fenótipo MLS_B pode ter um caráter constitutivo que se caracteriza pela não observação de halos inibitórios de crescimento microbiano ao redor dos dois discos, indicando uma produção contínua da enzima metilase. O fenótipo MLS_B também pode ter um caráter indutivo que se evidencia pela redução do halo de

inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco de clindamicina. Essa redução ocorre particularmente na região proximal ao disco de eritromicina, como resultado da eritromicina no meio de cultura. O fenótipo M é definido quando se observa apenas a resistência a eritromicina.

3.6. Caracterização de marcadores genotípicos de resistência à tetraciclina em isolados de *Streptococcus agalactiae*

Para se detectar marcadores genéticos de resistência à tetraciclina entre os isolados de *Streptococcus agalactiae* a partir de espécimes clínicos humanos e de origem animal no estado do Rio de Janeiro, seguiu-se o procedimento usado por Duarte et al. (2005). O método aplicado constituiu-se basicamente da amplificação de oligonucleotídeos iniciadores contendo seqüências específicas da estrutura de genes de resistência ao antimicrobiano pela técnica de PCR. De tal modo que, de cada um dos isolados de EGB nesse estudo, foram preparadas suspensões bacterianas que tiveram seus genomas extraídos para servirem de base para amplificar (oligonucleotídeos iniciadores contendo seqüências específicas) os mais comuns genes disseminadores de resistência às tetraciclinas; *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)*.

Para a extração de DNA foram tomadas entre 10 e 20 colônias de EGB, cultivadas a 35⁰C por 24 horas em meio de ágar sangue, e diluídas em 50 µL de água miliq estéril para serem, seqüencialmente, submetidas à fervura por 5 min.

As misturas finais de reações usadas para amplificação foram preparadas em volumes de 50µL, de forma a conter 20mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50mM de KCl, 3mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTP cada nucleotídeo, 0.5 µM de cada primer, 2.5 U de Taq polimerase (Boehringer Mannheim Biochemicals; Indianapolis, IN, EUA) e 5µl de extrato de DNA.

A reação de PCR foi realizada em um termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey, EUA) programado para ter uma desnaturação inicial a 93⁰C por 3 min, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 93⁰C por 1 min, anelamento a 50⁰C por 1 min e extensão a 72⁰C por 1 min. Diferentemente, a temperatura de anelamento para oligonucleotídeo do *tet(O)* usada foi de 55⁰C. A etapa final de extensão ocorreu a 72⁰C por 5 min.

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão relacionadas abaixo:

Quadro 02. Relação entre genes de resistência à tetraciclina e seqüências de oligonucleotídeos iniciadores usados na reação de PCR.

| Genes | Foward (5'-3') | Número de bases |
|----------------|---------------------------------|-----------------|
| <i>tet</i> (K) | TAT TTT GGC TTT GTA TTC TTT CAT | 24 |
| <i>tet</i> (L) | ATA AAT TGT TTC GGG TCG GTA AT | 23 |
| <i>tet</i> (M) | AGT TTT AGC TCA TGT TGA TG | 20 |
| <i>tet</i> (O) | AGC GTC AAA GGG GAA TCA CTA TCC | 24 |
| | Reverse (5'-3') | |
| <i>tet</i> (K) | GCT ATA CCT GTT CCC TCT GAT AA | 23 |
| <i>tet</i> (L) | AAC CAG CCA ACT AAT GAC AAT GAT | 24 |
| <i>tet</i> (M) | TCC GCA TAT TTA GAC GAC GG | 20 |
| <i>tet</i> (O) | CGG CGG GGT TGG CAA ATA | 18 |

Os resultados das reações de amplificação foram analisados através da técnica de eletroforese em géis de agarose (UltraPure agarose, GibcoBRL) preparados em tampão TAE 0,5X, pH 8,3 (Tris 0,89M, EDTA 0,025M e ácido bórico 0,89M) na concentração de 2% (p/v) e sob corrente de 100V. Padrões de peso molecular (“1 Kb DNA Ladder”; Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) foram utilizados para estimar o tamanho dos amplicons. Após coloração com brometo de etídio na concentração de 0,5µg/ml por 5 min, os géis foram fotografados sob transiluminação com luz ultravioleta e observados visualmente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos isolados de *Streptococcus agalactiae*

No período desse estudo, o processamento de espécimes clínicos humanos possibilitou a obtenção de 50 isolados de EGB, dos quais quatro foram obtidos de sangue, 18 de urina e 28 de secreção vaginal. Do processamento de leite de vacas com indícios de mastite foram obtidos 36 isolados.

Os resultados dos testes presuntivos de identificação e caracterização dos isolados de EGB a partir de espécimes clínicos humanos e animais, conforme procedimentos descritos por Koneman et al. (2001) e padronizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005) estão descritos na tabela 01.

Tabela 01. Caracterização fenotípica dos isolados de *Streptococcus agalactiae* de origem animal e humana:

| Testes | Percentual de resistência dos Isolados (%) | | | | |
|---------------------------|--|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| | Animal | Humanos | | | |
| | Leite (n=36) | Sangue (n=4) | Urina (n=18) | Secreções (n=28) | Total (n=50) |
| Hemólise (β) | 27,78 (10/36) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Catalase + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Resistência a bacitracina | 66,67 (24/36) | 100 | 100 | 96,4 (27/28) | 98 (49/50) |
| CAMP + | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Hidrólise Esculina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hidrólise Hipurato | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

No processo de triagem e caracterização das amostras de EGB estudadas, observou-se que os isolados de origem animal tiveram um perfil hemolítico diferenciado em relação aos isolados oriundos de espécimes clínicos humanos. Dos 36 isolados animais, apenas 27,78% (10/36) apresentaram o fenótipo de indução da β -hemólise, ao contrário dos 50 isolados humanos, que independente do sítio de origem dos espécimes, apresentou 100% de hemólise do tipo β . Esses dados estão de acordo

com os estudos de Finch; Martin (1984) que relataram índices de 98,2% do fenótipo de β -hemólise em 163 isolados de origem humana e 21,3% para os 61 isolados de origem animal, em um levantamento de variáveis fenotípicas para classificar os *Streptococcus agalactiae* em duas populações distintas. Posteriormente, autores como Yildirim, et al. (2002) também destacaram a relação entre o baixo percentual de isolados que apresentou atividade β -hemolítica como um aspecto que prevalece na maioria dos isolados de EGB de origem bovina. No Brasil, a variação no padrão β -hemolítico dos isolados de EGB em animais na região sudeste, já foi descrita por Duarte et al. (2004), que registraram índices de 52,9% para um n= 85, de atividade beta-hemolítica entre isolados obtidos de diferentes rebanhos nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro.

No presente estudo, o teste de sensibilidade à bacitracina também se mostrou como um importante fator na diferenciação entre os isolados de origem animal em relação aos de origem humana, com um percentual de 66,67% (24/36) de resistência dos isolados de origem animal, enquanto os isolados de origem humana apresentaram-se com 98% (49/50) de resistência. Esses dados contribuem para o alinhamento das características dos isolados de EGB estudados com os utilizados por Finch; Martin (1984) para diferenciar as populações microbianas provenientes de animais e humanas. Nos estudos referidos acima, 61 isolados de origem animal apresentaram índices de 8,2% de resistência à bacitracina e os 163 isolados de origem humana 94,5%, subsidiando a aplicação desse parâmetro na diferenciação entre essas subpopulações de EGB. Ainda em relação à sensibilidade de amostras de EGB a bacitracina, Duarte et al. (2004) descreveram um percentual de 48,2% de resistência a bacitracina em 85 isolados de animais. Assim, o conjunto desses dados permite a inserção dos resultados da análise desse fenótipo no presente estudo, em um intervalo de variação de índices de resistência à bacitracina para as amostras de *S. agalactiae* isoladas de material bovino entre 8,2% e 66,67%.

No processo de triagem também se verificou que somente quatro entre as dez amostras animais com perfil fenotípico de β -hemólise apresentaram sensibilidade à bacitracina, acentuando a importância da combinação desses dois parâmetros na caracterização de amostras de EGB. Nesse sentido faz-se importante registrar que nos estudos de Duarte et al. (2004) esses dois fenótipos tornaram-se muito importantes para classificar as amostras daquele estudo em biótipos. Duarte et al. (2004) definiram como os mais frequentes biótipos regionais, amostras de EGB animais que

caracteristicamente são sensíveis a ação antimicrobiana da bacitracina, contudo não apresentavam um perfil de atividade hemolítica do tipo β . Apesar das variações fenotípicas observadas entre os isolados de humanos e bovinos, a identificação de todas essas amostras, como estreptococos do grupo B, foi confirmada por teste de sorogrupagem pelo método de Lancefield.

4.2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Streptococcus agalactiae*

O perfil de suscetibilidade dos isolados de EGB humanos e animais frente a diferentes agentes antimicrobianos pela técnica do disco de difusão estão representados na tabela 02. Esses testes foram ensaiados imediatamente após a definição da identidade dos mesmos, por fenotipagem e sorologia.

Tabela 02. Perfil de resistência dos isolados de EGB a diferentes antibióticos pela técnica de disco de difusão.

| Antibióticos | Percentual de Resistência % | | | | |
|----------------|-----------------------------|-----------------|------------------|---------------------|------------------|
| | Isolados Animal | | Isolados Humanos | | |
| | Leite (n=36) | Sangue (n=4) | Urina (n=18) | Secreções (n=28) | Total (n=50) |
| Tetraciclina | 91,7 (33/36) | 100 | 94,44 (17/18) | 100 | 98,00 (49/50) |
| Eritromicina | 16,67 (6/36) | 0 | 5,56 (1/18) | 7,14 (2/28) | 6 (3/50) |
| Azitromicina | 13,89 (5/36) | 0 | 0 | 3,57 (1/28) | 2 (1/50) |
| Penicilina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cefotaxima | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cefoxitina | 30,56 (11/36) | 0 | 0 | 25 (7/28) | 14 (7/50) |
| Clindamicina | 22,22 (8/36) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Novobiocina | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Vancomicina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sulfametoxazol | 91,67 (33/36) | 50 (2/4) | 100 | 96,4 (27/28) | 94 (47/50) |
| Gentamicina | 72,22 (26/36) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Ciprofloxacina | 13,89 (5/36) | 0 | 0 | 3,57 (1/28) | 2 (1/50) |

Nessa tabela, a disposição dos resultados foi organizada no sentido de ressaltar o perfil de resistência à tetraciclina e utilizá-lo como referência para a análise do comportamento de EGB frente a outros antimicrobianos. De forma particular, o perfil de resistência das amostras de EGB à tetraciclina desperta interesse em relação à alta frequência que esse fenótipo é segregado em associação ao de resistência a eritromicina (DUARTE et al., 2005).

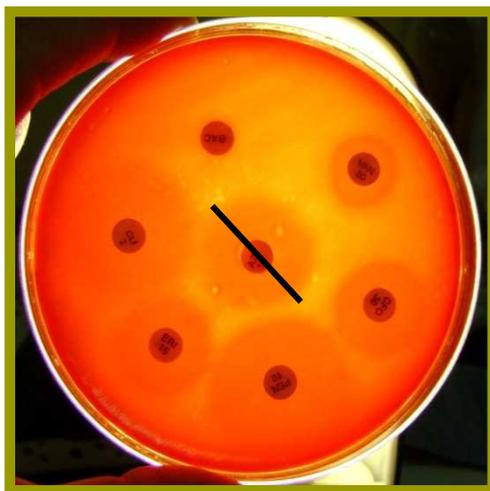


Figura 01. Método de difusão em disco. A linha demonstra o halo de sensibilidade (S) avaliado em milímetros (mm), e, pode-se observar o crescimento bacteriano ao redor dos discos de antibióticos (R).

Nesse contexto, observa-se que a resistência a tetraciclina é um fenótipo presente em 82 dentre os 86 isolados de EGB analisados pela técnica de disco de difusão, e corresponde a 95,35% do conjunto de espécimes clínicos de origem bovina e humana. Duarte et al. (2004), dentro de uma conjuntura regional comum, e aplicando procedimentos equivalentes registraram a resistência a esse antimicrobiano em 44,7% de 85 isolados. Contudo, ano subsequente, a mesma equipe de pesquisadores descreveu a resistência à tetraciclina como uma característica comum entre os 189 isolados de origem humana e animal, analisados na mesma parte da região sudeste do Brasil (DUARTE et al., 2005). Dogan et al. (2005), relataram o fenótipo de resistência à tetraciclina em 84,6% para 52 isolados de EGB de espécimes clínicos humanos e 14,5% para os 5 isolados de origem bovina. Na seqüência da apresentação dos resultados do presente estudo, novas abordagens sobre o perfil de resistência dos EGB à tetraciclina

serão apresentadas e aspectos diferenciados desse fenótipo retornarão ao foco dessa discussão.

Na tabela 02, a novobiocina apresentou um percentual de 100% de resistência dos EGB aos antimicrobianos, uma vez que todos os isolados testados apresentaram resistência a esse fármaco. Por outro lado, a penicilina, a cefotaxima e a vancomicina aparecem como fármacos com absoluta eficiência antimicrobiana por conta de que não houve qualquer isolado apresentando perfil de resistência frente a estes fármacos. Esses resultados corroboram, de forma prática, o conceito de que os β -lactâmicos ainda constituem a opção profilática e terapêutica adequada para infecções por EGB, dada a observação de que a resistência a esses antimicrobianos não emergiu entre amostras de *S. agalactiae*. Algum nível de tolerância aos β -lactâmicos pelos EGB tem motivado alguma apreensão relacionada à eficiência desse procedimento. Na Espanha (BETRIU et al., 1994), foram descritos índices de 10% de tolerância aos β -lactâmicos na avaliação de 100 isolados de origem humana, enquanto que Azavedo et al. (2001) relataram a presença de um isolado de *S. agalactiae* responsável por septicemia neonatal com fenótipo de tolerância à penicilina entre 279 isolados de origem humana analisados no Canadá. Pode se considerar que essas observações tiveram uma expansão geográfica nos estudos de Hsueh et al. (2001) que relataram índices de 6% de resistência em 266 isolados humanos em Taiwan. Nos Estados Unidos, Simões et al. (2004) descreveram índices de 15,4% e 17,3%, respectivamente, para tolerância à penicilina e ampicilina em um universo de 52 amostras de EGB.

No entanto, a condição de sensibilidade irrestrita à penicilina observada no presente trabalho é corroborada por vários estudos ao longo dos últimos dez anos. A prevalência dessa condição de forma homogênea pelo planeta pode ser constatada com a observação de que na América do Norte, Fernandez et al. (1998) relataram essa unanimidade em 229 isolados de EGB a partir de espécimes clínicos humanos nos Estados Unidos, que foi reafirmada por Azavedo et al. (2001) ao avaliar 279 isolados de origem canadense. Na Europa, o panorama de absoluta sensibilidade de amostras de EGB aos penicilâmicos ganha suporte, seqüencialmente, nos estudos de Mouy et al. (2001) com 126 isolados analisados, Poyart et al. com um elevado número de 664 isolados na França em 2003, e Betriu et al. (2004) em um estudo envolvendo 88 isolados.

Os estudos de Matsubara et al. (2001) envolvendo a análise de 212 isolados de origem humana no Japão, em um período de 15 anos, de Werno e Anderson (2003)

avaliando 177 isolados na Nova Zelândia e de Zeng et al. (2006) que analisaram 512 isolados de várias partes do continente asiático, confirmam a distribuição desse padrão de sensibilidade dos EGB à ação dos β -lactâmicos pelo mundo. Estudos realizados em 54 isolados a partir do leite bovino na Alemanha por Merl et al. em 2003 e 89 isolados por Duarte et al. (2004) no Brasil, subsidiam a extensão desse padrão de sensibilidade à penicilina aos isolados de origem animal.

O perfil de resistência dos EGB as cefalosporinas (tabela 02) está contemplado no presente estudo através dos valores associados a cefotaxima e a cefoxitina. Nesse quadro, a cefotaxima mostrou-se como um antimicrobiano para o qual não foi observado qualquer indício de resistência pelos isolados de EGB de origem bovina ou humana, esse resultado se alinha com os estudos de Dogan et al. (2005) que relataram 100% de sensibilidade as cefalosporinas em 83 isolados bovinos de *S. agalactiae* e 52 humanos. Apenas uma exceção a esse perfil foi registrada nos estudos de Hsueh et al. (2001), que identificaram 1% de resistência entre 266 isolados de EGB de origem humana em Taiwan. Contudo a sensibilidade plena desses microrganismos a cefotaxima é corroborada em pelo menos três oportunidades: Betriu et al. em 1994 ao avaliar 100 isolados, Fernandez et al. em 1998 ao avaliar 229 isolados e Matsubara em 2001 ao avaliar 212 isolados. O perfil de resistência demonstrado pelas amostras de EGB à cefoxitina no presente estudo se apresentou de forma diferenciada entre os isolados de origem bovina e humana, com índices respectivamente de 30,56 % (11/36) e 14% (7/50). Entre os isolados de origem humana verifica-se que os índices mais significativos de resistência estão associados aos isolados a partir de secreções vaginais, e entre eles, 25% (7/28) apresentaram-se como resistentes e constituíram a base do perfil de resistência demonstrado por esta subpopulação de EGB. Betriu et al. em 1994, já evidenciavam a diversidade do perfil de sensibilidade de EGB frente a diferentes cefalosporinas, destacando-se a cefotaxima como o único fármaco do grupo para o qual esses microrganismos demonstravam plena sensibilidade. Entretanto, nos estudos conduzidos por Werno e Anderson (2003) não foi detectada resistência nos 177 isolados avaliados frente à ceftriaxona na Nova Zelândia, contrapondo com os resultados relatados por Simões et al. (2004), onde foi detectado um percentual de 15,4% de resistência em 52 isolados analisados nos Estados Unidos, tais dados demonstram que essa questão ainda não teve sua definição.

A plena suscetibilidade dos *S. agalactiae* à vancomicina como descrito (tabela 02) é uma conotação comum entre vários estudos onde a sensibilidade das amostras de

EGB a esse antimicrobiano é avaliada, e se alinha com a distribuição em nível mundial da sensibilidade desses microrganismos aos β -lactâmicos. A suscetibilidade absoluta dos EGB à vancomicina é um evento disseminado pelos diferentes continentes. Os estudos descritos de Fernandez et al. (1998) e de Simões et al. (2004) que analisaram 225 e 52 isolados, respectivamente, confirmam essas ocorrências nas Américas. Esses números, ao serem associados aos estudos na Europa, Ásia e Oceania, descritos na seqüência: Poyart et al. avaliando 664 isolados em 2003; Betriu et al. avaliando 100 isolados em 2004; Matsubara et al. avaliando 212 isolados em 2001; Werno e Anderson avaliando 177 isolados em 2003; e Hsueh et al. avaliando 266 isolados em 2006, constituem um universo de 1696 isolados de EGB analisados sem qualquer manifestação de resistência a vancomicina.

Quanto ao perfil de resistência dos *S. agalactiae* as sulfonamidas neste trabalho, foi detectada uma equivalência entre percentuais de resistência observados para os isolados de origem bovina com 91,67% e de origem humana com 94%. É perceptível entre os isolados de origem humana, uma significativa discrepância entre o percentual de 50% de resistência verificada entre os isolados de sangue em relação aos obtidos a partir de secreção vaginal e de urina. Entretanto, essa discrepância não comprometeu a formação do percentual global de resistência dessa subpopulação de EGB à sulfonamida em razão da baixa relação entre os isolados a partir de sangue e os obtidos a partir de secreções vaginais e urina. Esses resultados se contrapõem aos resultados por D'Oliveira (2002), que registrou um percentual de 35,9% em 33 isolados de EGB pesquisados, e de forma mais significativa aos descritos, na Europa, por Betriu et al. (1994) ao avaliar 100 isolados de origem humana obtendo 1% e por Mouy et al. (2001) que relatou percentuais de resistência de 10,4% para 126 isolados avaliados.

Foi possível detectar um comportamento predominantemente resistente a gentamicina, tanto para os isolados de origem bovina quanto humana, com percentuais de 72,22% (26/36) e 100%, respectivamente. Dogan et al. (2005) também registraram resultados semelhantes ao avaliarem isolados de origem humana e bovina, relatando respectivos percentuais de 100% e 91,6% de resistência. Corroborando com os trabalhos já citados de Betriu et al. (1994) e Matsubara et al. (2001).

Foram obtidos percentuais semelhantes frente à Azitromicina, um macrolídeo, e a ciprofloxacina, uma quinolona, para isolados de origem bovina ou humana, respectivamente, 13,89% (5/36) e 2% (1/50). Em ambas as situações, os índices de resistência para os isolados humanos, estiveram concentrados entre os obtidos a partir

de secreções vaginais. Nesses isolados, o perfil de resistência a esses antibióticos teve suas taxas mantidas em 3,57% (1/28).

A partir das informações apresentadas (tabela 02), o desempenho das amostras de EGB frente à eritromicina e clindamicina pode ser avaliado em função de dois aspectos importantes. A princípio, essas performances merecem ser analisadas em conjunto pelo fato da eritromicina e clindamicina representarem a primeira alternativa como quimioprofilaxia na prevenção de infecções neonatais por EGB, nos casos de intolerância medicamentosa aos β -lactâmicos e por serem reconhecidos como antimicrobianos para os quais têm sido divulgados índices crescentes de resistência por parte desses microrganismos (BOTH et al., 2005). Nesse sentido verifica-se que os índices de resistência a esses antibióticos são mais acentuados entre isolados de origem bovina, 16,67% (6/36) para eritromicina e 22,22% (8/36) para clindamicina, enquanto que apenas 6% (3/50) dos isolados de material clínico humano apresentaram resistência à eritromicina, não se observando resistência à clindamicina entre eles.

Esse mesmo padrão de distribuição de resistência à eritromicina entre subpopulações de EGB de origem humana e bovina foi observado por Duarte et al. (2005), que registraram respectivamente, índices de 23,7% em 38 isolados analisados e 4,6% em um total de 151, na mesma região geográfica das amostras usadas no presente estudo. Entretanto, nessas duas ocasiões os resultados obtidos são conflitantes aos observados por Dogan et al. (2005) nos Estados Unidos, onde o índice de resistência a eritromicina foi de 26,9% para 52 isolados de origem humana e 3,6% para 83 isolados de origem bovina. Nesse mesmo estudo, verificou-se que o perfil de resistência nos isolados de origem bovina à clindamicina foi de 7,8%, enquanto que para os de origem humana, o índice foi de 3,6%, diferenciando-os, sobremaneira, aos observados na tabela 02.

A polêmica nesse aspecto torna-se ainda mais acentuada quando se verifica que os índices de resistência a eritromicina, nos isolados de origem humana obtidos em Taiwan por Huseh et al. (2001), atingiram 46,62% para uma amostragem de 266 isolados. Para a resistência a clindamicina, o índice observado foi de 39,9%. Esses pesquisadores também registraram uma evolução no índice de resistência à eritromicina de 19% em 1994, para 46% em 2000, e de 18% para 37% em relação à clindamicina no mesmo período. Esses dados são resultados de um estudo envolvendo 978 isolados e, passou a ser um importante argumento para a convicção de alguns autores da evolução dos índices de resistência dos EGB aos macrolídeos e a clindamicina.

Contudo, esses índices alarmantes de resistência aos macrolídeos e clindamicina não têm sido confirmados por outros grupos de pesquisadores e podem ter uma conotação apenas geográfica e limitada. Todavia se verifica que, a distribuição das amostras resistentes de EGB à eritromicina e a clindamicina entre os vários continentes não parece obedecer a um padrão comum, e apresenta variações associadas a condições específicas. Na América do Norte, verifica-se que os índices de resistência das amostras humanas de EGB a eritromicina estão distribuídos em dois níveis. O menor nível pode ser exemplificado como os observados por Fernandez et al. (1998) ao avaliar 229 isolados, no estado do Texas/EUA e Azavedo et al. (2001) ao avaliar 178 isolados no Canadá, obtendo percentuais de 7,4% e 8%, respectivamente. Em um patamar mais alto, podem ser identificados os resultados de Heelan et al. (2004), ao avaliar 200 isolados, Simões et al. (2004), ao avaliar 52 isolados e Dogan et al. (2005) que revelaram percentuais respectivamente, de 22%, 25% e 26,9% de resistência a eritromicina por isolados regionais de EGB de origem humana em três diferentes estados americanos, Massachusetts, Texas e Nova York. Em relação ao padrão de resistência dos isolados de *S. agalactiae* a clindamicina na América do Norte, verificou-se que com exceção dos estudos de Simões et al. (2004) onde percentuais de 19,2% foram relatados, os demais acima citados mantiveram percentuais entre 3,4% e 6,0%.

Na Europa, os percentuais de resistência à eritromicina e clindamicina também tem apresentado flutuações sazonais e geográficas. Na Espanha Betriu et al. (2003) descreveram a evolução desses percentuais entre 4,7% e 18,02% para eritromicina e entre 0,8% e 12,8% para clindamicina com base em um estudo no período entre 1992 e 2001, envolvendo 1462 isolados de EGB de origem humana. Em um levantamento posterior, e com uma abrangência equivalente, Marimon et al. (2005) relataram percentuais de 11,02% resistentes a eritromicina nos 1171 isolados de *S. agalactiae* analisados. Na França, Mouy et al. (2001) avaliaram 126 isolados e Poyart et al. (2003) avaliaram 664 isolados, detectando 21,4% e 15,4% de resistência a eritromicina e 17,5% e 10,6% a clindamicina, respectivamente. Apresentando uma menor variação entre eles, quando comparados aos índices detectados na Espanha.

Entre alguns países ou regiões orientais, também se verifica uma grande variação nos percentuais de resistência, nos isolados humanos de EGB a eritromicina e clindamicina. No Japão, os registros de Matsubara et al. (2001) indicam que esses índices sejam relativamente baixos, 3% para eritromicina e 1% para clindamicina, em um estudo envolvendo 212 isolados. No entanto, através do estudo de Zeng et al. (2006)

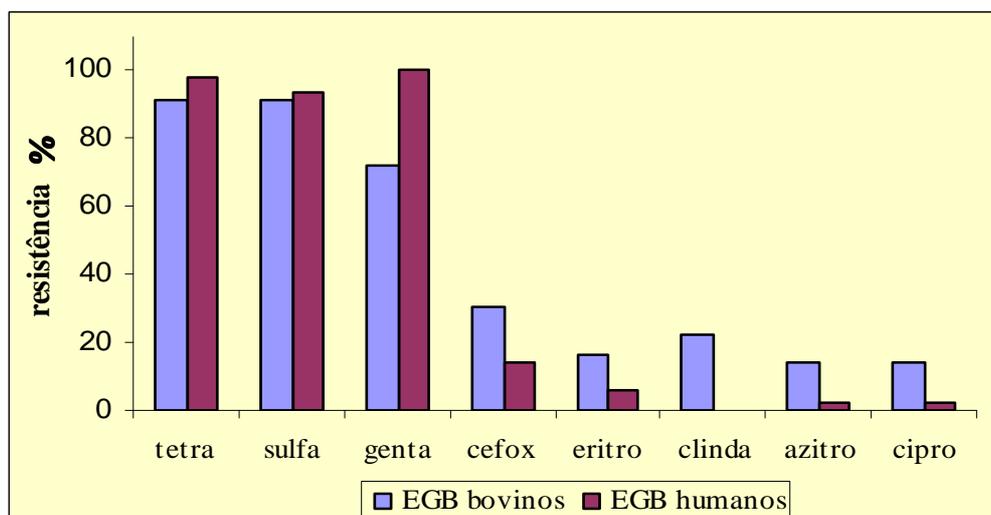
pode se verificar importantes diferenças nos percentuais de resistência de EGB a esses antimicrobianos, entre 132 amostras isoladas em Hong Kong, 118 na Coreia do Sul e 76 na Austrália. Nessa seqüência observam-se percentuais de 24%, 11% e 7% de isolados resistentes à eritromicina e 12%, 15% e 3% de resistência a clindamicina. Nessa relação, destacam-se as baixas taxas observadas na Austrália, que supostamente estariam relacionadas ao seu isolamento geográfico, e os expressivos índices observados em Honk Kong. Diferentemente das condições anteriormente descritas, observa-se uma inversão entre os valores das taxas de amostras resistentes a eritromicina e clindamicina detectadas na Coreia do Sul, um cenário similar ao observado entre as amostras de origem bovina nesse estudo. Na Nova Zelândia, outra região caracterizada por um isolamento geográfico, estudos recentes de Werno; Anderson, (2003), Malbruny et al. (2004) e Zeng et al. (2006) também indicaram uma prevalência dos índices de resistência à clindamicina em relação aos da eritromicina entre as amostras humanas de EGB isoladas no período. Os índices de resistência a clindamicina variaram entre 11% e 16% enquanto os percentuais de resistência a eritromicina se mantiveram entre 6% e 11%, um nível um pouco superior aos observados na Austrália.

De uma forma geral, os dados da tabela 02 apontam a possibilidade de que a caracterização dos fenótipos de resistência a alguns dos antimicrobianos testados, tetraciclina, sulfametoxazol, gentamicina, cefoxitina, eritromicina, clindamicina, azitromicina e ciprofloxacina pode representar uma forma de diferenciar fenotipicamente amostras de EGB de origem animal ou humana. No gráfico 01 estão relacionados os dados que sugerem essa possibilidade, com o objetivo de destacar as variações entre os índices de resistência antimicrobiana observados nas amostras animais e humanas.

Os dados observados no gráfico evidenciam que, a resistência antimicrobiana prevalece nos isolados de animais em relação aos obtidos a partir de espécimes clínicos humanos. No presente estudo, verifica-se que as exceções ocorrem principalmente onde se detecta os maiores índices de resistência antimicrobiana, a exemplo da tetraciclina, sulfametoxazol e gentamicina.

No gráfico também se destaca a região que apresenta os percentuais de resistência a cefoxitina, eritromicina, clindamicina, azitromicina e ciprofloxacina, que se caracteriza por ter os índices de resistência dos isolados bovinos predominantes sobre os isolados humanos.

Gráfico 01. Perfil fenotípico de resistência antimicrobiana dos isolados de EGB de leite bovino e espécimes clínicos humanos.



4.3. Caracterização dos isolados de *Streptococcus agalactiae* com base no perfil de resistência a tetraciclina e ao fenótipo MLS_B

Na tabela 03, estão representados os resultados da avaliação da resistência dos isolados de EGB usados neste trabalho frente a oxitetraciclina, pelo método da concentração mínima inibitória. Esse procedimento foi aplicado para estabelecer bases comparativas entre nossas observações e dados referendados por literatura específica, e como etapa inicial, para caracterizar as amostras de *S. agalactiae* usando como parâmetros a resistência a oxitetraciclina e a expressão do fenótipo MLS_B.

Tabela 03. Perfil de resistência de amostras de EGB à tetraciclina pela técnica da concentração mínima inibitória.

| Técnica | Perfil de Resistência a oxitetraciclina (%) MIC > ou = 8 µg/mL | | | | |
|-----------------------|--|-----------------|------------------|---------------------|-----------------|
| | Isolados Animal | | Isolados Humanos | | |
| | Leite (n=36) | Sangue (n=4) | Urina (n=18) | Secreções (n=28) | Total (n=50) |
| Microdiluição em ágar | 77,8 (28/36) | 75 (3/4) | 88,9 (16/18) | 100 | 94 (47/50) |

Os índices descritos nessa tabela diferem dos observados como resultado da aplicação da técnica de disco de difusão, especialmente no percentual de resistência dos isolados de origem bovina e dos isolados a partir de urina humana. Nos isolados bovinos o percentual de resistência retraiu de 91,7% (33/36) para 77,8% (28/36), enquanto os isolados de urina humana a diferença foi de 94,4% (17/18) para 88,9% (16/18). Contudo, mesmo com a retração dos índices observados pela aplicação da técnica do MIC, verifica-se que o perfil global de resistência a oxitetraciclina dos isolados de origem humana nesse trabalho mantém-se em um patamar superior à maioria das amostras estudadas por outros autores que aplicaram a mesma técnica. Fernandez et al., (1998) registraram índices de 64% ao avaliar a resistência a esse antimicrobiano de 229 isolados de EGB a partir de espécimes clínicos similares.

Na Europa, registrou-se 64% em um estudo avaliando 113 isolados na França (POYART et al., 2003) e 32% para 205 isolados na Espanha (BETRIU et al., 2004). No Japão, observaram-se índices de 26% de resistência a tetraciclina entre 212 isolados de EGB humanos (MATSUBARA et al., 2001).

No presente trabalho destacou-se o fato de que, os isolados de EGB avaliados como resistentes a tetraciclina também manifestaram resistência à eritromicina.

Na tabela 04 está relacionado o resultado da pesquisa do fenótipo de resistência aos macrolídeos pelo método do duplo disco dos isolados de EGB resistentes a eritromicina.

Tabela 04. Caracterização do fenótipo MLS_B em isolados de EGB através do estabelecimento do padrão de resistência aos macrolídeos pela técnica de difusão pelo método do duplo disco.

| Fenótipo de Resistência | Perfil de Resistência aos Macrolídeos (%) (2 µg de clindamicina e 15 µg de eritromicina) | | | | |
|-------------------------|--|-----------------|------------------|---------------------|-----------------|
| | Isolados Animal | | Isolados Humanos | | |
| | Leite (n=36) | Sangue (n=4) | Urina (n=18) | Secreções (n=28) | Total (n=50) |
| c MLS_B | 13,89 (5/36) | - | - | - | - |
| M | 2,78 (1/36) | - | 5,56 (1/18) | 7,14 (2/28) | 6 (3/50) |

No universo dos isolados estudados neste trabalho, apenas nove mostraram-se resistentes à eritromicina, correspondendo a 10,47% do conjunto analisado, das quais seis foram isolados a partir de leite bovino e três foram obtidos a partir de material humano. Dentro desse limite, verificou-se que o fenótipo cMLS_B prevaleceu entre os isolados bovinos com cinco amostras, e apenas um fenótipo M, que representaram respectivamente 13,89% (5/36) e 2,78% (1/36) do conjunto de origem animal. Entre os isolados de origem bovina, o fenótipo cMLS_B correspondeu a 83,33% (5/6) e o fenótipo M, 16,67%.

Nesses resultados, o fenótipo M foi o único detectado, entre os três isolados humanos resistentes a eritromicina submetidos ao teste do duplo disco.

Na caracterização dos isolados resistentes a eritromicina, em relação ao fenótipo MLS_B, o presente trabalho pode ser correlacionado com os estudos de Duarte et al. (2005), que ao investigarem em circunstâncias semelhantes 189 isolados de EGB, 38 bovinos e 151 humanos, obtiveram 16 isolados, 8,5% do conjunto analisado, resistentes à eritromicina.

Verifica-se como atributo comum a ambos os estudos, que todas as amostras resistentes a eritromicina também se mostraram refratárias à ação antimicrobiana da tetraciclina. Verifica-se ainda que as taxas de resistência a eritromicina de 23,7% e 4,6%, respectivamente para os isolados bovinos e humanos observados anteriormente, não se diferenciam de forma acentuada no presente trabalho.

Diferentes estudos oferecem a oportunidade de se verificar uma distribuição geográfica variada dos fenótipos MLS_B em *S. agalactiae* de origem humana. Na América do Norte, há registros de estudos onde o fenótipo iMLS_B predomina com 47,7% seguido por cMLS_B com 27,3%, e o fenótipo M com 25% (HEELAN et al., 2004). Na Europa, verificou-se um predomínio do fenótipo cMLS_B com taxas entre 53,7% ao ser avaliado em 54 isolados, (CULEBRAS et al., 2002) e 70,4% na avaliação de 27 isolados (MOUY et al., 2001) sobre o iMLS_B com índices 22,2% com o mesmo número de isolados avaliados (MOUY et al., 2001) e 37% (CULEBRAS et al., 2002) em 54 isolados e finalmente o fenótipo M com percentuais entre 3,9% em 156 isolados avaliados, (BETRIU et al., 2003) e 9,3% na avaliação de 54 isolados, (CULEBRAS et al., 2002). No oriente, também se verificou um predomínio dos fenótipos cMLS_B entre as amostras de *S. agalactiae* resistentes a tetraciclina isoladas a partir de espécimes clínicos humanos, que apresentaram índices entre 58,2% em 512 isolados (ZENG et al., 2006) e 85,5% em 266 isolados, (HSUEH et al., 2001). Para essa parte do mundo,

os estudos acima registraram o fenótipo iMLS_B com percentuais de 0,8% (HSUEH et al) e 14,9% (ZENG et al., 2006). Na mesma seqüência, verifica-se que as taxas do fenótipo M mantiveram-se entre 13,7% e 26,9%, e completam uma relação de percentuais que não apresentam uma correlação claramente definida, com os resultados obtidos no presente estudo.

4.4. Caracterização genotípica dos isolados de *S. agalactiae* através da detecção dos genes de resistência à tetraciclina pela técnica de PCR

O resultado da aplicação da técnica de PCR para identificar seqüências típicas dos genes *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)* mostra a amplificação de fragmentos de DNA de 1.159 pb, 1.077 pb, 1.892 pb, 1.723 pb, respectivamente. As figuras 02 e 03 exemplificam os resultados e a tabela 05 a freqüência das características genotípicas de resistência à tetraciclina entre os isolados de EGB estudados. .

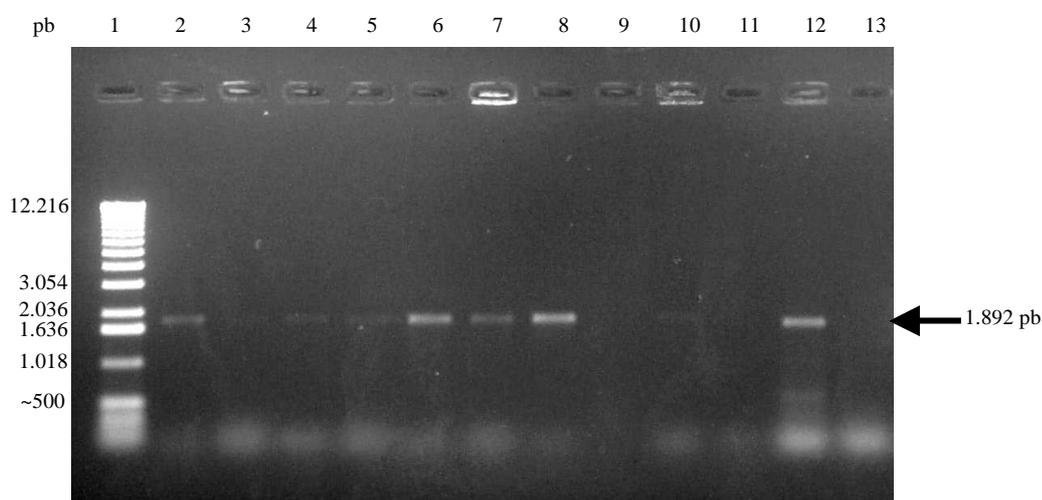


Figura 02. Eletroforese em gel de agarose dos produtos das reações de PCR para amplificação do gene *tet(M)*. 1. Marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen), 2. controle positivo para o gene *tet(M)*, 3 a 12. isolados de *S. agalactiae*, 13. controle negativo.

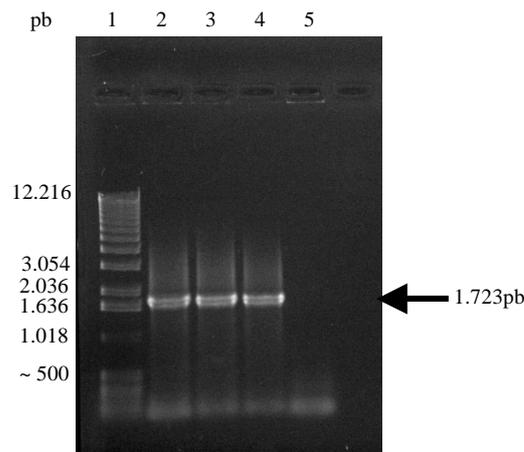


Figura 03. Eletroforese em gel de agarose dos produtos das reações de PCR para amplificação do gene *tet(O)*. 1. Marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen), 2. controle positivo para o gene *tet(O)*, 3 e 4. isolados de *S. agalactiae*, 5. controle negativo.

Tabela 05. Distribuição de características genótípicas de resistência à tetraciclina entre os isolados de EGB estudados.

| Genes | Número de Amplificações por Grupo de Amostras Analisadas % | | | | |
|---------------|--|-----------------|------------------|---------------------|-----------------|
| | Isolados Animal | | Isolados Humanos | | |
| | Leite (n=36) | Sangue (n=4) | Urina (n=18) | Secreções (n=28) | Total (n=50) |
| <i>tet(M)</i> | 13,9 (5/36) | 25 (1/4) | 11 (2/18) | 14,3 (4/28) | 14 (7/50) |
| <i>tet(O)</i> | 30,6 (11/36) | - | 16,7 (3/18) | 7 (2/28) | 10 (5/50) |
| <i>tet(K)</i> | - | - | - | - | - |
| <i>tet(L)</i> | - | - | - | - | - |

Nesses resultados, verifica-se a princípio que apenas seqüências dos genes de resistência *tet(M)* e *tet(O)* foram amplificadas, fato que indica uma prevalência de mecanismos de proteção ribossomal, sobre os processos envolvendo bombas de efluxo, associados às membranas da célula microbiana. Entre o grupo de isolados a partir de leite bovino, evidencia-se um predomínio de amplificações de seqüências de oligonucleotídeos do gene *tet(O)* em relação às de *tet(M)*. Destaca-se também o fato

que entre os cinco isolados bovinos que apresentaram seqüências de *tet(M)*, três também apresentaram resultados positivos para a presença de *tet(O)*.

Em relação aos isolados humanos, verifica-se que houve uma pequena diferença entre as amplificações das seqüências identificadas com o gene *tet(M)* do que com o *tet(O)*. Nesse grupo, também foi verificado que uma entre as amostras positivas para PCR de seqüência de genes de resistência a tetraciclina, apresentou duplicidade de amplificação de oligonucleotídeos, característico de *tet(M)* e *tet(O)*.

O percentual de amplificação de seqüências do gene *tet(M)* são equivalentes entre os grupos de isolados de origem bovina e humana, respectivamente 13,9% (5/36) e 14% (7/50). Entretanto, quando se refere à amplificação de seqüências do gene *tet(O)*, a relação entre esses índices é amplamente favorável ao grupo das amostras de origem bovina em comparação às humanas, com percentuais de 30,6% (11/36) e 10% (5/50).

Os resultados obtidos no presente trabalho se alinham com os estudos de Duarte et al. (2005) e Dogan et al. (2005), uma vez que, esses autores já se referiam à forma diferenciada como o genótipo de resistência à tetraciclina se manifestava entre isolados de origem bovina e humana. Esses trabalhos, bem como nossos estudos, indicam que os genes *tet(M)* predominam entre os isolados de origem humana, enquanto os genes *tet(O)* prevalecem no grupo de isolados de origem bovina. Dogan et al. (2005), registraram que 83,33% dos isolados de EGB bovinos estudados e resistentes a tetraciclina, carregavam genes *tet(O)* em seu genoma, enquanto que os isolados resistentes a tetraciclina de material clínico humano, a identificação de seqüências de genes *tet(M)* foi unânime. Da mesma forma, Duarte et al. (2005) identificaram o gene *tet(O)* em 71,06% (27/38) dos isolados resistentes à tetraciclina no grupo bovino, enquanto que 92,1% (139/151) dos isolados do grupo humano analisados, apresentavam seqüências identificadas estruturalmente com o gene *tet(M)* em seus genomas.

Esses eventos indicam que entre grupos de *S. agalactiae*, a forma diferenciada com que os genes de resistência à tetraciclina são segregados, especialmente *tet(M)* e *tet(O)*, podem representar um marcador genético importante para a caracterização de populações biologicamente definidas desses microrganismos. Diferentes estudos envolvendo a caracterização de isolados de EGB, a partir de espécimes clínicos humanos, e que sistematicamente demonstraram a prevalência da detecção de *tet(M)*, sobre os demais genes de resistência à tetraciclina, reforçam essa possibilidade. Dessa forma, os estudos onde se relata a supremacia dos percentuais de amostras resistentes à tetraciclina que carregam seqüências genômicas compatíveis com *tet(M)* em relação aos

demais genes, a exemplo de Culebras et al. (2002), 65,6% (31/47 isolados), Poyart et al. (2003), 83% (78/94 isolados) e Zeng et al. (2006), 83,2% (426/512) também contribuem para corroborar os resultados descritos acima.

5. CONCLUSÕES

A manifestação de características fenotípicas consideradas padrão dentro do esquema de identificação de *Streptococcus agalactiae*, como a atividade hemolítica e resistência a bacitracina, diferem significativamente entre populações microbianas de origem animal e humana corroborando com os dados da literatura.

A observação de alta frequência do fenótipo de resistência à tetraciclina entre os isolados de EGB bovinos e humanos, desperta interesse e aponta a necessidade de monitoramento desse evento.

De modo geral, detectou-se um perfil de resistência antimicrobiana prevalente nos isolados de animais em relação às obtidas a partir de espécimes clínicos humanos corroborando com os dados da literatura.

A forma diferenciada como os genes de resistência à tetraciclina são segregados, especialmente *tet(M)* e *tet(O)*, pode representar um marcador genético importante para a caracterização complementar de populações biologicamente definidas desses microrganismos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, E. Estreptococo do grupo B: rastrear ou não rastrear no Brasil? Eis a questão. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.27, n.4, 2005.

ANDERSEN, H.J.; PEDERSEN, L.H.; AARESTRUP, F. M.; CHRIÉL, M. Evaluation of the surveillance program of *Streptococcus agalactiae* in danish dairy herds. **J Dairy Sci**, v.86, n.4, p.1233-1239, 2003.

AZAVEDO, J.C.S.; MCGAVIN, M.; DUNCAN, C.; LOW, D.E.; MCGEER, A. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive group B Streptococcus isolates from Ontario, Canada. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.12, p.3504-3508, 2001.

BAKER, C.J. Group B streptococcal infections in neonates. **Pediatr Rev**, v.1, n.1, p.5-15, 1979.

BERALDO, C.; de BRITO, A.S.J.; SARIDAKIS, H.O.; MATSUO, T. Prevalência da colonização vaginal e anorretal por estreptococo do grupo B em gestantes do terceiro trimestre. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.26, n.9, p.543-549, 2004

BETRIU, C.; GOMEZ, M.; SANCHEZ, A.; CRUCEYRA, A.; ROMERO, J.; PICAZO, J. J. Antibiotic resistance and penicillin tolerance in clinical isolates of group B streptococci. **Antimicrob Agents Chemother**, v.38, n.9, p.2183-2186, 1994.

BETRIU, C.; CULEBRAS, E.; GÓMEZ M., RODRÍGUEZ-AVIAL, I.; SÁNCHEZ B.A.; ÁGREDA, M. C.; PICAZO, J.J. Erythromycin and clindamycin resistance and telithromycin susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, n.3, p.1112-1114, 2003.

BETRIU, C.; CULEBRAS, E.; RODRIGUEZ-AVIAL, I.; GOME'Z, M.; SA'NCHEZ, B. A.; PICAZO, J. J. In vitro activities of tigecycline against erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*: mechanisms of macrolide and tetracycline resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.1, p.323-325, 2004.

BISHARAT, N.; CROOK, D.W.; LEIGH, J.; HARDING, R.M.; WARD, P.N.; COFFEY, T.J.; MAIDEN, M.C.; PETO, T.; JONES, N. Hyperinvasive neonatal group B Streptococcus has arisen from a bovine ancestor. **J Clin Microbiol**. v.42, n.5, p.2161-2167, 2004.

BLISS, S.J.; MANNING, S.D.; TAFOXMAN, B. Group B Streptococcus colonization in male and nonpregnant female university students LLMAN, P.; BAKER, C.J BAKER, C.J.; PEARLMAN, M.D.; MARRS, C.F.:: a cross-sectional prevalence study. **Clin Infect Dis**, v.34, n.2, p.184-190, 2002.

BOHNSACK, J.F.; WHITING, A.A.; MARTINEZ, G.; JONES, N.; ADDERSON, E.E.; DETRICK, S.; BLASCHKE-BONKOWSKY, A.J.; BISHARET, N.;

GOTTSCHALK, M. Serotype III *Streptococcus agalactiae* from bovine milk and human neonatal infections. **Emerg Infect Dis**, v.10, n.8, p.1412-1418, 2004.

BORGER, I.L.; D'OLIVEIRA, R.E.C.; CASTRO, A.C.D.; MONDINO, S.S.B. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.27, n.10, p.575-579, 2005.

BOTH, U.V.; BUERCKSTUEMMER, A.; FLUEGGE, K.; BERNER, R. Heterogeneity of genotype-phenotype correlation among macrolide-resistant *Streptococcus agalactiae* isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.7, p.3080-3082, 2005.

BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Vet J**, v.164, n.2, p.116-128, 2002.

BROCHET, M.; COUVÉ, E.; ZOUINE, M.; VALLAEYS, T.; RUSNIOK, C.; LAMY, M.-C.; BUCHRIESER, C.; TRIEU-CUOT, P.; KUNST, F.; POYART, C.; GLASER, P. Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. **Microbes Infect**, v.8, n.5, p.1227-1243, 2006.

BROWN, J. H., The cultural differentiation of beta hemolytic streptococci of human and bovine origin. **J. Exp. Med**, v. 31, p. 35-47, 1920.

CARNEIRO, A.V. Viabilidade Técnica e Impacto Econômico da Erradicação de *Streptococcus agalactiae* em Rebanhos Bovinos, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Tese de Doutorado, 2006.**

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.65, n.2, p.232-260, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. CLSI document M2-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa, 2006.

CULEBRAS, E.; RODRIGUEZ-AVIAL, I.; BETRIU, C.; REDONDO, M.; PICAZO, J.J. Macrolide and tetracycline resistance and molecular relationships of clinical strains of *Streptococcus agalactiae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, n.5, p.1574-1576, 2002.

D'OLIVEIRA, R.E.C. Suscetibilidade aos antimicrobianos e Caracterização da Resistência à Eritromicina em Estreptococos β -Hemolíticos, **Universidade Federal do Rio de Janeiro, Dissertação de Mestrado, 2002.**

DERMER, P.; LEE, C.; EGGERT, J.; FEW, B. A history of neonatal group B streptococcus with its related morbidity and mortality rates in the United States. **J Pediatr Nurs**, v.19, n.5, p.357-363, 2004.

- DEVRIESE, L.A. Streptococcal ecovars associated with different animal species: epidemiological significance of serogroups and biotypes. **J Appl Bacteriol**, v.71, p.478-483, 1991.
- DINSMORE, R.P.; ENGLISH, P. B.; GONZALEZ, R.N.; SEARS, P.M.; SCHULTE, H.F. Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle. **J Dairy Sci** , v.74, n.5, p.1521-1526, 1991.
- DOGAN, B.; SCHUKKEN, Y.H.; SANTISTEBAN, C.; BOOR, K.J. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. **J Clin Microbiol**, v.43, n.12, p.5899–5906, 2005.
- DUARTE, R.S.; MIRANDA O.P.; BRUNA C.B.; BRITO, M.A.V.P.; TEIXEIRA, L.M. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. **J Clin Microbiol**, v.42, n. 9, p.4214–4222, 2004.
- DUARTE, R.S.; BELLEI, B.C.; MIRANDA, O.O.; BRITO, M.A. V.P.; TEIXEIRA, L.M. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.1, p.97-103, 2005.
- EDWARDS, M. S.; BAKER, C. J. Group B streptococcal infections in elderly adults. **Clin Infect Dis**.v.41, p.839-847, 2005.
- EGGERT, J.; FEW, B. A history of neonatal group B streptococcus with its related morbidity and mortality rates in the United States. **J. Pediatr Nurs**, v.19, n.5, p.357-363.
- EKIN, I.H.; GURTURK, K. Characterization of bovine and human group B streptococci isolated in Turkey. **J Med Microbiol**, v.55, n.5, p.517-521, 2006.
- ESTUNINGSIH, S.; SOEDARMANTO, I.; FINK, K.; LÄMMLER, C.; WIBAWAN, I. W. T. Studies on *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Indonesia. **J Vet Med**, v.49, n.4, p.185-187, 2002.
- FACKLAM, R.R. Streptococci. In LENNETTE E.H.; SPAULDING E.H.; TRUANT, J.P. (EDS). *Manual of Clinical Microbiology* 2nd edition. American Society for Microbiology. Washington DC. 1974.
- FACKLAM, R.R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clin Microbiol Rev**, v.15, n. 4, p.613–630, 2002.
- FERNANDEZ, M.; HICKMAN, M.E.; BAKER, C.J. Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated between 1992 and 1996 from patients with bacteremia or meningitis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.42, n.6, p.1517-1519, 1998.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; CARNEIRO, D.O.; FARIA, F.C.; COSTA, G.M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo

(*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.58, n.4, p.678-680, 2006.

FINCH, L. A.; MARTIN, D. R. Human and bovine group B streptococci: two distinct populations. **J Appl Bacteriol**, v.57, n.2, 1984.

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

HANSEN, S.M.; ULDBJERG, N.; KILIAN, M.; SORENSEN, U.B.S. Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. **J Clin Microbiol**, v.42, n.1, p.83-89, 2004.

HARDIE, J.M.; WHILEY R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v.83, p.1S-11S, 1997.

HAUGE, M.; JESPERSGAARD, C.; POULSEN, K.; KILIAN, M. Population Structure of *Streptococcus agalactiae* Reveals an association between specific evolutionary lineages and putative virulence factors but not disease. **Infect Immun**, v.64, n.3, p.919-925, 1996.

HEELAN, J.S.; HASENBEIN, M.E.; McADAM, A.J. Resistance of group B streptococcus to selected antibiotics, including erythromycin and clindamycin. **J Clin Microbiol**, v.42, n.3, p.1263-1264, 2004

HÉRY-ARNAUD, G.; BRUANT, G.; PHILIPPE, L.; BRUN, S.; PICARD, B.; ROSENAU, A.; VAN DER MEE-MARQUET, N.; RAINARD, P.; QUENTIN, R.; MEREGHETTI, L. Mobile genetic elements provide evidence for a bovine origin of clonal complex 17 of *Streptococcus agalactiae*. **Appl Environ Microbiol**, v.73, n.14, p.4668-4672, 2007.

HSUEH, P-R.; TENG, L-J.; LEE, L-N.; HO, S-W.; YANG, P-C.; LUH, K-T. High incidence of erythromycin resistance among clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.11, p.3205-3208, 2001.

JAURÉGUY, F.; CARTON, M.; PANEL, PIERRE.; FOUCAUD, P.; BUTEL, M-J.; DOUCET-POPULAIRE, F. Effects of intrapartum penicillin prophylaxis on intestinal bacterial colonization in infants. **J Clin Microbiol**, v.42, n.11, p.5184-5188, 2004.

JOHRI, A.K.; PAOLETTI, L.C.; GLASER, P.; DUA M.; SHARMA, P.K.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. **Nat Rev Microbiol**, v.12, n.4, p.932-942, 2006.

KAWAMURA, Y.; HOU, X.G.; SULTANA, F.; MIURA, H.; EZAKI T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. **Int J Syst Bacteriol**, v.45, n.2, 1995.

KEEFE, G.P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. **Can Vet J**, v.38, n.7, p.429-437, 1997.

KEEFE, G.P.; DOHOO I. R.; SPANGLER, E. Herd prevalence and incidence of *Streptococcus agalactiae* in the dairy industry of prince Edward Island. **Jl Dairy Sci**, v.80, n.3, p.464-470, 1997.

KÖHLER, W. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Int J Med Microbiol**, v.297, p.133 -150, 2007.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. **Diagnóstico Microbiológico**, pag. 577-649, 5.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2001.

LANCFIELD, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **J. Exp. Med**, v.57, p.571–595, 1933.

LANCFIELD, R. C. A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B). **J. Exp. Med**, v.59, p.441-458. 1934.

LAW, M.R.; PALOMAKI, G.; ALFIREVIC, Z.; GILBERT, R.; HEATH, P.; MCCARTNEY, C.; REID, T.; SCHRAG, S. The prevention of neonatal group B streptococcal disease: a report by a working group of the Medical Screening Society **J Med Screen**, v.12, n.2, p.60-68, 2005.

MAJNO, G.; JORIS, I. Billroth and penicillium. *Rev Infect Dis*, v.5, n.1, p.880-884, 1979.

MALBRUNY, B.; WERNO, A.M.; ANDERSON, T.P.; MURDOCH, D.R.; LECLERCQ, R. A new phenotype of resistance to lincosamide and streptogramin A-type antibiotics in *Streptococcus agalactiae* in New Zealand. **J. Antimicrob. Chemother**, v.54, n.6, p.1040–1044, 2004.

MANN, C.; MARKHAM, J.L.A. New method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **J Appl Microbiol**, v.84, p.538-544, 1998.

MANNING, S.D.; FOXMAN, B.; PIERSON C.L.; TALLMAN, P.; BAKER, C.J.; PEARLMAN, M.D. Correlates of antibiotic-resistant group B streptococcus isolated from pregnant women. **Obstet Gynecol**, v.101, n.1, p.74-79, 2003.

MARIMÓN, J.M.; VALIENTE, A.; ERCIBENGOA, M.; GARCÍA-ARENZANA, J.M.; PÉREZ-TRALLERO, E. Erythromycin resistance and genetic elements carrying macrolide efflux genes in *Streptococcus agalactiae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.12, p.5069-5074, 2005.

MARLE, A-V.M.E.; RIJNDERS, M.E.; DOMMELEN P.V.; FEKKES, M.; WOUWE J.P.; AMELINK-VERBURG M.P.; VERKERK, P.H. Cost-effectiveness of different treatment strategies with intrapartum antibiotic prophylaxis to prevent early-onset group B streptococcal disease. **BJOG**, v.112, n.6, p.820 – 826, 2005.

MARTINEZ, G.; HAREL, J.; HIGGINS, R.; LACOUTURE, S.; DAIGNAULT, D.; GOTTSCHALK, M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis. **J Clin Microbiol**, v.38, n.1, p.71-78, 2000.

MATSUBARA, K.; NISHIYAMA, Y.; KATAYAMA, K.; YAMAMOTO G.; SUGIYAMA, M.; MURAI, T.; BABA, K. Change of antimicrobial susceptibility of group B streptococci over 15 years in Japan. **J Antimicrob Chemother**, v.48, p.579-582, 2001.

MEDINI, D.; DONATI, C.; TETTELIN, H.; MASIGNANI, V.; RAPPUOLI, R. The microbial pan-genome. **Curr Opin Genet Dev**, v.15, n.6, p.589-594, 2005.

MEIRE-BENDEK, I.; LIPKIN, E.; FRIEDMANN, A.; LEITNER, G.; SARAN, A.; FRIEDMAN, S.; KASHI, Y. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. **J Dairy Sci**, v.85, n.7, p.1717-1723, 2002.

MERL, K.; ABDULMAWJOOD, A.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. **FEMS Microbiol Lett**, v.226, n.1, p.87-92, 2003.

MONEY, D.M.; DOBSON S. The prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease. **J Obstet Gynaecol Can**, v.26, n.9, p.826-832, 2004.

MOORE, M.R; SCHRAG, S.J.; SCHUCHAT A Effects of intrapartum antimicrobial prophylaxis for prevention of group B streptococcal disease on the incidence and ecology of early-onset neonatal sepsis. **Lancet Infectious Diseases** 3:44, 201-213

MOUY, D.; CAVALLO, J-D.; LECLERCQ, R.; FABRE, R. Antibiotic susceptibility and mechanisms of erythromycin resistance in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae*: French multicenter study. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.8, p.2400-2402, 2001.

MUNDT, J.O. The ecology of the streptococci. **Microb Ecol**. v.8, n.4, p.355-369, 1982.

PICARD, F. J.; BERGERON, M. G. Laboratory detection of group B streptococcus for prevention of perinatal disease. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v.23, n.9, p.665-671, 2004.

POGERE, A.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; FREITAS, P.F.; D'ACAMPORA, A.J.; ZUNINO, J.N. Prevalência da colonização pelo streptococo do grupo B em gestantes atendidas em ambulatório de pré-natal. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.27, n.4, 2005.

POYART, C.; JARDY L.; QUESNE, G.; BERCHE, P.; TRIEU-CUOT, P. Genetic basis of antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French hospital. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, n.2, p.794-797, 2003

PRITCHARD, D.J.; GRAY, B.M.; DILLON, H.C. Characterization of the group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*. **Arch biochem and Biophys**, v.235, n.2, p.385-392, 1984.

SALYERS, A.A.; SHOEMAKER N.B.; STEVENS, A.M.; LI, L.Y. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. **Microbiol Rev**, v.59, n.4, p.579-590, 1995.

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. Group B Streptococcal Disease in the Era of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis. **N Engl J Med**, v.342, n.1, p.15-20, 2000.

SCHUCHAT, A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. **Clin Microbiol Rev**, v.11, n.3, p.497-513, 1998.

SCHUCHAT, A.; WENGER, J. D. Epidemiology of group B streptococcal disease. Risk factors, prevention strategies, and vaccine development. **Epidemiol Rev**, v.16, n.2, p.374-402, 1994.

SIMONES, J.A.; AROUTCHEVA, A.A.; HEIMLER, I.; FARO, S. Antibiotic resistance patterns of group B streptococcal clinical isolates. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v.12, p.1-8, 2004.

SUKHNANAND, S.; DOGAN, B.; AYODELE, M.O.; ZADOKS, R.N.; CRAVER, M.P.J., DUMAS, N.B.; SCHUKKEN, Y.H.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates. **J Clin Microbiol**, v.43, n.3 p.1177-1186, 2005.

TETTELIN, H.; MASIGNANI, V.; CIELSEWICZ, J.; DONATI, C.; MEDINI, D.; WARD, N.L.; ANGIUOLI, 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.; ROSEVITZ, 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. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial "pan-genome". **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n.39, p.13950-13955, 2005.

THONG, K-L.; LING, G.Y.; KONG, L.W.; THEAM, L.C.; NGEOW, Y.F. Macrorestriction analysis of *Streptococcus agalactiae* (group b *Streptococcus*) isolates from Malaysia. **J Med Microbiol**, v.53, n.10, p.991-997, 2004.

TRIJBELS-SMEULDERS M.; A. J. M.; KOLLEE L.A.A.; ADRIAANSE A.H.; KIMPEN J.L.L.; GERARDS L.J. Neonatal group b streptococcal infection: Incidence and strategies for prevention in Europe. **Pediatr Infect Dis J**, v.23, n.2, p.172-173, 2004.

WERNO, A.M.; ANDERSON, T.P.; Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci in New Zealand. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, n.8, p.2710–2711, 2003.

YILDIRIM, A.Ö.; LÄMMLER, CH.; WEIB, R. Identification and characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from horses. **Vet Microbiol**, v.85, n.1, p.31-35, 2002.

ZENG, X.; KONG, F.; WANG, H.; DARBAR, A.; GILBERT, G.L. Simultaneous detection of nine antibiotic resistance-related genes in *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization assay. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, n.1, p.204–209, 2006.