

Título em Português: Similaridade genética de estreptococos do grupo B isolados de humanos na Paraíba

Título em Inglês: Genetic similarity of group B streptococci isolated from humans in Paraíba

Autor: Luciana Roberta Torini de Souza

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

Área de Pesquisa / SubÁrea: Microbiologia Aplicada

Agência Financiadora: CNPq - PIBIC

Similaridade genética de estreptococos do grupo B isolados de humanos na Paraíba

Luciana R. Torini de Souza

Vinicius Piettá Perez

Ilana L. B. C. Camargo

USP (Universidade de São Paulo)

lucianatorini@gmail.com

Objetivos

Determinar a diversidade genética de *Streptococcus agalactiae* (ou GBS, *Streptococcus* do grupo B) através de isolados bacterianos da microbiota humana de pacientes ambulatoriais do Estado da Paraíba e compará-las com isolados de mastites em rebanho leiteiro (bovinos e caprinos), a fim de investigar as relações genéticas da microbiota interespecies e assim permitir, como parte de uma iniciativa maior, a avaliação do impacto dessas nas estratégias de profilaxia e na iminente introdução das vacinas capsulares.

Métodos e Procedimentos

Durante a rotina hospitalar do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) na cidade de João Pessoa-PB foram coletados e isolados diferentes espécimes clínicos de pacientes ambulatoriais, identificados como *S. agalactiae* através de testes fenotípicos (Teste de CAMP, teste de catalase e suscetibilidade trimetoprima+sulfametoxazol) e confirmados em nível de espécie por amplificação dos genes *cfb* e *cpn603*. Os tipos capsulares dos isolados foram identificados por ensaio de PCR multiplex, e assim pudemos determinar os sorotipos de Ia a IX. Foi analisado o perfil antimicrobiano dos isolados frente a diferentes antibióticos: Penicilina, eritromicina, vancomicina, clindamicina, levofloxacina, cloranfenicol, tetraciclina e linezolida através de disco de fusão de acordo com o CLSI. A concentração inibitória mínima (CIM) da

penicilina foi determinada por E-test. Por fim, analisamos a clonalidade dos isolados usando macrorestrição de DNA, com a enzima *SmaI* seguida de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, do inglês *pulsed-field gel electrophoresis*) usando temperatura do sistema de resfriamento a 14 °C, com os parâmetros de execução: Tempo inicial de 5 s, tempo final de 35 s, tempo de execução de 23 h e tensão de 200 V (6 V/cm) através do equipamento CHEF Mapper XA System. Os resultados foram analisados pelo software Bionumerics V 7.1 (Applied Maths) com 1,5% de tolerância e 1% de otimização.

Resultados

Efetuamos a caracterização dos isolados, onde pudemos verificar uma alta diversidade de clones de *Streptococcus agalactiae* entre os pacientes da comunidade de João Pessoa-PB. Setenta e cinco isolados analisados foram agrupados em 45 pulsotipos, que foram nomeados numericamente de 1-45. Quatro isolados eram CPS não tipáveis. Dentre os 45 pulsotipos foram encontrados sete pares e um trio de clones, estando respectivamente nos pulsotipos: 05, 16a, 16b, 16c, 36a, 36b, 37 e 40c. Cinquenta e oito dos setenta e cinco isolados eram resistentes à tetraciclina, uma característica das cepas GBS adaptadas ao homem. Além da resistência à tetraciclina, cinco isolados foram resistentes à clindamicina, três ao cloranfenicol, cinco à eritromicina e um à levofloxacina. Seis isolados mostraram sensibilidade com exposição aumentada, um

para cloranfenicol, três para eritromicina e dois para tetraciclina. Todos os isolados foram suscetíveis à penicilina e as CIM50 e CIM90 foram 0,047mg/L e 0,064mg/L (intervalo de 0,023 a 0,094mg/L). Quanto a sorotipagem, o sorotipo Ia foi o mais prevalente, representando 50,66% dos isolados analisados, seguido de 16% do sorotipo V.

Conclusões

Em conclusão, os sorotipos Ia e V apresentaram a maior ocorrência entre os isolados, embora as infecções em humanos ocorram principalmente por isolados dos sorotipos Ia, Ib, II, III e V, os pacientes da comunidade de João Pessoa - PB ainda podem contar com as principais alternativas antimicrobianas para tratar infecções por GBS.

Referências Bibliográficas

- (1) Aiewsakun P., Ruangchai W., Thawornwattana Y. et al. Genomic epidemiology of *Streptococcus agalactiae* ST283 in Southeast Asia. Sci Rep 12, 4185 (2022).
- (2) Carreras-Abad C, Ramkhelawon L, Heath PT, Le Doare K. A Vaccine Against Group B *Streptococcus*: Recent Advances. Infect Drug Resist. 13:1263-1272, 2020.
- (3) Kerdsin A., Hatrongjit R., Hamada S. et al. Development of a multiplex PCR for identification of β -hemolytic streptococci relevant to human infections and serotype distribution of invasive *Streptococcus agalactiae* in Thailand. Molecular and Cellular Probes, 36, 10–14, 2017.
- (4) Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G, Baldassarri L, Orefici G, Creti R. A Multiplex PCR Assay for the Direct Identification of the Capsular Type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. Journal of Microbiological Methods 80 (2): 212–14, 2010.
- (5) Absalon, J., Segall, N., Block, S. L. et al. Safety and immunogenicity of a novel hexavalent group B *Streptococcus* conjugate vaccine in healthy, non-pregnant adults: a phase 1/2, randomised, placebo-controlled, observer-blinded, dose-escalation trial. The Lancet Infectious Diseases, 21(2), 263–274, 2021
- (6) Raabe, V. N.; Shane, A. L. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*). Microbiology spectrum, v. 7, n. 2, 2019

- (7) Verani, J. R.; Mcgee, L.; Schrag, S. J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC, 2010

Genetic similarity of group B streptococci isolated from humans in Paraíba

Luciana Torini

Vinicius Pietta Perez

Ilana L. B. C. Camargo

USP (Universidade de São Paulo)

lucianatorini@gmail.com

Objectives

To determine the genetic diversity of *Streptococcus agalactiae* (or GBS, group B *Streptococcus*) through bacteria isolated from the human microbiota of outpatients in the state of Paraíba and compare them with mastitis isolates in dairy herds (cattle and goats), in order to investigate the genetic relationships of the microbiota between species and thus allow, as part of a larger initiative, the assessment of the impact on prophylaxis strategies and the introduction of capsular vaccines.

Materials and Methods

During the hospital routine at University hospital Lauro Wanderley (HULW) in João Pessoa-PB (Brazil), different clinical specimens were collected and isolated from outpatients, identified as *S. agalactiae* through phenotypical tests (CAMP test, catalase test and trimethoprim+sulfamethoxazole susceptibility) and confirmed at the specie level by amplification the *cfb* and *cpn603* genes. The capsular types of the isolates were identified by multiplex PCR, and thus we were able to determine the serotypes from Ia to IX. The antimicrobial profile of the isolates against different antibiotics was analyzed: penicillin, erythromycin, vancomycin, clindamycin, levofloxacin, chloramphenicol, tetracycline and linezolid through a fusion disc according to the CLSI. The minimal inhibitory concentration (MIC) of penicillin was determined by E-test.

Finally, we analyzed the clonality of the isolates using *Sma*I DNA macrorestriction, followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using temperature of cooling system is 14 °C. Run parameters: Initial time of 5 s, final time of 35 s, running time of 23 h, and voltage of 200 V (6 V/cm) in a CHEF Mapper XA system. Results were analysed by Bionumerics V 7.1 software (Applied Maths) with 1,5 % tolerance and 1% optimization.

Results

We performed the characterization of the isolates, where we could verify the high diversity of *Streptococcus agalactiae* clones among patients from the of João Pessoa-PB community. 75 analyzed isolates were grouped into 45 pulsotypes, which were numerically named from 1-45. Four isolates were non-typeable CPS. Among the 45 pulsotypes, seven pairs and a trio of clones were found, being respectively in the pulsotypes: 05, 16a, 16b, 16c, 36a, 36b, 37 and 40c. Fifty-eight of seventy-five isolates were resistant to tetracycline, a feature of human-adapted GBS strains. In addition to tetracycline resistance, five isolates were resistant to clindamycin, three to chloramphenicol, five to erythromycin and one to levofloxacin. Six isolates showed sensitivity with increased exposure, one to chloramphenicol, three to erythromycin and two to tetracycline. All isolates were susceptible to penicillin and the MIC₅₀ and MIC₉₀ were 0.047mg/L and 0.064mg/L (range 0.023 to 0.094mg/L). As for serotyping, serotype Ia was the most prevalent, representing 50.66% of the

isolates analyzed, followed by 16% of serotype V.

Conclusions

In conclusion, serotypes Ia and V showed the highest occurrence among the isolates, although infections in humans occur mainly by isolates of serotypes Ia, Ib, II, III and V, patients from the community of João Pessoa - PB can still count on the main antimicrobial alternatives to treat GBS infections.

References

- (1) Aiewsakun P., Ruangchai W., Thawornwattana Y. et al. Genomic epidemiology of *Streptococcus agalactiae* ST283 in Southeast Asia. *Sci Rep* 12, 4185 (2022).
- (2) Carreras-Abad C, Ramkhelawon L, Heath PT, Le Doare K. A Vaccine Against Group B *Streptococcus*: Recent Advances. *Infect Drug Resist.* 13:1263-1272, 2020.
- (3) Kerdsin A., Hatrongjit R., Hamada S. et al. Development of a multiplex PCR for identification of β -hemolytic *streptococci* relevant to human infections and serotype distribution of invasive *Streptococcus agalactiae* in Thailand. *Molecular and Cellular Probes*, 36, 10–14, 2017.
- (4) Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G, Baldassarri L, Orefici G, Creti R. A Multiplex PCR Assay for the Direct Identification of the Capsular Type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Microbiological Methods* 80 (2): 212–14, 2010.
- (5) Absalon, J., Segall, N., Block, S. L. et al. Safety and immunogenicity of a novel hexavalent group B *streptococcus* conjugate vaccine in healthy, non-pregnant adults: a phase 1/2, randomised, placebo-controlled, observer-blinded, dose-escalation trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(2), 263–274, 2021
- (6) Raabe, V. N.; Shane, A. L. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiology spectrum*, v. 7, n. 2, 2019
- (7) Verani, J. R.; Mcgee, L.; Schrag, S. J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC, 2010