

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

PEDRO SOARES DINIZ

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA MULTIPLEX PARA PCR DE IDENTIFICAÇÃO
DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Streptococcus agalactiae***

JOÃO PESSOA

2024

PEDRO SOARES DINIZ

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA MULTIPLEX PARA PCR DE IDENTIFICAÇÃO
DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Streptococcus agalactiae***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Paraíba como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Pietta Perez

JOÃO PESSOA

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D585a Diniz, Pedro Soares.

Avaliação de metodologia multiplex para PCR de identificação de genes de resistência a antibióticos em streptococcus agalactiae / Pedro Soares Diniz. - João Pessoa, 2024.
60 f. : il.

Orientador : Vinícius Pietta Perez.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Infecções estreptocócicas. 2. Profilaxia antimicrobiana. 3. Resistência microbiana a medicamentos. I. Perez, Vinícius Pietta. II. Título.

UFPB/CCS

CDU 616-022.7

PEDRO SOARES DINIZ

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA MULTIPLEX PARA PCR DE IDENTIFICAÇÃO
DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Streptococcus agalactiae***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Paraíba como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Pietta Perez

DATA DE APROVAÇÃO: 18/04/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vinícius Pietta Perez (Orientador) 
Departamento de Fisiologia e Patologia
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente
VINICIUS PIETTA PEREZ
Data: 29/04/2024 21:08:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Gisely Maria Freire Abilio de
Castro
Departamento de Fisiologia e Patologia
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente
 **GISELY MARIA FREIRE ABILIO DE CASTRO**
Data: 29/04/2024 19:15:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha
Gomes
Departamento de Biotecnologia
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente
 **ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES**
Data: 29/04/2024 20:47:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DEDICATÓRIA

Dedico aos que me acompanharam de perto e compartilharam comigo essa árdua e gratificante jornada. Dedico à minha família por seu amor constante e apoio inabalável.

Dedico aos meus amigos próximos, àqueles com corações maiores do que o peito e cujos ombros não se cansam. Aos meus professores, pelo exercício da profissão mais humana e pelo enorme esforço na fundação desse lindo curso. A todos que tornaram possível a realização desse sonho, de coração, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A todos que participaram das pesquisas, pela colaboração e companhia;

Aos professores que me agregaram o profissionalismo, em especial ao meu orientador, que me recebeu sempre pronto para seguir em frente;

À Universidade Federal da Paraíba que, durante tantos anos, foi minha segunda casa e por quem desenvolvi tamanho carinho. Obrigado por fornecer as oportunidades de crescimento profissional;

Aos profissionais de psicologia que resgataram a minha essência e me permitiram encontrar as ferramentas para sempre dar o próximo passo;

À minha melhor amiga, pelo espaço cedido, paciência, incentivo e tempo de qualidade.

Ao meu namorado, pelo carinho, pelo 'bom dia' diário e ajuda;

À minha irmã, pelos esforços, favores, caronas e momentos de companheirismo;

À minha mãe, que me incentiva a crescer como ser humano e pavimenta o meu caminho com dedicação e amor;

Ao meu pai, que estrutura a minha base, me cerca de princípios e me ensina a dignidade;

E aos meus avós, cuja presença na minha vida é um privilégio e que me fazem lembrar de ser criança.

RESUMO

Streptococcus agalactiae é um patógeno oportunista capaz de causar doenças invasivas em recém-nascidos, gestantes e pessoas com baixa imunidade. A doença de início precoce (DIP) e a doença de início tardio (DIT) que acometem os recém-nascidos são provocadas pela bactéria e somam mais de 300.000 casos por ano globalmente e resultam em cerca de 90.000 mortes. A profilaxia antibiótica intraparto (PAI) é recomendada na prevenção dessas doenças, no entanto, a cada ano, observa-se o crescimento da resistência aos antibióticos indicados na PAI em *S. agalactiae*. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que pode ser utilizada para detectar genes de resistência no micro-organismo. Sua variação, a PCR multiplex, permite a amplificação simultânea de múltiplos genes alvo em uma única reação. Ao utilizar oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene de interesse, a PCR multiplex possibilita a redução de tempo para detecção, bem como dos volumes de amostras e de reagentes. Ainda minimiza os riscos de contaminação cruzada e consequentemente aumenta a confiabilidade do diagnóstico. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a aplicabilidade da metodologia multiplexada em PCR de identificação de genes de resistência a antibióticos em *S. agalactiae*. A pesquisa selecionou conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores que atendem aos requisitos para uma reação multiplex e apresentam especificidade aos genes de resistência *erm(A/TR)*, *erm(B)*, *mef(A/E)*, *tet(M)*, ou *tet(O)*. Foi então avaliada a aplicabilidade da metodologia multiplexada para cada conjunto de iniciadores realizando ajustes em suas concentrações e temperaturas de anelamento. Os produtos resultantes de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose e visualizados em transiluminador UV. Com os dados coletados, comparou-se a sensibilidade e especificidade da reação duplex com a reação monoplex. Para o primeiro conjunto composto por *erm(B)*, *mef(A/E)* e *tet(M)* obteve-se nítida visualização de bandas, com sensibilidade estimada em 92,3% e especificidade em 94,1% e ótima correlação de resultados entre as metodologias (kappa = 0,864 (P<0,001)). Para o segundo conjunto composto por *erm(A/TR)* e *tet(O)* obteve-se nítida visualização de bandas com sensibilidade e especificidade estimada em 100% e concordância ideal de resultados entre as metodologias (kappa = 1,000 (P<0,001)). Assim, demonstrou-se que a metodologia multiplexada pode ser empregada com confiança em locais que realizem a pesquisa desses genes.

Palavras-chave: infecções estreptocócicas; profilaxia antimicrobiana; resistência microbiana a medicamentos.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae is an opportunistic pathogen capable of causing invasive diseases in newborns, pregnant women and individuals with low immunity. Early-onset disease and late-onset disease that affect newborns are caused by the bacteria and account for over 300,000 cases annually globally and result in approximately 90,000 deaths. Intrapartum antibiotic prophylaxis is recommended for preventing these diseases, however, each year, resistance to antibiotics indicated in prophylaxis is growing in *S. agalactiae*. The polymerase chain reaction (PCR) is a technique that can be used to detect resistance genes in microorganisms. Its variation, multiplex PCR, allows the simultaneous amplification of multiple target genes in a single reaction. By using specific oligonucleotide primers for each gene of interest, multiplex PCR makes it possible to reduce detection time, as well as sample and reagent volumes. It also minimizes the risks of cross-contamination and consequently increases diagnosis reliability. This work aimed to evaluate the applicability of the multiplexed PCR methodology for identifying antibiotic resistance genes in *S. agalactiae*. The research selected sets of oligonucleotide primers that meet the requirements for a multiplex reaction and present specificity to the resistance genes *erm(A/TR)*, *erm(B)*, *mef(A/E)*, *tet(M)* or *tet(O)*. The applicability of the multiplexed methodology was then evaluated for each set of primers by making adjustments to their concentrations and annealing temperatures. The resulting amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis and visualized using a UV transilluminator. With the collected data, the sensitivity and specificity of the duplex reaction was compared with the monoplex reaction. For the first set composed of *erm(B)*, *mef(A/E)* and *tet(M)* clear visualization of bands was obtained, with sensitivity estimated at 92.3% and specificity at 94.1% and excellent correlation of results between methodologies (kappa = 0.864 (P<0.001)). For the second set composed of *erm(A/TR)* and *tet(O)*, clear visualization of bands was obtained with sensitivity and specificity estimated at 100% and ideal correlation of results between methodologies (kappa = 1.000 (P<0.001)). Thus, it was demonstrated that the multiplexed methodology can be used with confidence in places that carry out research on these genes.

Keywords: streptococcal infections; antimicrobial prophylaxis; microbial drug resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de resistência a antibióticos	18
Figura 2 - Explicação da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	22
Figura 3 - Análise do <i>Multiple Primer Analyzer</i> mostrando a formação de <i>self-dimers</i>	35
Figura 4 - Análise da concentração ideal para os oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) dos genes <i>tet(M)</i> , <i>mef(A/E)</i> e <i>erm(B)</i>	39
Figura 5 - Análise da temperatura ideal para os oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) dos genes <i>tet(M)</i> , <i>mef(A/E)</i> e <i>erm(B)</i>	40
Figura 6 - Análise das combinações de duplex entre os genes <i>tet(M)</i> , <i>mef(A/E)</i> e <i>erm(B)</i>	41
Figura 7 - Análise da combinação triplex dos genes <i>tet(M)</i> , <i>mef(A/E)</i> e <i>erm(B)</i>	41
Figura 8 - Teste para o triplex com amostras aleatórias	42
Figura 9 - Reações em duplicata com o teste da Figura 8	43
Figura 10 - Análise da concentração ideal para os oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) dos genes <i>tet(O)</i> e <i>erm(A/TR)</i>	44
Figura 11 - Análise da temperatura ideal para os oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) dos genes <i>tet(M)</i> , <i>mef(A/E)</i> e <i>erm(B)</i>	45
Figura 12 - Análise da combinação duplex dos genes <i>tet(O)</i> e <i>erm(A/TR)</i>	46
Figura 13 - Teste para o duplex com amostras aleatórias	46
Figura 14 - Reações em duplicata com o teste da Figura 13	47

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Oligonucleotídeos iniciadores para detecção de genes de resistência a antibióticos em <i>Streptococcus agalactiae</i>	27
Quadro 2 – Demonstração das combinações de oligonucleotídeos iniciadores verificados na ferramenta <i>Primer-BLAST</i>	29
Quadro 3 – Perfil genético das amostras escolhidas.	30
Quadro 4 - PCR <i>in silico</i> : tamanho de amplicons [pb] para cada combinação de oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s).....	36
Quadro 5 - Análise da possibilidade de distinção de amplicons das diferentes combinações de genes	37
Quadro 6 - Orientações para a leitura das Figuras de 4 a 14	38
Quadro 7 – Comparação de resultados obtidos pelas metodologias monoplex e triplex	43
Quadro 8 - Comparação de resultados obtidos pelas metodologias monoplex e duplex	47
Quadro 9 - Epidemiologia molecular de genes de resistência no mundo.....	51
Quadro 10 - Diversidade de bactérias portando genes de resistência a antibióticos no Brasil	52
 Tabela 1 - Condições de termociclagem para cada par complementar de oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s)	 31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Caracterização da bactéria.....	13
2.2	Patogenicidade e virulência.....	13
2.3	Epidemiologia e transmissão.....	14
2.4	Triagem e recomendação da profilaxia antibiótica intraparto (PAI)	15
2.5	Resistência bacteriana e caracterização dos genes de resistência de <i>S. agalactiae</i>	16
2.6	Reação em cadeia da polimerase.....	19
2.6.1	Contexto histórico e importância.....	19
2.6.2	Componentes da mistura da reação	19
2.6.3	Princípio da técnica	21
2.6.4	Detecção dos produtos de amplificação	22
2.6.5	Variações da técnica.....	23
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos.....	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	Local, pesquisa guarda-chuva e população de estudo	26
4.2	Pesquisa de genes de resistência e banco de dados	26
4.3	Oligonucleotídeos iniciadores de interesse	27
4.4	Simulação <i>in silico</i> dos conjuntos de oligonucleotídeos e escolha de conjuntos de genes para ensaio multiplexado	28
4.5	Reativação, reisolamento e escolha das amostras	29
4.6	Extração do DNA bacteriano.....	30
4.7	Avaliação da atividade dos oligonucleotídeos iniciadores	30
4.7.1	Estudo das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores na reação	30
4.7.2	Estudo da temperatura de anelamento	32
4.8	Avaliação do desempenho da metodologia multiplexada	32
4.9	Testes para comparação entre métodos monoplex e multiplex	33
4.10	Tratamento das imagens obtidas por eletroforese	33
4.11	Análise estatística	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	Resultados <i>in silico</i>	35

5.2	Análise da reação multiplexada do conjunto de oligonucleotídeos iniciadores <i>tet(M)</i> + <i>mef(A/E)</i> + <i>erm(B)</i>	38
5.3	Análise da reação multiplexada do conjunto de oligonucleotídeos iniciadores <i>tet(O)</i> + <i>erm(A/TR)</i>	44
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus agalactiae, também conhecido como estreptococo do grupo B (EGB), é um patógeno oportunista que pode causar doenças invasivas em recém-nascidos, mulheres grávidas e indivíduos imunocomprometidos. Durante o parto a colonização vaginal por *S. agalactiae* é um fator de risco para infecções neonatais (Wang *et al.*, 2023).

A doença estreptocócica neonatal é classificada em doenças de início precoce (DIP) e doenças de início tardio (DIT), sendo condições que afetam os recém-nascidos. A DIP se manifesta nos primeiros três a seis dias de vida, enquanto a DIT pode aparecer entre o sétimo dia e o terceiro mês de vida (Berner, 2021; Edmond *et al.*, 2012; Halsey *et al.*, 1997).

A incidência global dessas infecções é estimada em mais de 300.000 casos por ano, resultando em cerca de 90.000 mortes de recém-nascidos (Berner, 2021; Edmond *et al.*, 2012; Halsey *et al.*, 1997). De acordo com estimativas publicadas por Gonçalves *et al.* (2022), para a América Latina em 2020, podem ter ocorrido 12.800 casos de DIP, 8.400 casos de DIT e 3.600 óbitos de recém-nascidos resultantes dessas doenças.

Atualmente, a profilaxia antibiótica intraparto (PAI) é recomendada por diversas organizações obstétricas e de ginecologia em todo o mundo para prevenir a doença em recém-nascidos, e a triagem de gestantes para a colonização por *S. agalactiae* é realizada entre a 35ª e 38ª semana de gestação, podendo variar de acordo com as recomendações de diferentes localidades (Dong *et al.*, 2020; FIORELLA *et al.*, 2020).

No entanto, o uso excessivo de antibióticos contribuiu para o surgimento de isolados resistentes a eles, levando à preocupação com a eficácia da profilaxia. Genes relacionados à redução da suscetibilidade a macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B, além de resistência à tetraciclina e da alarmante sensibilidade reduzida a betalactâmicos foram identificados em *S. agalactiae* (Zakerifar *et al.*, 2023).

Portanto, as técnicas de detecção desses genes em *S. agalactiae*, como a PCR, são importantes para monitorar a disseminação desses elementos genéticos e controlar a resistência bacteriana, garantindo o tratamento eficaz (Mullis; Ferré; Gibbs, 1994). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica amplamente utilizada para amplificar sequências de DNA alvo. Ela é realizada em ciclos compostos por etapas de desnaturação, anelamento e extensão do material genético (Elnifro *et al.*, 2000; Mullis; Ferré; Gibbs, 1994). A PCR multiplex, por sua vez, permite a amplificação simultânea de mais de um alvo genético em uma única reação, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) específicos para cada gene de interesse (Elnifro *et al.*, 2000; Henegariu *et al.*, 2018).

No contexto do estudo de genes de resistência em *S. agalactiae*, a utilização da PCR multiplex pode melhorar significativamente a rotina dos laboratórios ao permitir a detecção de diferentes genes de resistência em uma única reação. A PCR multiplex apresenta vantagens em relação à PCR monoplex, como a possibilidade de testar volumes menores de amostras, a redução de risco de contaminação cruzada, a otimização do tempo e a redução dos custos envolvidos, além do aumento da confiabilidade do diagnóstico ao confirmar mutuamente os resultados obtidos (Elnifro *et al.*, 2000; Sudan *et al.*, 2017). Isso posto, o presente trabalho propõe-se a avaliar especificidade e eficiência da aplicação de metodologia de ensaios PCR multiplexados para detecção de genes de resistência em *S. agalactiae*, a fim de trazer os benefícios citados aos laboratórios que usufruem da técnica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da bactéria

Na década de 1930, *Streptococcus agalactiae* foi distinguida de outros estreptococos pela pesquisadora Rebecca Lancefield, em estudos de sepse puerperal. A pesquisa conseguiu isolar a bactéria a partir do leite de vacas com mastite bovina. A produção de leite por vacas infectadas era significativamente menor, vem daí o nome “agalactiae” (Chen, 2019). Embora a colonização do trato vaginal por EGB em mulheres assintomáticas já fosse conhecida, só em 1938 foram publicados três relatos de infecções pós-parto fatais, nos quais a patogenicidade dessa bactéria em seres humanos foi descrita. Em 1970, emergiu como agente de bacteremia e meningite em neonatos e bebês com menos de três meses de idade (Procop, 2020; Raabe; Shane, 2019). Como patógeno, o micro-organismo é até hoje a causa mais importante de corioamnionite, endometrite puerperal e sepse neonatal (Larsen; Sever, 2008).

Reconhecido por ser uma bactéria cocóide Gram-positiva, pertencente à família Streptococcaceae, *Streptococcus agalactiae* é não-móvel, não formadora de esporos e facultativa. Apesar de ser uma bactéria comensal, frequentemente encontrada colonizando os tratos gastrointestinal e geniturinário de adultos saudáveis, é também um patógeno oportunista e pode causar doenças invasivas em recém-nascidos, em mulheres grávidas e em indivíduos imunocomprometidos (Edmond *et al.*, 2012; Hayes; O’Halloran; Cotter, 2020).

S. agalactiae é envolta por uma cápsula polissacarídica e as diferentes composições dos polissacarídeos capsulares permitem classificar os isolados em sorotipos distintos. Havendo a identificação das diferenças na estrutura dos polissacarídeos capsulares, é possível diferenciar os dez sorotipos existentes, conhecidos e nomeados como os sorotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX, sendo os sorotipos Ia, Ib, II, III e V os mais frequentes colonizadores de seres humanos, o sorotipo III é considerado o mais virulento e de maior prevalência em infecções graves (Madrid *et al.*, 2017; Shabayek; Spellerberg, 2018).

2.2 Patogenicidade e virulência

Como patógeno, *S. agalactiae* pode causar infecções em diferentes organismos. Em neonatos e pacientes imunocomprometidos pode provocar bacteremia, sepse, meningite e pneumonia; em adultos, provoca também infecções do trato urinário, osteomielite, artrite séptica e endocardite; em vacas leiteiras, provoca ainda mastite, comprometendo a produção de

leite na indústria; também é patógeno importante de peixes e causa grandes prejuízos na criação em cativeiro de espécies como a tilápia (Liu *et al.*, 2016; Raabe; Shane, 2019).

Ademais, a patogenicidade de *S. agalactiae* se deve à produção de diversos fatores de virulência, a maior parte deles relacionados à progressão da meningite em modelos animais. A cápsula dessas bactérias confere-lhes capacidade de causar doenças ao evitar a ativação do sistema complemento e evitar a fagocitose. Os isolados do tipo III, em particular, apresentam uma cápsula com uma maior quantidade de ácido siálico, uma substância presente em células humanas, o que pode confundir o sistema imunológico do recém-nascido. Além disso, esses espécimes também produzem beta-hemolisina, uma toxina que forma poros e causa a destruição de hemácias e fagócitos. Ainda, a presença de pili auxilia na aderência da bactéria às células do hospedeiro, e a produção de C5a peptidases, enzima que inativa o componente C5a do sistema complemento, compromete a capacidade dos neutrófilos de se movimentarem em direção ao local da infecção. Esses fatores contribuem para a virulência dos isolados de *S. agalactiae* (Hanna; Noor, 2021).

Existem também diferentes proteínas de superfície que aumentam a virulência da bactéria, como por exemplo a Srr-1, uma proteína glicoproteica presente na superfície, que foi recentemente identificada e desempenha um papel importante na adesão e invasão das células endoteliais microvasculares cerebrais humanas, contribuindo para a travessia da barreira hematoencefálica em camundongos. Porém, a maioria desses fatores está envolvida na fase de septicemia da infecção e não na aderência do EGB e na transposição da barreira hematoencefálica. Evidencia-se, assim, a necessidade de realizar mais estudos para identificar os fatores de virulência do EGB, principalmente em relação à sua afinidade pelas meninges e sua capacidade de desencadear infecções tardias (Shabayek; Spellerberg, 2018; Tazi *et al.*, 2010).

2.3 Epidemiologia e transmissão

A incidência global das doenças neonatais causadas por *Streptococcus agalactiae* é estimada em mais de 300.000 casos por ano, resultando na morte de aproximadamente 90.000 crianças anualmente. *S. agalactiae* é reconhecida como o agente causador da DIP e da DIT em recém-nascidos. A DIP ocorre nos primeiros três a seis dias de vida, enquanto a DIT se manifesta após o sétimo dia até o terceiro mês de vida (Berner, 2021; Edmond *et al.*, 2012; Halsey *et al.*, 1997).

Em estudo de estimativa com dados mundiais, calculou-se que mais de 200.000 recém-nascidos tenham desenvolvido a DIP, enquanto aproximadamente 160.000 desenvolveram a DIT, em 2020. Globalmente, estima-se que tenham ocorrido 91.900 mortes em crianças com infecção invasiva por *S. agalactiae* (iSA), com os números mais altos registrados na África subsaariana e na Ásia. Foi ainda realizada uma estimativa da possível carga anual de nascimentos prematuros associados ao *S. agalactiae*, que totalizou cerca de 0,5 milhão, mundialmente. Para o mesmo ano na América Latina, foram estimadas a ocorrência de 12.800 casos de DIP, 8.400 casos de DIT e 3.600 mortes de recém-nascidos causadas pelas doenças estreptocócicas (Gonçalves *et al.*, 2022).

Estima-se que 10 a 30% das mulheres grávidas são portadoras do *S. agalactiae*. A colonização pela bactéria em gestantes é fator de risco para transmissão ao feto de maneira vertical através da placenta ou durante o parto na passagem pelo canal vaginal. Sabe-se que 50% das mães colonizadas transmitem a bactéria para o filho e que, uma vez bem instalado, o micro-organismo pode ser patógeno causador de doenças invasivas neonatais (Wang *et al.*, 2023). Um cenário explicativo para a patogenicidade envolve a colonização inicial do intestino pelo EGB, o que resulta em sua multiplicação dentro do lúmen intestinal, seguida pela invasão do epitélio de revestimento do intestino e a translocação para a corrente sanguínea durante os primeiros dias de vida. Uma vez na corrente sanguínea, a bactéria é capaz de transpassar a barreira hematoencefálica (Tazi *et al.*, 2010).

Os fatores de risco para transmissão materno-fetal incluem o parto prematuro, o rompimento prolongado das membranas, a presença de febre intraparto, a colonização vaginal por *S. agalactiae* durante a gravidez e a falta de administração de profilaxia antibiótica intraparto para mulheres em risco (Hanna; Noor, 2021).

2.4 Triagem e recomendação da profilaxia antibiótica intraparto (PAI)

Embora a idealização da vacinação dos grupos populacionais em risco seja uma estratégia de prevenção desejável, atualmente as vacinas para *S. agalactiae* ainda estão em desenvolvimento. Portanto, as organizações obstétricas e de ginecologia recomendam a administração de PAI (profilaxia intraparto) como medida preventiva para DIP em recém-nascidos, após triagem de colonização de gestantes entre a 35ª e 38ª semana de gravidez (Dong *et al.*, 2020; Fiorella *et al.*, 2020).

A triagem para identificar pacientes grávidas colonizadas por *S. agalactiae* é feita a partir de coleta de amostra realizada nas regiões perianal, retal ou vaginal com uso de *swab*. No

Brasil, uma publicação feita pelo Ministério da Saúde em 2001, chamada Consenso Sobre Uso Racional de Antimicrobianos, promovia o uso racional de medicamentos. Em sua abordagem, a publicação organizava e descrevia conceitos e diretrizes gerais sobre antibioticoterapia e antibioticoprofilaxia para as equipes de saúde. Para pesquisa de colonização por *S. agalactiae*, o Consenso recomendou a triagem de todas as grávidas que tenham entre 35 e 37 semanas de gravidez, ou pacientes com outros fatores de risco. (Aguiar *et al.*, 2023; Brasil. Ministério da Saúde., 2001). O crescimento em cultivo e identificação da bactéria é suficiente para detectar colonização positiva por *S. agalactiae*. A partir disso, recomenda-se administrar a PAI contra a bactéria encontrada, em favor de prevenir a transmissão ao neonato (Hayes; O'Halloran; Cotter, 2020).

A profilaxia intraparto geralmente envolve o uso de amoxicilina ou penicilina durante as horas ativas do parto, com administrações de novas doses a cada quatro horas de trabalho de parto. No entanto, para gestantes alérgicas a esses medicamentos com risco de anafilaxia, é sugerido o uso de clindamicina ou cefazolina. É importante ressaltar que, antes de optar pela clindamicina, é necessário avaliar a suscetibilidade do *S. agalactiae* a esses antibióticos para garantir um tratamento eficaz, considerando que essa bactéria está cada vez mais resistente a ambos os medicamentos. Quando há resistência a múltiplos fármacos, a vancomicina é recomendada como uma alternativa viável (Wang *et al.*, 2015).

2.5 Resistência bacteriana e caracterização dos genes de resistência de *S. agalactiae*

O uso correto de antibióticos é essencial para a preservação da sua eficácia no tratamento de infecções bacterianas como a causada por *S. agalactiae*. No entanto, o uso indiscriminado, sem critérios adequados, como prescrição desnecessária, uso excessivo, uso prolongado e automedicação podem levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos, uma das principais preocupações de saúde pública atualmente, pois tornam as infecções mais difíceis de tratar e podem levar a complicações graves, como septicemia e morte. A resistência bacteriana pode surgir de vários mecanismos como mutação genética, transferência horizontal de genes de resistência entre bactérias e seleção natural de micro-organismos resistentes após exposição a antibióticos (Costa; Silva Junior, 2017). Além disso, o uso inadequado desses medicamentos pode causar efeitos colaterais prejudiciais, como alergias, disbiose intestinal e aumento da susceptibilidade a infecções secundárias (Miranda; Vieira; Souza, 2022).

O uso excessivo da PAI pode contribuir para o surgimento de isolados de *S. agalactiae* resistentes aos antibióticos mais prescritos. Hoje, reconhecem-se ao redor do mundo amostras

com redução da suscetibilidade à família das penicilinas, à eritromicina (macrolídeo) e à clindamicina (lincosamida). Ademais, já se encontram estabelecidas na bactéria resistências de alto nível aos antibióticos das classes dos aminoglicosídeos, além de resistência à tetraciclina (tetraciclina), ciprofloxacina e ofloxacina (fluorquinolonas) e cloranfenicol (anfenicol) (Zakerifar *et al.*, 2023).

Dentre os mecanismos de resistência a antibióticos já descritos, cinco genes estão relacionados à resistência aos antibióticos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas. São os genes *erm(A/TR)*, *erm(B)*, *mef(A/E)*, *lnu(B)* e *lnu(C)*. O fenótipo de resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLS_B) é resultado de mecanismos distintos (Hayes; O'Halloran; Cotter, 2020).

Para os genes *erm*, esse perfil fenotípico de resistência a MLS_B apresenta-se de duas maneiras: de forma induzida (iMLS_B) e de forma constitutiva (cMLS_B). Os dois fenótipos de resistência resultantes dos genes *erm* são devidos à metilação dos alvos ribossomais de ligação dos antibióticos, assim bloqueando a capacidade do antibiótico se ligar ao ribossomo e causar seus efeitos bactericidas e/ou bacteriostáticos. No fenótipo cMLS_B, observa-se resistência simultânea a macrolídeos e a lincosamidas, geradas por um só mecanismo. O gene *erm(B)* codifica um mRNA que, quando traduzido, produz a metilase que agirá no ribossomo impedindo a ligação desses antibióticos (Depardieu *et al.*, 2007).

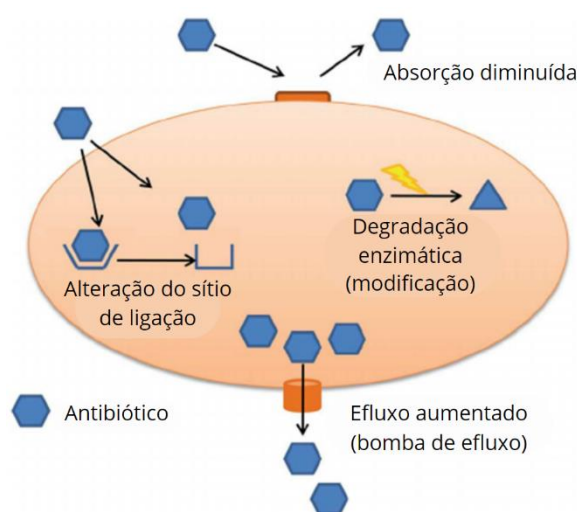
Já no fenótipo iMLS_B, pode-se observar, *in vitro*, de maneira dissociada resistência a macrolídeos e suscetibilidade a lincosamidas devido a diferenças na habilidade de indução da expressão da metilação ribossomal por estes antibióticos. Nesse fenótipo, os genes *erm(A)* produzem um mRNA inativo, que se torna ativo no início da exposição ao antibiótico indutor. Amostras expostas aos macrolídeos indutores, como a eritromicina, azitromicina e claritromicina, apresentarão resistência enquanto, por outro lado, são suscetíveis a macrolídeos não indutores, como a spiramicina, suscetíveis a lincosamidas, como clindamicina, e suscetíveis à estreptogramina B. Apesar das diferenças na ativação da metilação ribossomal o fenótipo iMLS_B resulta em falhas terapêuticas no emprego de lincomicina. (Depardieu *et al.*, 2007).

O gene *mef(A/E)* codifica uma proteína transportadora de efluxo que expulsa eficientemente macrolídeos para fora das células bacterianas, reduzindo assim sua concentração intracelular e diminuindo a sua eficácia. As proteínas Mef utilizam transporte ativo secundário para bombear os antibióticos para fora da célula (Zakerifar *et al.*, 2023).

Os genes *lnu(B)* e *lnu(C)* agem por inativação de lincosamidas ao codificarem uma nucleotidiltransferase que catalisa uma adenilação das moléculas de clindamicina e lincomicina (Hayes; O'Halloran; Cotter, 2020).

A resistência contra tetraciclina configura-se em *S. agalactiae* de duas formas, seja por proteínas de efluxo criadas pelos genes *tet(K)* ou *tet(L)*, ou por proteínas de proteção ribossomal codificadas pelos genes *tet(M)* ou *tet(O)*. As proteínas Tet(K) e Tet(L) são dependentes de energia e estão associadas à membrana celular. Ambas reduzem a concentração intracelular do antibiótico. As proteínas de proteção ribossomal Tet(M) e Tet(O) desalojam a tetraciclina do seu sítio de ligação no ribossomo, permitindo a atividade natural de síntese proteica na célula (Hayes; O'Halloran; Cotter, 2020; Zakerifar *et al.*, 2023).

Figura 1 – Mecanismos de resistência a antibióticos



Fonte: Admassie, (2018).

Nota: o gene *erm(B)* altera o sítio de ligação ribossomal de macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas; o gene *erm(A/TR)* codifica um mRNA que apenas na presença de macrolídeos indutores é capaz de alterar o sítio de ligação ribossomal de macrolídeos, lincoamidas e estreptograminas; o gene *mef(A/E)* confere resistência a macrolídeos por efluxo aumentado; os genes *lnu(B)* e *lnu(C)* conferem resistência a lincosamidas por degradação enzimática; *tet(K)* e *tet(L)* são genes de resistência à tetraciclina e provocam efluxo aumentado do antibiótico; *tet(M)* e *tet(O)* realizam degradação enzimática, desalojando o antibiótico do seu sítio de ligação.

No mais, há relatos de suscetibilidade reduzida à penicilina em *S. agalactiae* devido a substituições de aminoácidos nas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), enzimas que sintetizam a parede celular bacteriana. A emergência desses isolados é preocupante, pois as mutações nas PBPs são consideradas o primeiro passo para uma eventual resistência completa à penicilina, como observado em outros *Streptococos* (Hayes; O'Halloran; Cotter, 2020). No Brasil, ainda não existem relatos de *S. agalactiae* resistentes à penicilina, no entanto, já existem observações de reduções em sua suscetibilidade e aumento das concentrações inibitórias mínimas (Barros, 2023).

A Figura 1 explica de forma simplificada esses mecanismos de resistência.

2.6 Reação em cadeia da polimerase

2.6.1 Contexto histórico e importância

Em prol de estabelecer os mecanismos de resistência a antibióticos, precisa-se confirmar a presença dos genes determinantes de resistência dos isolados. Uma técnica que pode ser realizada para esta investigação é a reação em cadeia da polimerase (PCR), uma estratégia eficiente, sensível e amplamente utilizada para sequenciamento de DNA, pesquisa de genes, identificação de patógenos e diagnóstico de doenças genéticas (Mullis; Ferré; Gibbs, 1994).

A PCR representou um marco na biotecnologia e biologia molecular ao permitir a replicação rápida e precisa de materiais genéticos. A origem dessa técnica é atribuída a Kary Mullins, um bioquímico estadunidense, que trabalhava em uma corporação chamada Cetus, no final dos anos 1980. Sua atribuição na empresa era a pesquisa pela melhoria da síntese de oligonucleotídeos, e a descoberta da PCR rendeu-lhe o prêmio Nobel de química de 1993 (Kaunitz, 2015; Lynch; Rabinow, 1997). Essa inovação teve um impacto significativo em várias áreas como genética molecular, ciências forenses e medicina. A sua simplicidade, velocidade e adaptabilidade do método o tornaram uma ferramenta inestimável na tecnologia do DNA (Henegariu *et al.*, 2018; Mullis; Ferré; Gibbs, 1994).

2.6.2 Componentes da mistura da reação

Utilizando o DNA extraído da bactéria de estudo, a PCR amplifica as sequências genéticas alvo, mimetizando a replicação da dupla fita feita pela célula. Para isto, a reação utiliza ciclos compostos por etapas de desnaturação, anelamento e extensão do material genético.

Durante cada etapa, a reação dispõe de componentes essenciais para mistura. A seguir, uma explicação detalhada de cada um desses componentes. (Elnifro *et al.*, 2000; Mullis; Ferré; Gibbs, 1994; Singh *et al.*, 2014).

I. Taq ou outra polimerase termoestável

Em 1976, a enzima termoestável conhecida como "Taq polimerase" foi extraída da bactéria termófila *Thermus aquaticus* e designada para aplicação na PCR em 1986, devido à sua capacidade de suportar ciclos rápidos de aquecimento e resfriamento, bem como manter atividade em temperaturas elevadas (Singh *et al.*, 2014).

II. DNA molde

A quantidade de DNA requerido para a amplificação de um plasmídeo, ou de um gene simples em uma mistura de reação total de 25 μL varia de 0,05 a 0,5 ng, no entanto para amplificar DNA genômico se faz necessário de 0,05 a 0,5 μg . O uso de uma quantidade maior de DNA molde pode levar à amplificação inespecífica durante a PCR. Ademais, é crucial que o DNA esteja livre de contaminantes, como fenol, EDTA, Proteinase K, etc., pois essas moléculas podem interferir na atividade da Taq DNA polimerase (Singh *et al.*, 2014).

III. Oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) e suas características

A amplificação de um local específico dentro de uma região do genoma requer projetar cuidadosamente os seus oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s), conhecidos em inglês como *primers*. Um O.I. bem sucedido é projetado para ser específico e eficiente. Para que ambas as fitas de DNA participem da amplificação, é projetado um O.I. complementar a ambos os sentidos 5'→3' (*forward*) e 3'→5' (*reverse*).

Algumas das características relevantes de um O.I. são suas temperaturas de desnaturação e de anelamento, seu comprimento, seu conteúdo de guanina e citosina e sua auto complementaridade.

Quanto maior for o comprimento de um O.I., mais específica será a reação de PCR. Sua extensão influencia na temperatura de ligação ao molde. O comprimento ótimo para O.I.s é de 18 a 22 pares de base [pb], por conferir especificidade adequada e fácil ligação ao molde.

O conteúdo de guanina e citosina é considerado, uma vez que uma maior quantidade dessas bases nitrogenadas na sequência requer uma quantidade maior de energia para quebrar as pontes de hidrogênio entre elas durante a desnaturação.

Para a temperatura de desnaturação deve-se selecionar pares de O.I. que desnaturem dentro de uma variação de 5 °C. Deve-se escolher adequadamente, portanto, seu tamanho e o conteúdo de guanina e citosina. A temperatura de desnaturação costuma estar entre 62 e 70 °C.

A temperatura de anelamento dos O.I.s costuma ser de 10 a 15 °C mais baixa que a temperatura de desnaturação e é diretamente proporcional a ela. Anelamento a temperaturas muito altas produzem hibridizações insuficientes entre O.I.s e o DNA molde. Anelamento a temperaturas muito baixas podem produzir produtos inespecíficos devido a um grande número de discordância entre as bases.

O O.I. não deve ser auto complementar ou complementar a outro O.I. na mistura a fim de evitar a formação de dímeros entre eles, o que lhes impede de dimerizar corretamente ao molde (Elnifro *et al.*, 2000; Mullis; Ferré; Gibbs, 1994; Singh *et al.*, 2014).

IV. dNTPs

Os desoxirribonucleotídeos triplamente fosfatados (dNTPs) são os nucleotídeos livres na mistura que irão compor a nova fita de forma complementar ao DNA molde. São compostos por uma base nitrogenada (Adenina, Timina, Guanina ou Citosina), por um açúcar, a desoxirribose, e por 3 grupos fosfatos e estão prontos para serem adicionados durante a atividade da Taq polimerase à sequência. A concentração dos quatro tipos de nucleotídeos em mistura deve ser igual a fim de evitar sua incorporação indevida (Singh *et al.*, 2014).

V. $MgCl_2$

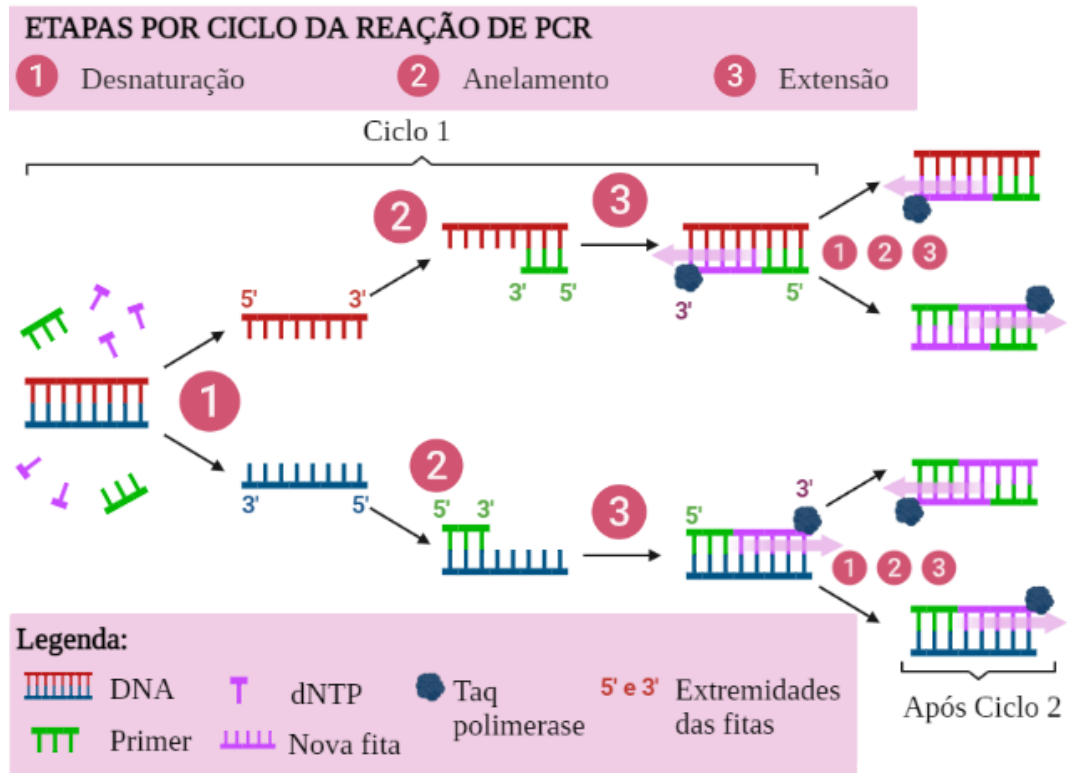
Presente no tampão da mistura, Mg^{2+} é cofator para a DNA polimerase durante a PCR e é agente quelante para os dNTPs, facilitando a polimerização da nova fita (Mullis; Ferré; Gibbs, 1994; Singh *et al.*, 2014).

2.6.3 Princípio da técnica

A Figura 2 demonstra o funcionamento de cada etapa dentro dos ciclos da PCR.

Em cada ciclo, durante a primeira etapa, na desnaturação, a temperatura no tubo de reação é elevada até 90 a 99 °C para que as moléculas de DNA se separem em duas fitas simples capazes de serem acessadas pelos oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) e pela Taq DNA polimerase. Na etapa seguinte, o anelamento, a temperatura será diminuída até a temperatura ideal de ligação das sequências dos O.I.s, entre 50 e 70 °C, ocorrendo o encaixe das sequências específicas para os quais eles foram projetados para hibridizar. Por fim, a etapa de extensão pede a elevação da temperatura da reação aos níveis ótimos de atividade da enzima Taq polimerase, aproximadamente 72 °C, que irá sintetizar as novas cópias de DNA a partir da extremidade 3' do O.I. utilizando-se da disponibilidade de nucleotídeos livres da mistura. As etapas repetem-se em ciclos, criando as condições necessárias para que, a cada repetição, a quantidade de moléculas de DNA alvo seja duplicada. Ao final de algumas horas de reação, temos uma quantidade detectável de cópias do DNA do gene desejado (Mullis; Ferré; Gibbs, 1994).

Figura 2 - Explicação da reação em cadeia da polimerase (PCR)



Fonte: Adaptado de “Polymerase Chain Reaction (PCR)”, por Biorender.com (2023). Recuperado de <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

Nota: A reação de PCR necessita da mistura dos componentes indicado: Taq-DNA polimerase, DNA molde, Oligonucleotídeos iniciadores (na figura indicados como *primers*), dNTPs e $MgCl_2$. A reação ocorre em ciclos compostos por 3 etapas: a primeira etapa chamada desnaturação requer a elevação da temperatura da mistura para ocorrer a separação da dupla fita do DNA molde em fitas simples; a segunda etapa chamada anelamento requer a diminuição da temperatura para permitir o encaixe dos O.I.s nas fitas simples; a terceira etapa chama-se extensão e requer aquecimento para a temperatura ideal de atividade da enzima polimerase que utilizará os dNTPs livres na mistura para construção da nova fita. Com o fim de um ciclo, a quantidade de DNA na mistura terá sido dobrada.

2.6.4 Detecção dos produtos de amplificação

O produto de amplificação da PCR pode ser observado por eletroforese em gel de agarose seguida de transiluminação ultravioleta. O gel é adicionado de um marcador fluorescente para visualização de ácidos nucleicos. As sequências de amplificação, os amplicons, estarão organizados e separados por seu tamanho.

A eletroforese em gel capilar utiliza como princípio a razão carga/volume hidrodinâmico das moléculas para separá-las por eletromigração influenciada pelas reticulações do gel, que age como a matriz de peneiramento. Os amplicons, por serem moléculas de DNA, detêm carga

negativa e são atraídos para o eletrodo positivo durante o processo, no entanto, o gel age permitindo o deslocamento maior dos menores amplicons e atrasa o deslocamento dos maiores. Utilizando-se uma mistura padrão com moléculas de pesos moleculares conhecidos para fazer o comparativo do quanto cada molécula se deslocou, consegue-se aferir os pesos moleculares dos produtos de amplificação visualizados (Hajba *et al.*, 2023; Singh *et al.*, 2014).

2.6.5 Variações da técnica

Além da técnica padrão, hoje existem tipos diferentes de PCR, são eles PCR de Transcrição Reversa (RT-PCR), PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) e a combinação de RT-PCR e qPCR.

RT-PCR possibilita a detecção de níveis de expressão de um RNA criando um DNA complementar (cDNA) a partir do RNA molde com a ajuda de transcriptase reversa; em seguida o cDNA sofre amplificação utilizando PCR padrão. A qPCR utiliza detecção de níveis de fluorescência para medir a amplificação do DNA em cada ciclo de PCR, permitindo a visualização em tempo real do progresso da reação, a análise de sua velocidade e a quantificação de material na amostra inicial; a intensidade da fluorescência está relacionada diretamente à quantidade de DNA formado e o momento durante a reação em que ela se torna mensurável é chamado de ciclo de demarcação, utilizado para calcular a quantidade inicial de DNA ou cDNA. Ambas as técnicas podem ser combinadas para a quantificação da expressão de um RNA (Singh *et al.*, 2014).

Utilizando os mesmos princípios que a original, as variantes da técnica padrão de PCR utilizam-se de modificações na técnica básica. Algumas delas estão descritas a seguir: A PCR alelo-específica procura mutações conhecidas pontuais no DNA utilizando-se de um par complementar de oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) que produza a sequência sem alelos, mais um O.I para cada alelo, que produzam cada um a fita com as mutações conhecidas. A PCR assimétrica é usada para amplificar apenas uma fita da molécula de DNA alvo utilizando concentrações desiguais de O.I.s. A PCR de colônia é utilizada para verificar com rapidez a inserção de plasmídios durante a rotina de estudos de genômica de bactérias. A PCR degenerada utiliza um misto de O.I.s com uma sequência similar para amplificação de sequências de DNA desconhecidas. É utilizada como ferramenta na descoberta de novos genes. A PCR aninhada foi pensada para minimizar a amplificação de produtos inespecíficos e utiliza 2 pares complementares de O.I.s e duas reações seguidas de PCR; na primeira reação, o primeiro par de O.I. cria uma sequência que inclui em si o alvo de anelamento do segundo par de O.I.s, que

irá ser usado na segunda reação gerando um produto final com maior certeza de especificidade e menor formação de espúrios (Singh *et al.*, 2014).

Em muitos experimentos, faz-se necessária a avaliação de diversos produtos de amplificação, o que implica na realização de várias PCRs. A variação da técnica padrão conhecida como multiplex-PCR permite a amplificação simultânea de mais de um alvo genético em uma só reação ao utilizar-se de dois, três ou vários conjuntos de O.I.s. (Elnifro *et al.*, 2000; Henegariu *et al.*, 2018).

A PCR multiplex, teoricamente, apresenta um grau de especificidade e eficiência semelhante ao da técnica de alvo único. A especificidade da amplificação é determinada pela proximidade e orientação relativa das sequências genéticas alvo contidas no DNA que anelam com os O.I.s. Assim, o uso de vários pares de O.I.s aumenta a probabilidade de amplificação de produtos indesejados. Expõe-se, portanto, a necessidade de desenvolver PCRs multiplex altamente específicas, permitindo a amplificação de diferentes sequências usando combinações de diferentes O.I.s. (Mullis; Ferré; Gibbs, 1994). A reação multiplexada requer que o comprimento em pares de base dos amplicons seja diferente o suficiente para formar bandas distintas ao serem observados através da eletroforese em gel. A técnica tem sido eficazmente utilizada em análises de deleções, mutações e polimorfismos no DNA, e detecções de microsatélites e SNPs. (Singh *et al.*, 2014).

A reação multiplexada apresenta algumas vantagens quanto à variante simples, monoplex. Dentre elas elencam-se a possibilidade de realização do teste em volumes amostrais menores, além da redução do tempo gasto durante os ensaios. Reduzem-se também os gastos de reagentes e consumíveis necessários para a realização da pesquisa, uma vez que um único tubo de reação é necessário para a pesquisa de múltiplos genes. Outras vantagens são a redução do tempo de manipulação de amostras e reagentes, diminuindo o período suscetível a erros experimentais e também a viabilização da confirmação mútua dos múltiplos resultados pela leitura de bandas similares que seguem um padrão esperado e confirmação facilitada do funcionamento da reação a partir da obtenção de pelo menos um amplicon. Aumenta-se assim a confiabilidade do diagnóstico (Elnifro *et al.*, 2000; Schoske *et al.*, 2003; Sudan *et al.*, 2017).

Não se encontrou na literatura, trabalhos que façam uso dos genes de interesse *erm(A/TR)*, *erm(B)*, *mef(A/E)*, *tet(M)* e *tet(O)* em uma única PCR multiplexada. Portanto, como demonstrado, a utilização de metodologia viável de PCR duplex poderia representar melhora significativa na rotina dos laboratórios que realizam pesquisa para identificação dos genes de resistência em *S. agalactiae*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar aplicabilidade da metodologia multiplex em PCR de identificação de genes de resistência a antibióticos em *S. agalactiae*.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar aplicabilidade da metodologia multiplex em PCR de identificação dos genes *tet(M)*, *tet(O)*, *mef(A/E)*, *erm(B)* e *erm(A/TR)*;

Estimar a obtenção de produtos de amplificação a partir de análise *in silico* que simule PCRs com as combinações possíveis de oligonucleotídeos iniciadores para esses genes;

Eleger combinações viáveis de oligonucleotídeos iniciadores a partir da análise *in silico*;

Examinar experimentalmente o grau de atividade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados a fim de encontrar as melhores condições de concentração e temperatura de anelamento para cada um;

Avaliar a obtenção de produtos de amplificação a partir da utilização das combinações selecionadas de oligonucleotídeos iniciadores;

Realizar análise comparativa entre as metodologias monoplex e multiplex.

4 METODOLOGIA

4.1 Local, pesquisa guarda-chuva e população de estudo

Os estudos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Clínica do Núcleo de Medicina Tropical e no Laboratório de Endemias (NUMETROP/CCS). A população em estudo compreendeu o banco de isolados bacterianos da pesquisa “Prospecção do impacto da diversidade genética de estreptococo B nas estratégias de controle de doenças no estado da Paraíba através de uma abordagem fundamentada em *One Health*” que aqui será chamada de pesquisa guarda-chuva. Desenvolvida neste laboratório desde 2018, é a partir dela que o presente trabalho pôde ser estruturado. Puderam ser incluídos na pesquisa os isolados bacterianos, possíveis de serem recuperados, que foram identificados como *Streptococcus agalactiae* e que fizeram parte de banco de dados sobre resistência aos antibióticos das classes macrolídeos, lincosamidas e tetraciclina, desenvolvido por pesquisa já decorrida desde o início do período de recebimento de amostras.

4.2 Pesquisa de genes de resistência e banco de dados

A pesquisa predecessora que investigou o perfil genético de resistência a antibióticos em *S. agalactiae* iniciou-se em 2018. A busca dos perfis fenotípicos que conferissem resistência fez-se pela análise do crescimento das bactérias através do método de disco-difusão em placas de petri contendo ágar sangue de carneiro a 5%. A aferição dos halos de inibição de seu crescimento sugere a presença ou ausência do fenótipo de resistência seguindo os critérios do CLSI (CLSI, 2023).

Para a investigação da presença dos genes de resistência, foram utilizadas amostras de DNA extraídos de todas as bactérias que eram identificadas como *S. agalactiae*. A extração foi feita por solução contendo 10% de resina Chelex[®]-100 (Sigma Aldrich[®]) (De Lamballerie *et al.*, 1992). Buscou-se o perfil de resistência aos antibióticos das classes macrolídeos, lincosamidas e tetraciclina, a fim de relatar a presença dos genes *erm(A/TR)*, *erm(B)*, *mef(A/E)*, *tet(M)* e *tet(O)*. Para isso, utilizam-se as metodologias de PCR monoplex adaptadas de Marimón *et al.*, (2005), Pérez-Trallero *et al.*, (2007) e Poyart *et al.*, (2003). Em seus artigos, os autores disponibilizaram as metodologias individuais para amplificação dos diferentes genes. O Quadro 1 a seguir detalha os oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) utilizados e as condições sugeridas de uso deles, informações nas quais se baseou a pesquisa guarda-chuva.

Observa-se que a concentração utilizada foi a mesma para todos os O.I.s, mas que a temperatura de anelamento mudou. Por reação, as PCRs utilizaram um volume de DNA de amostra de 3 µL, um volume somado de dNTPs, enzima e *Buffer* igual a de 7 µL, um volume somado de par complementar de O.I.s (*forward* mais *reverse*) de 1,25 µL (0,625 µL cada, mantendo a concentração 250 [mM]) e um volume de água que complementou o volume final de 25 µL. Foi usado um total de 35 ciclos de desnaturação, anelamento e amplificação para cada ensaio. Assim, obtiveram-se cópias suficientes dos genes de interesse que possibilitavam sua visualização por eletroforese em gel de agarose a 2% (Marimón *et al.*, 2005; Pérez-Trallero *et al.*, 2007; Poyart *et al.*, 2003).

A aplicação da metodologia descrita permitiu construir um banco de dados referente ao DNA amostral extraído catalogando-se a presença ou ausência dos genes que conferem resistência a antibióticos em um total de 166 isolados de *S. agalactiae*.

Quadro 1 – Oligonucleotídeos iniciadores para detecção de genes de resistência a antibióticos em *Streptococcus agalactiae*.

Gene Alvo	Nome do O.I.	Sequência de bases nitrogenadas	Conc. [mM]	Amplicon	Temperatura de anelamento	Referência
<i>erm(A/TR)</i>	<i>erm</i> (A/TR)-F	AACTTGTGGAAATGAGTCAACGG	250	375 pb	60 °C	Marimón <i>et al.</i> , (2005)
	<i>erm</i> (A/TR)-R	CAGAATCTACATTAGGCTTAGGG	250			
<i>erm(B)</i>	<i>erm</i> (B)-F	ATTGGAACAGGTAAAGGGC	250	442 pb	60 °C	Marimón <i>et al.</i> , (2005)
	<i>erm</i> (B)-R	GAACATCTGTGGTATGGCG	250			
<i>mef(A/E)</i>	<i>mef</i> (A/E)-F	AGTATCATTAATCACTAGTGC	250	345 pb	50 °C	Pérez-Trallero <i>et al.</i> , (2007)
	<i>mef</i> (A/E)-R	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	250			
<i>tet(M)</i>	<i>tet</i> (M)-F	GTGGAGTACTACATTTACGAG	250	359 pb	50 °C	Poyart <i>et al.</i> , (2003)
	<i>tet</i> (M)-R	GAAGCGGATCACTATCTGAG	250			
<i>tet(O)</i>	<i>tet</i> (O)-F	GCGGAACATTGCATTTGAGGG	250	538 pb	50 °C	Poyart <i>et al.</i> , (2003)
	<i>tet</i> (O)-R	CTCTATGGACAACCCGACAGAAG	250			

Fonte: autor, (2024).

Nota: “Conc.” = Concentração, “O.I.-F” = Oligonucleotídeo Iniciador *forward* (sentido 5’-3’), “O.I.-R” = Oligonucleotídeo Iniciador *reverse* (sentido 3’-5’), “pb” = unidade pares de base.

4.3 Oligonucleotídeos iniciadores de interesse

Para possibilitar a comparação da atividade dos O.I.s entre as reações do tipo monoplex e multiplex, neste trabalho utilizaram-se os mesmos O.I.s que a pesquisa guarda-chuva, indicados no Quadro 1.

4.4 Simulação *in silico* dos conjuntos de oligonucleotídeos e escolha de conjuntos de genes para ensaio multiplexado

Para investigar a possibilidade de dimerização entre O.I.s, utilizou-se o *software* da Thermo Fisher® chamado *Multiple Primer Analyzer*¹. Fez-se inserção em formato de texto das informações sobre a sequência de bases de todos os O.I.s e o *software* entregou em formato de texto os dímeros possíveis de serem formados. Para cada dímero de O.I.s diferentes encontrado, foi estabelecida uma impossibilidade de uso daquele par em uma mesma reação (Thermo Fisher, 2023).

Em seguida, e considerando apenas os pares compatíveis que não dimerizavam de maneira cruzada, iniciou-se a busca por sequências de amplicons utilizando a ferramenta *Primer-BLAST* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), que faz uso do GenBank, banco de dados de sequências genéticas também do NCBI (NCBI, 2023)². Para cada um dos 10 pares possíveis de O.I.s, foram inseridas na busca as 12 possíveis combinações de O.I.s dois a dois que fariam parte de uma mesma reação. A busca usou a base de dados mais geral de nucleotídeos (nomeada “nr” na ferramenta) com os genomas representativos para os organismos *Streptococcus agalactiae* (identificador taxonômico: 1311) e *Streptococcus* (identificador taxonômico: 1301). O retorno da ferramenta foram as sequências de amplificação de PCRs que utilizassem o par de oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) inseridos e o material genético dos organismos escolhidos. Considerou-se amplificação inespecífica a que ocorreu a partir do *input* de par não complementar de O.I.s. Isto está demonstrado no Quadro 2.

A partir da análise *in silico* e do tamanho em pares de base [pb] de cada sequência de amplificação obtida, conseguiu-se escolher as combinações de O.I.s que pudessem compor uma PCR com metodologia multiplexada, de forma que se evitasse a formação de amplicons inespecíficos, indesejados à análise e que se obtivesse uma boa distância entre as bandas após a eletroforese. A análise experimental permitiu que fosse considerada diferença mínima de 30

¹ Disponível gratuitamente em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>. Acesso em 20 mar. 2024.

² Disponível gratuitamente em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Acesso em: 27 mar. 2024.

pb de tamanho entre os amplicons para que fosse possível a distinção visual de suas bandas. Os O.I.s agrupados por esta etapa foram avaliados em conjunto nas etapas posteriores. Ainda, tentou-se agrupar em um mesmo conjunto os genes que possuísem maior ocorrência na população amostral.

Quadro 2 – Demonstração das combinações de oligonucleotídeos iniciadores verificados na ferramenta *Primer-BLAST*.

genes	<i>tet(O)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>mef(A/E)</i>	<i>erm(A/TR)</i>	<i>erm(B)</i>
<i>erm(B)</i>	<i>B + O</i>	<i>B + M</i>	<i>B + A/E</i>	<i>B + A/TR</i>	<i>B + B</i>
<i>erm(A/TR)</i>	<i>A/TR + O</i>	<i>A/TR + M</i>	<i>A/TR + A/E</i>	<i>A/TR + A/TR</i>	
<i>mef(A/E)</i>	<i>A/E + O</i>	<i>A/E + M</i>	<i>A/E + A/E</i>		
<i>tet(M)</i>	<i>M + O</i>	<i>M + M</i>			
<i>tet(O)</i>	<i>O + O</i>				

Fonte: autor, (2024).

Nota: São 10 as possíveis combinações dois a dois entre dois genes diferentes, representadas em amarelo, de interesse para a metodologia multiplex; em azul, as reações monoplex; siglas: “*B*” = *erm(B)*; “*TR*” = *erm(A/TR)*; “*A/E*” = *mef(A/E)*; “*M*” = *tet(M)*; “*O*” = *tet(O)*.

4.5 Reativação, reisolamento e escolha das amostras

Para a reativação das amostras que se encontravam guardadas em glicerol a -20 °C, utilizou-se meio caldo LIM, especializado no enriquecimento seletivo de *S. agalactiae*. Enriqueceu-se 2,0 mL do meio com 300 µL de soro fetal bovino antes de inocular as amostras. Encubou-se em jarra de anaerobiose em estufa a 35 °C por 6h. Após isso, semeou-se em ágar Mueller Hinton por esgotamento e esperou-se o crescimento de isolados bacterianos por 48h nas mesmas condições de anaerobiose e temperatura anteriores (Schrag, 2002).

Para a etapa de avaliação de atividade dos oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) (etapa 4.7 da metodologia) e para a etapa de avaliação do desempenho da metodologia multiplexada (etapa 4.8 da metodologia), as amostras foram escolhidas para cada conjunto durante a execução de cada etapa a partir dos seguintes critérios: (1) as amostras em grupo incluíram todos os genes de interesse para cada conjunto; (2) cada amostra possuía positividade para a menor quantidade de genes dentro do grupo a fim de permitir a observação de ampliações inespecíficas; (3) as amostras tinham volume suficiente de DNA extraído disponível no banco de dados ou após extração. O Quadro 3 explica o perfil genético das amostras escolhidas para a realização da pesquisa.

Para a etapa de testes para comparação entre métodos monoplex e multiplex (etapa 4.9 da metodologia), as amostras foram escolhidas a partir de sorteio utilizando o *software* Microsoft Office Excel 2016™.

Quadro 3 – Perfil genético das amostras escolhidas

Amostra	Perfil genético				
	<i>mef(A/E)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>erm(A/TR)</i>	<i>tet(O)</i>
A	-	-	+	-	-
B	+	-	+	-	-
C	-	+	+	-	+
D	+	-	+	-	-
E	-	-	+	-	-
F	-	+	-	-	+
G	-	-	+	+	-
H	-	+	-	-	+
I	+	+	+	-	-

Fonte: autor, (2024).

Nota: “+” indica presença do gene para aquela amostra; “-” indica ausência.

4.6 Extração do DNA bacteriano

Para a extração do DNA bacteriano, uma alçada de cada colônia foi transferida para uma solução 10% de Chelex 100®, homogeneizada em vórtex vigoroso por 1 minuto, incubada a 100°C por 30 minutos em banho seco, homogeneizada em vórtex novamente por 1 minuto e rapidamente centrifugada. Em seguida, foi feita a transferência do sobrenadante com auxílio de uma micropipeta para um novo microtubo, estéril, onde foi armazenada congelada a -70°C. Esperou-se obter DNA em concentração de 50 ng/μL (De Lamballerie *et al.*, 1992).

4.7 Avaliação da atividade dos oligonucleotídeos iniciadores

4.7.1 Estudo das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores na reação

Considerando os resultados da etapa *in silico*, avaliaram-se as combinações dos O.I.s por conjunto escolhido.

Para encontrar a concentração de cada par complementar de O.I.s que promovesse sua melhor atividade, precisou-se definir as concentrações dos outros componentes da PCR. A fim de alterar o mínimo possível as condições de trabalho originais, escolheu-se que as amplificações seriam executadas em volumes de reação de 25 μ L com 5 μ L do *mix* de trabalho EM8, que contém DNA polimerase, tampão e dNTPs livres (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2 μ L da amostra de DNA, e a concentração inicial de 0,25 mM de cada iniciador, que equivale a aproximadamente 0,625 μ L. O volume final foi complementado com água livre de DNase.

Tabela 1 - Condições de termociclagem para cada par complementar de oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s)

Para O.I.s erm(B) e erm(A/TR)		
Etapas	Temperatura	Tempo
Ativação enzimática	95 °C	15 min
Desnaturação	95 °C	20 s
Anelamento	60 °C	30 s
Extensão	72 °C	1 min
Extensão final	72 °C	5 min
x 35		
Para O.I.s tet(M), tet(O) e mef(A/E)		
Etapas	Temperatura	Tempo
Ativação enzimática	95 °C	15 min
Desnaturação	95 °C	20 s
Anelamento	50 °C	30 s
Extensão	72 °C	1 min
Extensão final	72 °C	5 min
x 35		

Fonte: autor (2024).

Nota: “x35” indica que ocorrem 35 ciclos durante a reação com repetição das etapas indicadas.

Como critério de seleção da concentração de O.I.s, entendeu-se como concentração ideal aquela que fosse a menor possível para o O.I. e com amplificação observável. (Sint; Raso; Traugott, 2012). Interessou-se, então, em avaliar a atividade dos O.I.s em concentrações menores e, para isso, selecionaram-se as concentrações de 0,20 mM, 0,15 mM e 0,1 mM.

Respeitando-se essas concentrações, os volumes dos O.I.s foram calculados como sendo 0,5 μ L, 0,375 μ L e 0,25 μ L, respectivamente.

As condições de termociclagem foram conservadas, mantendo-se também a diferenciação nas temperaturas de anelamento para cada par complementar de O.I.s, como indicado no Quadro 1. As condições foram estabelecidas como demonstra a Tabela 1.

A atividade dos O.I.s foi observada por eletroforese em gel de agarose a 2% com adição de corante fluorescente de DNA e o auxílio de um transiluminador UV.

4.7.2 Estudo da temperatura de anelamento

A partir da seleção da concentração ideal para a atividade de cada conjunto de O.I.s, avaliou-se a variação da temperatura de anelamento de cada conjunto de O.I.s. Utilizando-se as condições previamente descritas de trabalho para os volumes de reação e agora fixando a concentração de cada par complementar de O.I.s como sendo a escolhida pela análise anterior, buscou-se verificar a atividade desses O.I.s em temperaturas de anelamento diferentes, a fim de determinar uma só temperatura, preferencialmente a mais elevada, em que todos os O.I.s de um mesmo conjunto conseguissem desempenhar bem sua função de anelamento. Como critério de seleção, entendeu-se como a temperatura ideal a maior que permitiu o anelamento entre O.I.s e DNA molde, a fim de evitar anelamentos inespecíficos que possam ocorrer em temperaturas mais baixas (Sint; Raso; Traugott, 2012). Para tanto, configurou-se o termociclador de trabalho para criar um gradiente de temperaturas de modo que cada coluna do aparelho tivesse uma diferença de temperatura em relação à anterior de 2 °C durante as etapas de anelamento dos O.I.s. As temperaturas de cada coluna foram 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C e 62 °C. Analisou-se para cada par complementar de O.I.s a atividade de amplificação da reação de PCR através da observação das bandas formadas por eletroforese em gel de agarose a 2% com adição de corante fluorescente de DNA e o auxílio de um transiluminador UV. Selecionou-se então a temperatura ideal para cada conjunto de O.I.s.

4.8 Avaliação do desempenho da metodologia multiplexada

A montagem do multiplex iniciou-se pelo duplex. Uma vez selecionadas as melhores condições de concentração de cada iniciador e de temperatura para cada conjunto, fez-se então o teste para análise de funcionamento da reação com a mistura de oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) dois a dois. Nesta etapa, realizou-se nova PCR em duplicata para cada conjunto de dois

pares complementares de O.I.s de interesse. Os volumes finais de reação mantiveram-se os mesmos e as temperaturas de anelamento utilizadas foram as escolhidas para cada conjunto. A adição de um volume maior de O.I.s subtraiu do volume de água livre de DNase, a fim de manter as concentrações de cada componente da reação inalteradas. As amostras utilizadas foram escolhidas de modo a melhor demonstrar a atividade de cada iniciador. Analisou-se a formação de bandas pelo mesmo processo de eletroforese por gel de agarose das metodologias anteriores (Markoulatos; Siafakas; Moncany, 2002).

Observando-se confiança na análise dos duplexes, pôde-se iniciar a o estudo do triplex: a adição de três O.I.s em uma única reação de PCR. O ensaio respeitou a concentração selecionada de cada iniciador e a melhor temperatura de anelamento para o conjunto. A leitura das bandas também se fez por eletroforese em gel de agarose.

As reações de PCR que incluem quatro ou os cinco O.I.s seriam possíveis diante da formação de conjuntos de quatro ou cinco O.I.s durante a análise *in silico* e seguiriam a mesma lógica metodológica adotada nos duplexes e no triplex.

4.9 Testes para comparação entre métodos monoplex e multiplex

Uma vez que a avaliação dos conjuntos que configuravam cada reação multiplex foi finalizada, a metodologia escolhida para cada conjunto foi submetida a teste comparativo entre os seus resultados e os da metodologia monoplex. Assim, para cada conjunto escolheu-se uma coleção diferente de 10 amostras aleatórias, as quais foram submetidas em duplicata às metodologias multiplex e das quais se obtiveram os resultados de presença ou ausência de genes de resistência a antibióticos para serem comparados com os resultados do banco de dados (Donner; Klar, 1996).

4.10 Tratamento das imagens obtidas por eletroforese

O *software* GelAnalyzer 23.1.1[©] foi utilizado para facilitar a leitura das bandas de amplicons formadas no gel de agarose e visualizadas em transiluminador UV após a eletroforese³. O *software* estimou os valores em [pb] de cada nova banda baseando-se na leitura do padrão molecular utilizado de 50 pb em todos os géis (Lazar Junior, 2023)

³ O guia para uso gratuito do *software* pode ser encontrado no link <http://gelanalyzer.com/docs/>. Acesso em 20/03/2024.

4.11 Análise estatística

A análise de dados estatísticos foi feita no *software* SPSS da IBM⁴ criando-se referência cruzada entre os resultados e avaliando-se o coeficiente de kappa para entender a reprodutibilidade dos resultados do método multiplex comparativamente ao método padrão monoplex. O coeficiente kappa serviu para avaliar o grau de concordância entre os resultados das duas metodologias utilizadas no mesmo contexto da pesquisa de presença ou ausência de genes de resistência em *S. agalactiae*. Considerou-se os resultados para o kappa como a seguir: kappa de 0 a 0,4 reflete em concordância muito baixa; kappa de 0,41 a 0,6, concordância moderada; kappa de 0,6 a 0,8, substancial. Na área da saúde, estabelece-se como nível de excelência sempre um kappa acima de 0,8 (Donner; Klar, 1996).

⁴ O *software* SPSS não está disponível gratuitamente. Pode ser encontrado no link <https://www.ibm.com/br-pt/spss>. Acesado em 15/02/2024

5 RESULTADOS

5.1 Resultados *in silico*.

A análise *in silico* forneceu os dados para a definição dos conjuntos de O.I.s possíveis de serem multiplexados. A análise da ferramenta *Multiple Primer Analyzer* da *Termo Fisher*[®], retornou à probabilidade de formação de dímeros entre os conjuntos de O.I.s, demonstrando a não ocorrência de dimerização cruzada, ou seja, anelamentos inespecíficos entre pares de O.I.s diferentes. Porém, foram observadas ocorrências de dimerizações de uma sequência de iniciador com ela mesma, os chamados *self-dimers*. Este resultado indicou a possibilidade de construção de multiplexes entre todas as combinações disponíveis de O.I.s. Os *self-dimers* estão indicados na Figura 3.

Figura 3 - Análise do *Multiple Primer Analyzer* mostrando a formação de *self-dimers*

```

Self-Dimers:

1 dimer for: mef(A/E)-F
5-agtatcattaatcactagtgc->
      |||||
<-cgtgatcactaattactatga-5

1 dimer for: mef(A/E)-R
5-ttcttctggtactaaaagtgg->
      ||| | |||| | |||
<-ggtgaaaatcatggtcttctt-5

1 dimer for: tet(M)-F
5-gtggagtactacatttacgag->
      || ||||| ||
<-gagcatttacatcatgaggtg-5

```

Fonte: autor, (2024).

Nota: Observa-se a formação de *self-dimers* para os oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) mef(A/E)-F, mef(A/E)-R e tet(M)-F. As sequências nucleotídicas de cada iniciador estão escritas primeiro em sentido 5'→3' e em seguida em sentido 3'→5' e ligadas entre si por barras verticais “|” na ocorrência de complementação das suas bases nitrogenadas.

Os resultados obtidos através da utilização da ferramenta *Primer Blast* do NCBI foram as possíveis sequências de amplificação do material genético de *S. agalactiae* que cada par de O.I.s é capaz de gerar em uma PCR. Estimaram-se assim os resultados possíveis de serem obtidos pela PCR durante os ensaios de bancada. A informação mais importante na organização desses dados é a especificidade de cada sequência e o tamanho de cada amplicon por ser ele capaz de determinar ou estimar a visualização esperada em uma eletroforese. O Quadro 4 organiza as informações desta análise, que também estão explicadas a seguir.

Quadro 4 - PCR *in silico*: tamanho de amplicons [pb] para cada combinação de oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s)

O.I.s	erm(A/TR)		erm(B)		mef(A/E)		tet(M)		tet(O)		
	sentido	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R
tet (O)	F				2759, 3557				309, 2142		535, 536
	R			3190, 3195, 3212, 3217						535, 536	
tet (M)	F			2988	2759, 2760	2105			308, 309, 315		
	R			2968	2990				308, 309, 315		
mef (A/E)	F	247					345, 346				
	R	2963, 3479, 3480, 3481, 3482					2856				
erm (B)	F				442, 443			Legenda			
	R			442, 443							
erm (A/TR)	F		375							[pb]	Amplicons específicos
	R	375									

Fonte: autor, (2024).
Nota: Os números indicados nas células representam o tamanho em pb dos amplicons encontrados pela ferramenta *primer blast*. “O.I.-F” = Oligonúcleotídeo Iniciador *forward* (sentido 5’-3’), “O.I.-R” = Oligonucleotídeo Iniciador *reverse* (sentido 3’-5’), “pb” = unidade pares de base.

Para cada dupla de genes alvo, foi avaliada a diferença dos tamanhos de amplicons gerados. Seguindo os critérios da metodologia, quando a diferença de tamanho foi maior ou igual a 30 pb, a combinação de O.I.s produziu amplicons possíveis de serem distinguíveis após eletroforese, possibilitando seu uso em reação multiplexada. Também, os conjuntos de O.I.s que indicaram a geração de amplicons inespecíficos com tamanhos aproximados aos tamanhos dos amplicons específicos, que pudessem ser confundidos, foram considerados inadequados de serem colocados em uma mesma reação. O Quadro 5 resume essa etapa.

Quadro 5 - Análise da possibilidade de distinção de amplicons das diferentes combinações de genes

Combinações de oligonucleotídeos iniciadores	Diferença esperada entre amplicons [pb]		Avaliação conforme critérios da pesquisa
	Entre amplicons específicos	Entre amplicons específicos e inespecíficos	
tet(O) + erm(A/TR)	160	-	Adequado
tet(O) + erm(B)	92	2223	Adequado
tet(O) + mef(A/E)	190	-	Adequado
tet(O) + tet(M)	220	0	Inadequado
tet(M) + erm(A/TR)	60	-	Adequado
tet(M) + erm(B)	128	1948	Adequado
tet(M) + mef(A/E)	30	1759	Adequado
mef(A/E) + erm(A/TR)	29	98	Inadequado
mef(A/E) + erm(B)	96	2413	Adequado
erm(B) + erm(A/TR)	67	-	Adequado

Fonte: autor, (2024).

Nota: A combinação dos O.I.s tet(O) + tet(M) e a combinação de mef(A/E) + erm(A/TR) foram consideradas inadequadas para os critérios da pesquisa, uma vez que observaram-se amplificações inespecíficas de tamanhos similares e aproximados aos tamanhos dos amplicons específicos produzidos pelos primers (com 0 pb e 98 pb de diferença calculada respectivamente).

Ainda, dada a baixa ocorrência da presença dos genes *erm(B)* e *erm(A/TR)* na população amostral, considerou-se indesejada a criação de conjunto que incluísse ambos, uma vez que a detecção desses genes é mais esporádica que a de outros. Já os genes *tet(M)* e *mef(A/E)* frequentemente ocorriam de forma simultânea em amostras, tornando-lhes desejáveis de agrupar em um único conjunto. Assim, chegou-se a dois conjuntos de genes que foram considerados adequados de serem colocados em uma mesma reação de PCR. O conjunto 1 foi

composto por $tet(M) + mef(A/E) + erm(B)$ e o conjunto 2 ficou composto por $tet(O) + erm(A/TR)$.

5.2 Análise da reação multiplexada do conjunto de oligonucleotídeos iniciadores $tet(M) + mef(A/E) + erm(B)$

As orientações para leitura das Figuras de 4 a 14 encontram-se no Quadro 6. Elas foram obtidas utilizando o *software* GelAnalyzer.

Quadro 6 - Orientações para a leitura das Figuras de 4 a 14

Objetos	Significados
As colunas em preto	Correspondem a faixas no gel de eletroforese e estão numeradas sequencialmente.
Os retângulos dentro das faixas	Indicam a formação de bandas de amplificação e são identificados pelo número correspondente à sua faixa e uma letra que os diferencia.
As linhas horizontais em verde	Correspondem às curvas referenciais que se guiam pelos padrões moleculares utilizados.
As letras em vermelho	Indicam as amostras que foram utilizadas em cada faixa.
A coluna branca com os nomes dos genes, posicionada à esquerda	Serve como referencial para leitura e indica a posição ocupada por cada gene;
O perfil genético das amostras utilizadas	Encontra-se indicado por tabelas com os sinais “+” para indicar presença do gene, e “-” para indicar ausência.

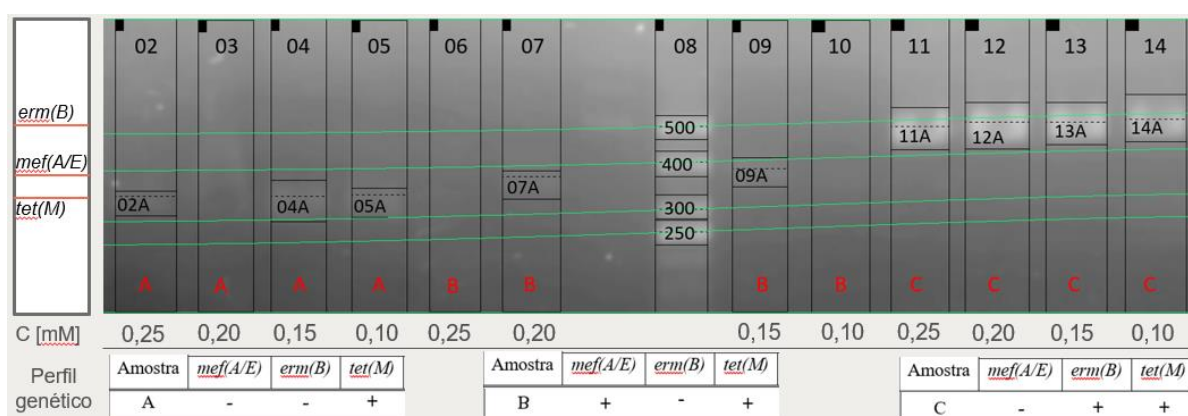
Fonte: autor, (2024).

As Figuras de 4 a 9 foram obtidas pelas eletroforeses de cada análise do conjunto 1 ($tet(M)$, $mef(A/E)$ e $erm(B)$) para as amostras de “A” a “F” e de “X1” a “X10”.

Na Figura 4 são demonstrados os resultados da análise das diferentes concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) para os genes $tet(M)$, $mef(A/E)$ e $erm(B)$ utilizando as amostras “A”, “B” e “C”. O perfil genético das amostras está demonstrado na figura. Para analisar a amplificação do gene $tet(M)$ foi usada a amostra “A”, para o gene $mef(A/E)$ usou-se a amostra “B” e para $erm(B)$ a amostra “C”. Em cada reação, utilizou-se apenas o O.I. que amplificou o gene de interesse. A escolha da concentração ideal de cada O.I. foi definida como a menor concentração com amplificação observável (Sint; Raso; Traugott, 2012). Verificou-se a intensidade de cada banda e os valores dos picos dos gráficos gerados pelo *software*

GelAnalyzer[©] ⁵. Para os genes *tet(M)* e *erm(B)* foi definida a concentração de 0,10 mM, uma vez que gerou bandas nítidas na eletroforese (bandas 05A e 14A), sendo essa a menor concentração entre as testadas. Já para o gene *mef(A/E)*, percebeu-se ausência de amplificação com concentração 0,10 mM, que estaria representada na faixa 10, porém, houve nítida banda em 09A com o uso da concentração 0,15 mM. Estas foram então as concentrações selecionadas para cada oligonucleotídeo iniciador neste conjunto.

Figura 4 - Análise da concentração ideal para os oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) dos genes *tet(M)*, *mef(A/E)* e *erm(B)*



Fonte: autor, (2024).

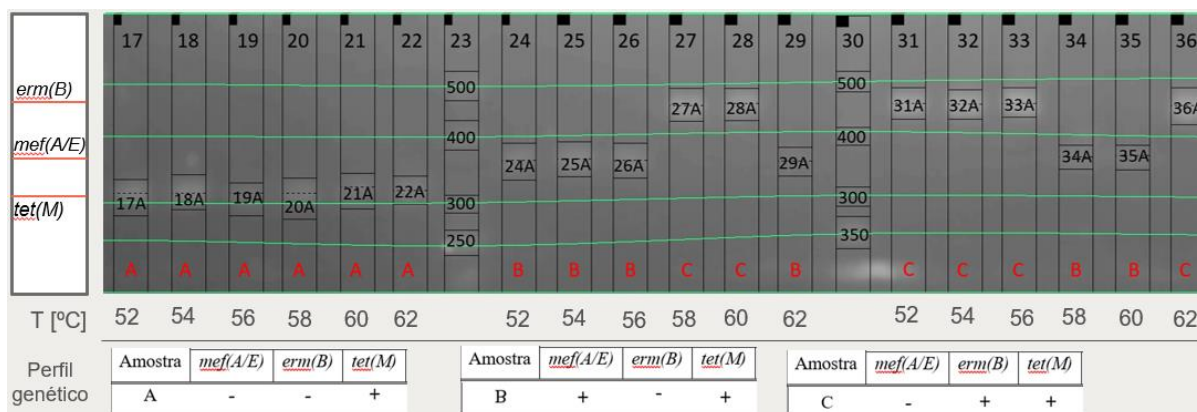
Notas: as orientações para leitura encontram-se no Quadro 6. As concentrações C [mM] utilizadas para os primers em cada faixa estão indicadas. Leituras realizadas: **Faixa 02** - banda observada: 02A = 346 pb. **Faixa 03** - nenhuma banda observada. **Faixa 04** - banda observada: 04A = 342 pb. **Faixa 05** - banda observada: 05A = 342 pb. **Faixa 06** - nenhuma banda observada. **Faixa 07** - banda observada: 07A = 378 pb. **Faixa 08** - padrão de base molecular de 50 pb; bandas observadas: 500 pb, 400 pb, 300 pb e 250 pb. **Faixa 09** - banda observada: 09A = 380 pb. **Faixa 10** - nenhuma banda observada. **Faixa 11** - banda observada: 11A = 480 pb. **Faixa 12** - banda observada: 12A = 484 pb. **Faixa 13** - banda observada: 13A = 479 pb. **Faixa 14** - banda observada: 14A = 480 pb. Escolheram-se as concentrações 0,1 mM para o O.I. *tet(M)*, 0,15 mM para *mef(A/E)* e 0,1 mM para *erm(B)*.

A Figura 5 elucidar os resultados da análise da melhor temperatura de atividade individual desses O.I.s. Usou-se as amostras “A”, “B” e “C” da mesma forma que foram usadas no estudo de concentrações. Como critério de seleção, entendeu-se como a temperatura ideal a maior que permitiu o anelamento entre O.I.s e DNA molde, a fim de reduzir anelamentos inespecíficos que possam ocorrer em temperaturas mais baixas (Sint; Raso; Traugott, 2012). A banda 29A é o amplicon obtido da atividade dos O.I.s do gene *mef(A/E)* em temperatura de anelamento de 62 °C. Uma vez que a banda não apresentou nitidez com leitura de pico no *software* muito baixa, a temperatura de 62° C foi descartada para o conjunto. Para o teste com

⁵ No *software* GelAnalyzer, para o perfil de uma coluna definem-se as bandas restringindo-as pelos índices de início, fim e pico gerados pelo *software*, como explicado em <http://gelanalyzer.com/docs/concepts/>.

temperatura de anelamento de 60 °C, observou-se boa visualização e leitura de picos para os amplicons que representaram os três genes, vistos nas bandas 21A, 28A e 35A. A temperatura de anelamento selecionada para o conjunto, portanto, foi a de 60 °C.

Figura 5 - Análise da temperatura ideal para os oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) dos genes *tet(M)*, *mef(A/E)* e *erm(B)*



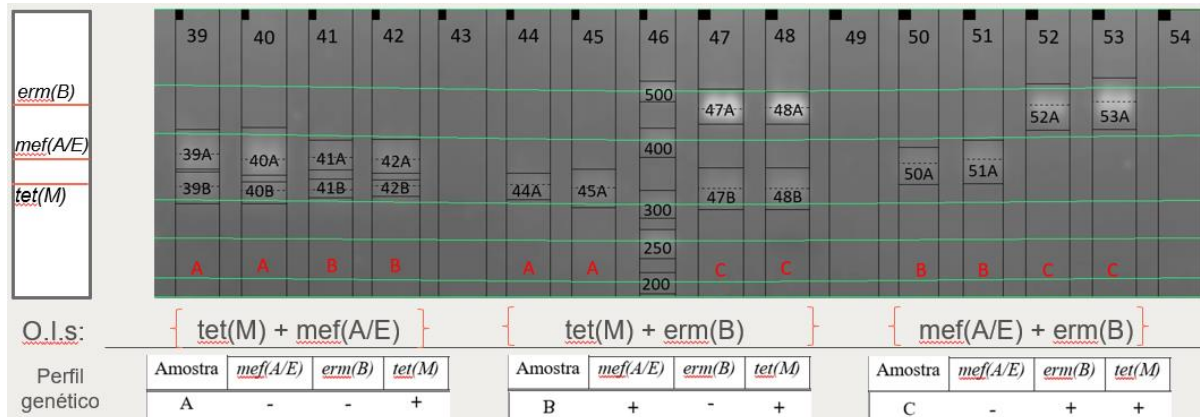
Fonte: autor, (2024).

Notas: as orientações para a leitura encontram-se no Quadro 6. As temperaturas T [°C] indicadas são as que foram usadas na etapa de alinhamento dos O.I.s em cada faixa. O perfil genético das amostras está exposto. Leituras realizadas: **Faixa 17** - banda observada: 18A = 313 pb. **Faixa 19** - banda observada: 19A = 315 pb. **Faixa 20** - banda observada: 20A = 315 pb. **Faixa 21** - banda observada: 21A = 323 pb. **Faixa 22** - banda observada: 22A = 317 pb. **Faixa 23** - padrão de base molecular de 50 pb; bandas observadas: 500 pb, 400 pb, 300 pb e 250 pb. **Faixa 24** - banda observada: 24A = 361 pb. **Faixa 25** - banda observada: 25A = 362 pb. **Faixa 26** - banda observada: 26A = 359 pb. **Faixa 27** - banda observada: 27A = 455 pb. **Faixa 28** - banda observada: 28A = 458 pb. **Faixa 29** - banda observada: 29A = 351 pb. **Faixa 30** - padrão de base molecular de 50 pb; bandas observadas: 500 pb, 400 pb, 300 pb e 250 pb. **Faixa 31** - banda observada: 31A = 453 pb. **Faixa 32** - banda observada: 32A = 452 pb. **Faixa 33** - banda observada: 33A = 454 pb. **Faixa 34** - banda observada: 34A = 362 pb. **Faixa 35** - banda observada: 35A = 365 pb. **Faixa 36** - banda observada: 36A = 458 pb. A banda formada em 29A apresentou pouca nitidez e descartou-se o uso da temperatura de 62 °C. Para o conjunto, escolheu-se a temperatura de 60 °C.

Seguiu-se a análise da metodologia multiplex partindo da execução de duplexes entre os três genes. Usaram-se as mesmas amostras que foram usadas nas análises anteriores, amostras “A”, “B” e “C”. A Figura 6 elucida os resultados na amplificação dos duplexes. Aqui foi verificado que nenhum fragmento adicional foi produzido por quaisquer dos primers dentro do sistema multiplex.

A Figura 7 demonstra a leitura da combinação triplex entre os genes do conjunto 1. Uma vez que as amostras “A”, “B” e “C” encontraram-se indisponíveis para esta etapa, elas foram substituídas pelas amostras “D”, “E” e “F”. A amostra “D” foi escolhida para analisar a presença do gene *tet(M)*, a amostra “E” para analisar a presença de *mef(A/E)* e a amostra “F” a presença de *erm(B)*. Aqui, todos os resultados esperados baseando-se na análise monoplex foram confirmados, ou seja, houve amplificação dos genes esperados para cada amostra.

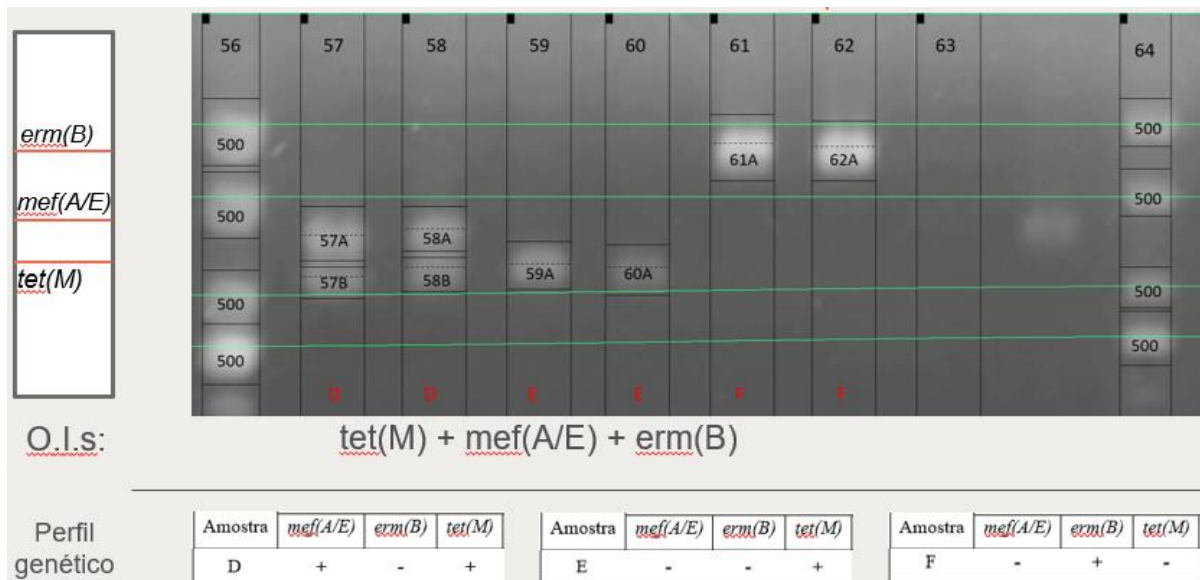
Figura 6 - Análise das combinações de duplex entre os genes *tet(M)*, *mef(A/E)* e *erm(B)*



Fonte: autor, (2024).

Notas: as orientações para leitura encontram-se no Quadro 6. Discutiu-se sobre as amplificações inesperadas em 39A e 40A. O perfil genético das amostras está exposto. Leituras realizadas: **Faixa 39** - bandas observadas: 39A = 368 pb e 39B = 317 pb. **Faixa 40** - duplicata; bandas observadas: 40A = 362 pb e 40B = 312 pb. **Faixa 41** - bandas observadas: 41A = 366 pb e 41B = 315 pb. **Faixa 42** - duplicata; bandas observadas: 42A = 365 pb e 42B = 323 pb. **Faixa 43** - controle negativo; nenhuma banda observada. **Faixa 44** - banda observada: 44A = 327 pb. **Faixa 45** - duplicata; banda observada: 45A = 324 pb. **Faixa 46** - padrão de base molecular de 50 pb; bandas observadas: 500 pb, 400 pb, 300 pb, 250 pb e 200 pb. **Faixa 47** - bandas observadas: 47A = 462 pb e 47B = 322 pb. **Faixa 48** - duplicata; bandas observadas: 48A = 464 pb e 48B = 322 pb. **Faixa 49** - controle negativo; banda observada. **Faixa 50** - banda observada: 50A = 361 pb. **Faixa 51** - duplicata; banda observada: 51A = 367 pb. **Faixa 52** - banda observada: 52A = 464 pb. **Faixa 53** - duplicata; banda observada: 53A = 470 pb. **Faixa 54** - controle negativo; nenhuma banda observada.

Figura 7 - Análise da combinação triplex dos genes *tet(M)*, *mef(A/E)* e *erm(B)*

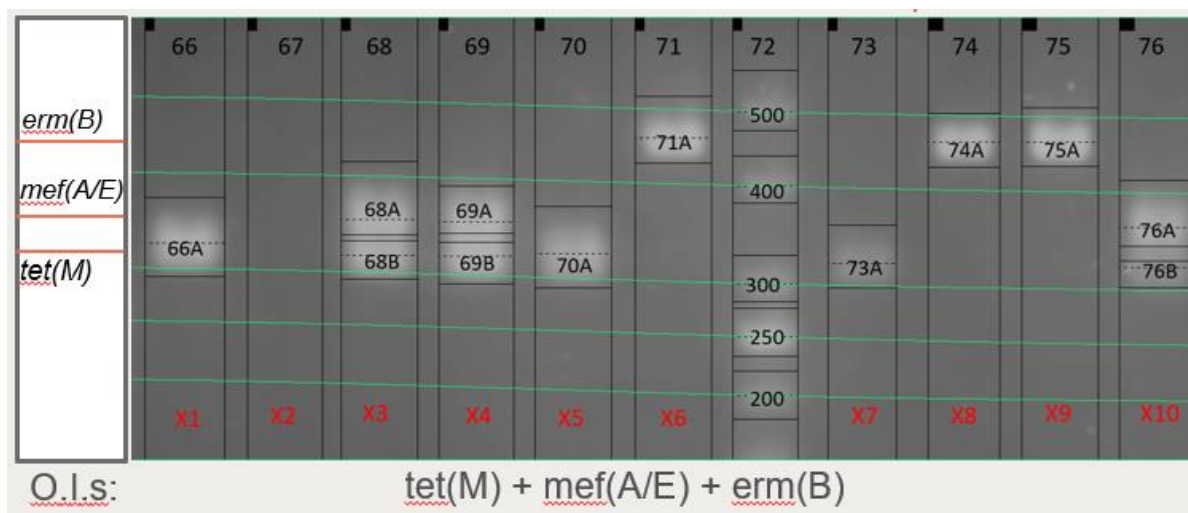


Fonte: autor, (2024).

Notas: as orientações para leitura encontram-se no Quadro 6. Para o triplex, utilizou-se O.I.s para os genes *tet(M)*, *mef(A/E)* e *erm(B)* em todas as reações. O perfil genético das amostras está exposto. Leituras realizadas: **Faixa 56** - padrão de base molecular de 50 pb; bandas observadas: 500 pb, 400 pb, 300 pb e 250 pb. **Faixa 57** - bandas observadas: 57A = 358 pb e 57B = 315 pb. **Faixa 58** - bandas observadas: 58A = 365 pb e 58B = 325 pb. **Faixa 59** - banda observada: 59A = 326 pb. **Faixa 60** - banda observada: 60A = 322 pb. **Faixa 61** - banda observada: 61A = 472 pb. **Faixa 62** - banda observada: 62A = 468 pb. **Faixa 63** - controle negativo; nenhuma banda observada. **Faixa 64** - padrão de base molecular de 50 pb; bandas observadas: 500 pb, 400 pb, 300 pb e 250 pb.

A Figura 8 e a Figura 9 demonstram o teste do triplex com coleção amostral aleatória. Usaram-se as amostras sorteadas nomeadas de “X1” a “X10”, com perfis genéticos expostos no Quadro 7

Figura 8 - Teste para o triplex com amostras aleatórias



Fonte: autor, (2024).

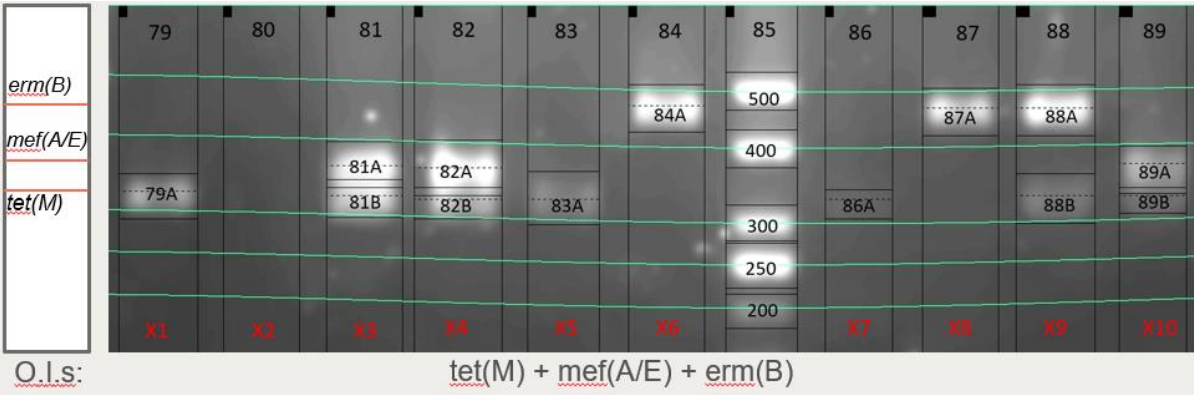
Notas: as orientações para leitura encontram-se no Quadro 6. Para o triplex, utilizou-se O.I.s para os genes *tet(M)*, *mef(A/E)* e *erm(B)* em todas as reações. Discutiu-se sobre amplificação inesperada em 71A. Discutiu-se sobre ausência de amplificação nas faixas 75 e 76. O perfil genético das amostras está exposto. O perfil genético de cada amostra deve ser lido no Quadro 7. Leituras realizadas: **Faixa 66** - banda observada: 66A = 324 pb. **Faixa 67** - nenhuma banda observada. **Faixa 68** - bandas observadas: 68A = 353 pb e 68B = 316 pb. **Faixa 69** - bandas observadas: 69A = 353 pb e 69B = 317 pb. **Faixa 70** - banda observada: 70A = 323 pb. **Faixa 71** - banda observada: 71A = 460 pb. **Faixa 72** - padrão de base molecular de 50 pb; bandas observadas: 500 pb, 400 pb, 300 pb, 250 pb e 200 pb. **Faixa 73** - banda observada: 73A = 320 pb. **Faixa 74** - banda observada: 74A = 464 pb. **Faixa 75** - banda observada: 75A = 466 pb. **Faixa 76** - bandas observadas: 76A = 363 pb e 76B = 321 pb.

O Quadro 7 organiza os resultados de ocorrência de amplificações obtidos pelas duas metodologias, monoplex e triplex.

A análise estatística foi feita através de referência cruzada que comparava os resultados de uma coleção aleatória de amostras previamente analisadas por meio de reação de PCR monoplex para a presença e ausência de cada gene, com os resultados obtidos pelas reações triplex propostas. Para efeito de comparação, a monoplex foi considerada o padrão ouro. Foram geradas pelo SPSS as análises de referência cruzada e a geração do coeficiente kappa de concordância.

A estatística demonstra que o triplex apresenta sensibilidade estimada de 92,3% e especificidade estimada de 94,1%. Com relação a todas as variáveis dependentes avaliadas, o valor de kappa entre as metodologias foi de 0,864 ($P < 0,001$). Considera-se, portanto, que há uma excelente correlação do método triplex comparado ao monoplex.

Figura 9 - Reações em duplicata com o teste da Figura 8



Fonte: autor, (2024).

Notas: as orientações para leitura encontram-se no Quadro 6. Duplicata das reações que compõem a Figura 8. Para o triplex, utilizou-se O.I.s para os genes *tet(M)*, *mef(A/E)* e *erm(B)* em todas as reações. Discutiu-se sobre amplificação inesperada em 84A. Discutiu-se sobre ausência de amplificação na faixa 89. Discutiu-se sobre amplificação em 88B, faixa duplicata da faixa 75, que não amplificou o mesmo gene representado por 88B. O perfil genético das amostras deve ser lido no Quadro 7. Leituras realizadas: **Faixa 79** - banda observada: 79A = 322 pb. **Faixa 80** - nenhuma banda observada. **Faixa 81** - bandas observadas: 81A = 364 pb e 81B = 325 pb. **Faixa 82** - bandas observadas: 82A = 364 pb e 82B = 322 pb. **Faixa 83** - banda observada: 83A = 325 pb. **Faixa 84** - banda observada: 84A = 470 pb. **Faixa 85** - bandas observadas: 500 pb, 400 pb, 300 pb, 250 pb e 200 pb. **Faixa 86** - banda observada: 86A = 330 pb. **Faixa 87** - banda observada: 87A = 469 pb. **Faixa 88** - bandas observadas: 88A = 466 pb e 88B = 332 pb. **Faixa 89** - bandas observadas: 89A = 373 pb e 89B = 330 pb.

Quadro 7 – Comparação de resultados obtidos pelas metodologias monoplex e triplex

Amostra	Ocorrência de amplificações					
	<i>tet(M)</i>		<i>mef(A/E)</i>		<i>erm(B)</i>	
	monoplex	triplex	monoplex	triplex	monoplex	triplex
X1	+	+	-	-	-	-
X2	-	-	-	-	-	-
X3	+	+	+	+	-	-
X4	+	+	+	+	-	-
X5	+	+	-	-	-	-
X6	-	-	-	-	-	+
X7	+	+	-	-	-	-
X8	-	-	-	-	+	+
X9	+	+	-	-	+	+
X10	+	+	+	+	+	-

Fonte: autor, (2024).

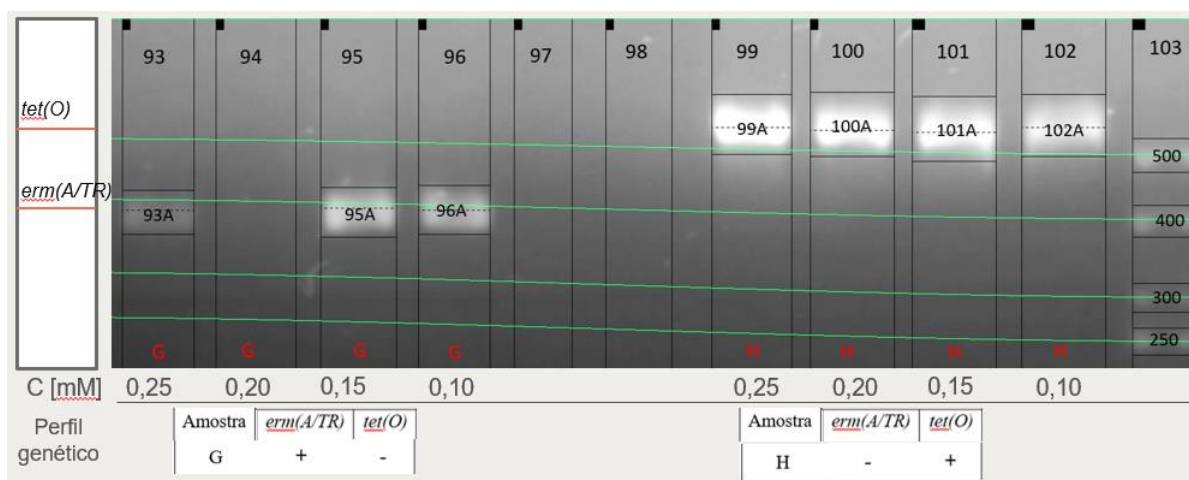
Nota: “+” indica presença do gene para aquela amostra; “-” indica ausência. As colunas “monoplex” representam o perfil genético das amostras de acordo com o banco de dados. As colunas “triplex” expõem as amplificações de cada gene encontradas durante a pesquisa.

5.3 Análise da reação multiplexada do conjunto de oligonucleotídeos iniciadores *tet(O)* + *erm(A/TR)*

As Figuras de 10 a 14 apresentam os resultados obtidos pelas eletroforeses de cada análise do conjunto dois para as amostras “G”, “H” e “I” e de “Y1” a “Y10”. As orientações para leitura das figuras são as mesmas que para as anteriores, apresentadas no Quadro 6.

A Figura 10 exibe os resultados da avaliação da concentração ótima para a atividade dos O.I.s complementares que amplificam os genes *tet(O)* e *erm(A/TR)*. A amostra escolhida para visualização de amplificação para o gene *tet(O)* foi a amostra “G” e para o gene *erm(A/TR)* foi a amostra “H”, ambas com perfil genético exposto no Quadro 3. Foi avaliada a intensidade de cada banda e os valores dos picos registrados pelo programa GelAnalyzer[®]. A partir dessa representação, interpretou-se que a concentração de 0,10 mM é a mais adequada, considerando a leitura satisfatória das bandas 96A e 102A e utilizando os mesmos critérios usados para o conjunto anterior.

Figura 10 - Análise da concentração ideal para os oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) dos genes *tet(O)* e *erm(A/TR)*



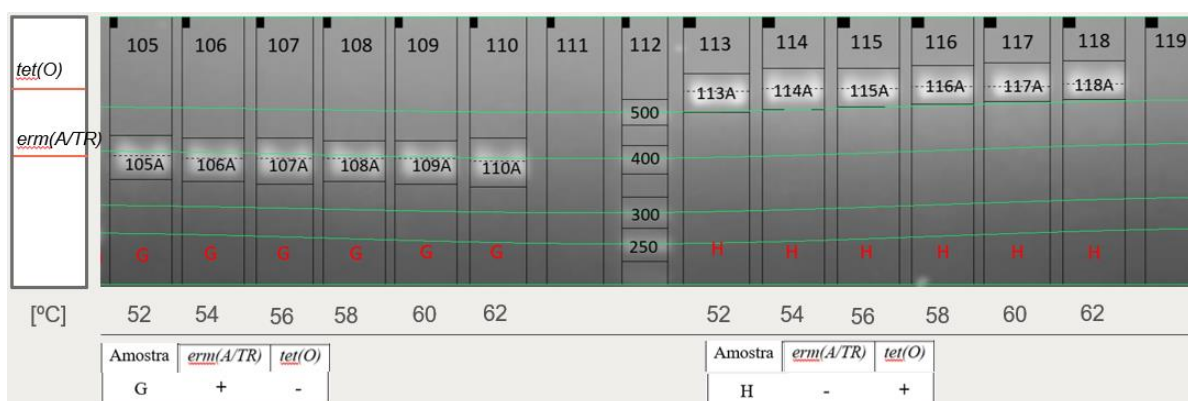
Fonte: autor, (2024).

Notas: as orientações para leitura encontram-se no Quadro 6. O perfil genético das amostras está exposto. As concentrações C [mM] utilizadas para os primers em cada faixa estão indicadas. Leituras realizadas: **Faixa 93** - banda observada: 93A = 383 pb. **Faixa 94** - nenhuma banda observada. **Faixa 95** - banda observada: 95A = 393 pb. **Faixa 96** - banda observada: 96A = 393 pb. **Faixa 97** - controle negativo; usou-se O.I.s para *erm(A/TR)*; nenhuma banda observada. **Faixa 98** - controle negativo; usou-se O.I.s para *tet(O)*; nenhuma banda observada. **Faixa 99** - banda observada: 99A = 538 pb. **Faixa 100** - banda observada: 100A = 538 pb. **Faixa 101** - banda observada: 101A = 534 pb. **Faixa 102** - banda observada: 102A = 545 pb. **Faixa 103** - padrão de base molecular de 50 pb; bandas observadas: 500 pb, 400 pb, 300 pb e 250 pb.

A Figura 11 revela os resultados da investigação sobre a temperatura de anelamento desses O.I.s. As amostras utilizadas foram “G” e “H”, as mesmas que para a análise de concentração. A uma temperatura de 62 °C, notou-se uma nítida visualização e a leitura precisa

dos picos correspondentes aos amplicons dos dois genes, evidenciados nas bandas 110A e 118A. Assim, utilizando os mesmos critérios de seleção de temperatura para o conjunto anterior, a temperatura de anelamento selecionada para o conjunto 2 foi de 62 °C.

Figura 11 - Análise da temperatura ideal para os oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s) dos genes *tet(O)*, *mef(A/E)* e *erm(B)*



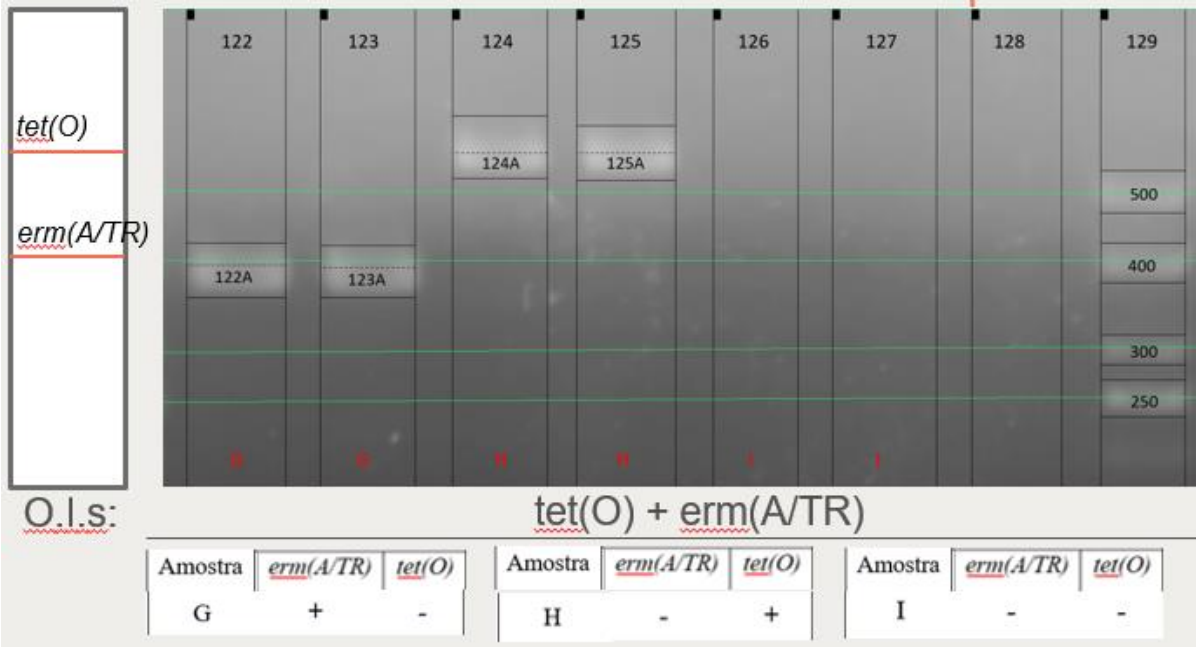
Fonte: autor, (2024).

Notas: as orientações para leitura encontram-se no Quadro 6. as temperaturas T [°C] indicadas são as que foram usadas na etapa de alinhamento dos O.I.s em cada faixa. O perfil genético das amostras está exposto. Leituras realizadas: **Faixa 105** - banda observada: 105A = 391 pb. **Faixa 106** - banda observada: 106A = 391 pb. **Faixa 107** - banda observada: 107A = 391 pb. **Faixa 108** - banda observada: 108A = 396 pb. **Faixa 109** - banda observada: 109A = 396 pb. **Faixa 110** - banda observada: 110A = 396 pb. **Faixa 111** - controle negativo; usou-se O.I.s para *erm(A/TR)*; nenhuma banda observada. **Faixa 112** - padrão de base molecular de 50 pb; bandas observadas: 500 pb, 400 pb, 300 pb e 250 pb. **Faixa 113** - banda observada: 113A = 548 pb. **Faixa 114** - banda observada: 114A = 550 pb. **Faixa 115** - banda observada: 115A = 544 pb. **Faixa 116** - banda observada: 116A = 546 pb. **Faixa 117** - banda observada: 117A = 546 pb. **Faixa 118** - banda observada: 118A = 547 pb. **Faixa 119** - controle negativo; usou-se O.I.s para *tet(O)*; nenhuma banda observada.

Seguiu-se a análise da metodologia multiplex e a execução de duplex entre os dois genes. A Figura 12 apresenta os resultados da amplificação do duplex. As amostras “G” e “H” continuaram a ser utilizadas para visualização dos genes do conjunto e a amostra I foi adicionada para existir maior variedade de perfis genéticos e facilitar a visualização de qualquer amplificação inespecífica que viesse a ocorrer. Todas as amostras amplificaram da maneira esperada e obteve-se nítida visualização das bandas. Aqui foi verificada a inexistência de amplificações de fragmentos adicionais dentro do sistema multiplex.

A Figura 13 e a Figura 14 demonstram o teste do duplex com coleção amostral aleatória. Aqui, mais uma vez, as amostras amplificaram com 100% de correlação com o banco de dados. Usaram-se as amostras sorteadas nomeadas de “Y1” a “Y10”, com perfis genéticos expostos no Quadro 8.

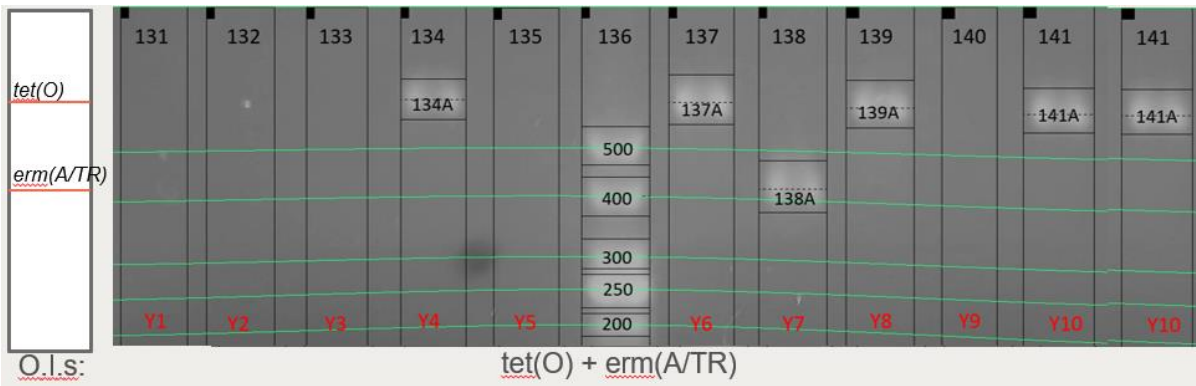
Figura 12 - Análise da combinação duplex dos genes *tet(O)* e *erm(A/TR)*



Fonte: autor, (2024).

Notas: as orientações para leitura encontram-se no Quadro 6. Para esta análise, usou-se O.I.s para *erm(A/TR)* e *tet(O)* em todas as reações. O perfil genético das amostras foi está exposto. Leituras realizadas: **Faixa 122** - banda observada: 122A = 395 pb. **Faixa 123** - banda observada: 123A = 392 pb. **Faixa 124** - banda observada: 124A = 560 pb. **Faixa 125** - banda observada: 125A = 560 pb. **Faixa 126** - nenhuma banda observada. **Faixa 127** - nenhuma banda observada. **Faixa 128** - controle negativo; nenhuma banda observada. **Faixa 129** - padrão de base molecular de 50 pb; bandas observadas: 500 pb, 400 pb, 300 pb e 250 pb.

Figura 13 - Teste para o duplex com amostras aleatórias



Fonte: autor, (2024).

Notas: as orientações para leitura encontram-se no Quadro 6. Para esta análise, usou-se O.I.s para *erm(A/TR)* e *tet(O)* em todas as reações. O perfil genético das amostras deve ser lido no 8. Leituras realizadas: **Faixa 131** - nenhuma banda observada. **Faixa 132** - nenhuma banda observada. **Faixa 133** - nenhuma banda observada. **Faixa 134** - banda observada: 134A = 598 pb. **Faixa 135** - nenhuma banda observada. **Faixa 136** - padrão de base molecular de 50 pb; bandas observadas: 500 pb, 400 pb, 300 pb, 250 pb e 200 pb. **Faixa 137** - banda observada: 137A = 593 pb. **Faixa 138** - banda observada: 138A = 428 pb. **Faixa 139** - banda observada: 139A = 589 pb. **Faixa 140** - nenhuma banda observada. **Faixa 141** - banda observada: 141A = 583 pb.

Similarmente ao conjunto anterior, a avaliação estatística foi conduzida por meio da comparação entre os resultados dos testes de coleção aleatória triplex e a base de dados obtida pela metodologia monoplex. Considerou-se a monoplex como o padrão de referência uma vez que se deseja avaliar o quanto o desempenho da metodologia multiplex é equiparável aos resultados do banco de dados. Foram geradas pelo SPSS as análises de referência cruzada e a geração do coeficiente kappa de confiabilidade.

A estatística demonstra que o método duplex apresentou sensibilidade e especificidade de 100% e que, em relação a todas as variáveis dependentes avaliadas, o coeficiente kappa para as metodologias foi de 1,0 ($P < 0,001$), o que implica em uma concordância perfeita entre o método duplex para o conjunto 2 e o monoplex.

6 DISCUSSÃO

Além de seguir os critérios da pesquisa, a seleção dos conjuntos de O.I.s objetivou evitar o acontecimento de amplificações inespecíficas que poderiam fazer uso e dos recursos da PCR, dessa forma comprometendo a disponibilidade de O.I.s, dNTPs e enzimas (Sharma; Gopalkrishna; Das, 1992; Sint; Raso; Traugott, 2012).

Na Figura 6, observa-se a ocorrência de amplificações inesperadas indicadas pelas bandas 39A e 40A, ambas para o gene *mef(A/E)*. A amostra utilizada foi a “A” que estava catalogada no banco de dados como possuindo apenas o gene *tet(M)*. Essas amplificações podem ser explicadas pela limitação na detecção de amplificação do gene através do método monoplex, seja por uma falha na reação de amplificação ou mesmo por um baixo número de cópias do gene na amostra. Baseando-se nos resultados de alta sensibilidade e especificidade encontrados para a metodologia multiplex, entendeu-se improvável que estas sejam amplificações inespecíficas. Ainda, a amplificação com boa visualização de outras bandas que representam o gene *mef(A/E)*, todas com a mesma leitura de tamanho em pares de base [pb] que as bandas 39A e 40A, sugerem o funcionamento correto da reação e um padrão claro de amplificação do gene *mef(A/E)*. Isso demonstra a maior confiabilidade dos resultados da análise multiplex, exemplificando sua visualização e confirmação mútua (Elnifro *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2014).

Observou-se também amplificação inesperada para o gene *erm(B)* na banda 71A (visualizada na Figura 8), a partir da utilização da amostra “X6”, que não exibiu *erm(B)* durante a análise monoplex (Quadro 7). Esta amplificação também pode ser entendida como havendo ausência de resultados na base de dados. Foi observada na mesma figura a ocorrência de outras amplificações com mesma leitura de tamanho em pares de base [pb] que sugerem que a amplificação em 71A está inclusa em um padrão de amplificação para o mesmo gene (Elnifro *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2014). Observou-se novamente amplificação inesperada em 84A (Figura 9), equivalente ao ocorrido em 71A.

Há a ausência de amplificação esperada nas faixas 75, 76 e 89 (Figura 8 e Figura 9) para as amostras “X9” e “X10” (Quadro 7). Na faixa 75, a amostra “X9” apresentou amplificação do gene *erm(B)*, porém não amplificou o gene *tet(M)*. Nas faixas 76 e sua duplicata, a faixa 89, a amostra “X10” amplificou os genes *tet(M)* e *mef(A/E)*, porém não amplificou o gene *erm(B)*. A provável explicação para essa ausência é o consumo dos dNTPs de forma desigual entre as reações de amplificação, uma vez que não foi feito o balanceamento nas concentrações dos três O.I.s após sua mistura, e uma reação pode ocorrer com maior frequência ou velocidade que

outras (Elnifro *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2014). Para a amostra “X9” observou-se amplificação de ambos os genes *tet(M)* e *erm(B)* na reação em duplicata visualizada na faixa 88 (equivalente à 75) pela formação da banda 88B na Figura 9, mostrando que a reação teve seu funcionamento adequado.

Existe a possibilidade do refinamento futuro das metodologias, a partir de um novo balanceamento das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores (O.I.s). Para bandas expressas muito fortemente nos géis de eletroforese, como as bandas do gene *erm(B)* que apresentaram-se muito intensas e com picos muito altos, é possível ser feita a diminuição da concentração de seus O.I.s; para bandas com intensidade mais fraca, como as do gene *tet(M)*, pode-se aumentar a concentração dos O.I.s. Assim é possível equilibrar as múltiplas reações que ocorrem simultaneamente criando a possibilidade de obter bandas de intensidade similar e padronizadas (Schoske *et al.*, 2003; Sint; Raso; Traugott, 2012). Essa otimização é desejada, pois o DNA do estudo apresenta diferentes níveis de degradação devido ao longo período decorrente desde sua extração. Quando amostras dispõem de quantidades baixas de DNA, a taxa de detecção das bandas pode ser enviesada em direção aos pares de primers mais sensíveis.(Markoulatos; Siafakas; Moncany, 2002).

Ainda há espaço para refinamento da eletroforese, havendo possibilidade de redução da quantidade de agarose para construção do gel a fim de permitir uma maior mobilidade dos fragmentos que formam as bandas. Isso poderia facilitar a diferenciação das bandas formadas por *tet(M)* e *mef(A/E)*. Uma alternativa é a implementação de técnica eletroforese que utilize marcadores corantes diferentes para cada amplicon adicionados a sondas marcadas com fluorescências diferentes, que tenham como alvo cada produto diferente de amplificação. Essa técnica possibilita a diferenciação dos produtos não importando seu tamanho (Perlman; Chikarmane; Halvorson, 1987; Schoske *et al.*, 2003).

A aplicabilidade da técnica multiplexada para pesquisa de genes de resistência a antibióticos não se restringe ao DNA de *S. agalactiae*. Ao redor do mundo, a existência dos genes de resistência a antibióticos foi amplamente pesquisada em diversas bactérias. Brenciani *et al.* (2007) constataram a incidência do gene *tet(M)* em todos os *Streptococcus pyogenes* resistentes a tetraciclina. Latini *et al.* (1999) identificaram amostras de *S. pneumoniae* que carregavam o gene *tet(M)* com expressão do fenótipo. Roberts e Kenny (1986) relataram a presença de *tet(M)* em *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp. e *Bacterioides* spp., além da detecção em *S. agalactiae*. Luna *et al.* (1999)relataram a mobilidade do gene *mef* entre uma variedade de bactérias gram-positivas, entre elas *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*.

Weisblum (1995) relatou que os genes *erm(A/TR)* e *erm(B)* foram encontrados em *Staphylococcus aureus* e que aproximadamente outros 30 genes *erm* foram isolados de diversas fontes incluindo *Streptococcus sanguis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium perfringens*, *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp., entre outros. Os achados desses autores ampliam o potencial de aplicação da metodologia multiplex para PCRs que identifiquem a presença dos mesmos genes de interesse em outras bactérias.

Outros autores organizaram a epidemiologia desses genes em revisões sistemáticas recentemente publicadas. O Quadro 9 resume os dados epidemiológicos da ocorrência dos genes *tet(M)*, *tet(O)*, *mef(A/E)*, *erm(B)* e *erm(A/TR)* ao redor do mundo e os locais de circulação em que foram encontrados. O Quadro 10 resume, para os mesmos genes, a sua prevalência no Brasil em espécies de bactérias diferentes de *S. agalactiae*.

Quadro 9 - Epidemiologia molecular de genes de resistência no mundo

Genes	País	Hospedeiro do micro-organismo	Referência
<i>tet(M)</i>	Gabão	Em humanos	Dikoumba <i>et al.</i> , (2023)
<i>tet(M)</i> , <i>erm(A/TR)</i> e <i>erm(B)</i>	RD Congo	Em humanos	
<i>tet(M)</i> e <i>erm(B)</i>	Camarões	Em animais	
<i>tet(M)</i> , <i>erm(B)</i> e <i>mef(A)</i>	Camarões	No ambiente	
<i>tet(M)</i> e <i>erm(B)</i>	África do Sul	Em amostras clínicas	Ekwanzala <i>et al.</i> , (2018)
<i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> e <i>erm(B)</i>	África do Sul	Em animais	
<i>tet(M)</i> , <i>erm(B)</i> e <i>mef(A)</i>	África do Sul	No ambiente	
<i>tet(M)</i>	Índia	Em sistemas aquáticos	Singh <i>et al.</i> , (2019)
<i>erm(B)</i>	Paquistão	Em sistemas aquáticos	
<i>tet(O)</i> , <i>tet(M)</i> e <i>erm(B)</i>	China	Em sistemas aquáticos	
<i>tet(M)</i>	África do Sul	Em sistemas aquáticos	
<i>tet(O)</i>	Polônia	Em sistemas aquáticos	
<i>erm(B)</i>	Espanha	Em sistemas aquáticos	
<i>erm(B)</i>	Itália	Em sistemas aquáticos	
<i>erm(B)</i> e <i>tet(O)</i>	EUA	Em sistemas aquáticos	
<i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> e <i>erm(B)</i>	Cuba	Em sistemas aquáticos	

Fonte: autor, (2024).

Quadro 10 - Diversidade de bactérias portando genes de resistência a antibióticos no Brasil

Genes	Espécies	Referência
<i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> e <i>erm(B)</i>	<i>S. aureus</i>	Rabello <i>et al.</i> , (2020)
<i>tet(M)</i>	<i>Salmonella infantis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	Vilela; Falcão; Campioni, (2020)
<i>tet(M)</i> e <i>erm(B)</i>	<i>Escherichia coli</i>	
<i>erm(B)</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>erm(B)</i>	<i>Citrobacter koseri</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella variicola</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	Batista <i>et al.</i> , (2023)
<i>tet(M)</i>	<i>Acinetobacter spp.</i> <i>Aeromonas spp.</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Serratia spp.</i>	

Fonte: autor, (2024).

Nota: *mef(A/E)* e *erm(A/TR)* não foram mencionados nos artigos.

A presença generalizada de bactérias possuindo genes de resistência a antibióticos é primariamente ocasionada pelo uso excessivo e inapropriado de antibióticos. O rejeito contaminado gerado pela atividade industrial, agrícola, aquícola, e por fazendas de animais e instalações clínicas, na maioria das vezes passa por efluentes que se esvaziam diretamente nos rios. Além disso, a contaminação fecal das águas superficiais também desempenha um papel significativo nesse fenômeno, uma vez que a maioria dos antibióticos consumidos são excretados inalterados (Singh *et al.*, 2019).

Acredita-se que vários genes de resistência clinicamente relevantes tenham surgido de bactérias não-patogênicas e sido passadas para outras espécies presentes em um mesmo ecossistema através de transferência genética horizontal, seja pela (1) conjugação, mecanismo considerado o mais importante para transferência de genes de resistência, que requer o contato entre as células bacterianas, ou por (2) transformação, através de internalização, integração e expressão de fragmentos de DNA extracelular, ou pela (3) transdução, via bacteriófagos que carregam o gene de resistência de uma bactéria que foi previamente infectada, ou ainda pela (4) ação de agentes de transferência de genes, partículas produzidas pela bactéria hospedeira que simulam estruturas de bacteriófagos, capazes de transferir seu conteúdo genético (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

A disseminação de genes de resistência a antibióticos entre patógenos requer estratégias de monitoramento eficientes, particularmente para o manejo terapêutico. O enfrentamento da resistência a antibióticos requer a utilização de uma abordagem “One Health” que englobe os esforços de estudos em humanos, animais e meio-ambiente (Dikoumba *et al.*, 2023).

A metodologia multiplex desse estudo adiciona-se aos esforços de monitoramento dos cinco genes de resistência abrangidos enquanto aprimora a rotina de laboratórios que os investigam. Também apresenta potencial de aplicação em outras populações de bactérias de diferentes espécies, que exibam fenótipo de resistência a tetraciclinas, macrolídeos e lincosamidas desde que existam ocorrências na literatura da prevalência desses genes nestas populações.

Nos dias atuais, outras metodologias são empregadas na investigação dos genes de resistência a antibióticos, a exemplo da tecnologia de metagenômica tem sido aplicada a fim de entender a completa disseminação da resistência a antibióticos. A técnica realiza o mapeamento do resistoma (reservatório de genes de resistência a antibióticos de um ambiente) de ecossistemas como solo, esgoto, microbiota humana e animal, etc. A aplicação da metagenômica para investigar todos os genes dos micro-organismos presentes em um ambiente fez surgir uma quantidade imensa de dados que incluem o resistoma ali presente. Revelou também existirem genes de resistência em lugares que não se conhecia sua prevalência e descobriu-se que tais genes agrupam-se por ecologia, ou seja, que os resistomas de solo e esgoto diferem significativamente, apesar de haver similaridades (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

7 CONCLUSÃO

A metodologia multiplex em PCR demonstrou ser aplicável na identificação de genes de resistência a antibióticos em *S. agalactiae*. As presenças dos genes *tet(M)*, *tet(O)*, *mef(A/E)*, *erm(B)* e *erm(A/TR)* puderam ser avaliadas em dois conjuntos de reação única, com volumes amostrais reduzidos, menor tempo de trabalho e menor gasto de reagentes. Determinou-se as concentrações e temperaturas ideais para as atividades dos primers utilizados

O primeiro conjunto, composto por *erm(B)*, *mef(A/E)* e *tet(M)*, resultou em amplificações nítidas e ótima correlação estatística entre os resultados das metodologias multiplex e monoplex. O segundo conjunto, composto por *erm(A/TR)* e *tet(O)*, resultou em uma concordância completa. confirmou-se a correlação entre as metodologias e demonstrou-se a confiabilidade dos resultados da metodologia multiplex.

A metodologia apresentada trouxe, portanto, uma potencial melhoria na rotina dos laboratórios que usufruirão da técnica para estudos de diferenciação desses mecanismos de resistência em *S. agalactiae* e, possivelmente, outras bactérias.

REFERÊNCIAS

- ADMASSIE, Mesele. Current Review on Molecular and Phenotypic Mechanism of Bacterial Resistance to Antibiotic. **Science Journal of Clinical Medicine** 2018, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 13–19, 2018. Disponível em: <https://www.sciencepg.com/article/10.11648/j.sjcm.20180702.11>. Acesso em: 9 abr. 2024.
- AGUIAR, Joslaine Nunes *et al.* Evolução das políticas brasileiras de saúde humana para prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos: revisão de escopo. **Revista Panamericana de Salud Pública**, [s. l.], v. 47, p. 1, 2023. Disponível em: </pmc/articles/PMC10202340/>. Acesso em: 25 maio 2023.
- BARROS, Clarissa Campos. **Epidemiologia das infecções neonatais e da colonização materna por Streptococcus agalactiae no Brasil: uma revisão sistemática**. 2023. - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2023. Disponível em: <http://app.uff.br/riuff/handle/1/28442>. Acesso em: 28 maio 2023.
- BATISTA, Marcos Paulo Barbosa *et al.* Diversity of bacteria carrying antibiotic resistance genes in hospital raw sewage in Southeastern Brazil. **Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 239–250, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36640035/>. Acesso em: 8 abr. 2024.
- BERNER, Reinhard. Group B streptococcus vaccines: one step further. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 158–160, 2021. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30451-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30451-5). Acesso em: 8 abr. 2024.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Consenso sobre o uso racional de antimicrobianos**. [S. l.], 2001. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_03.pdf. Acesso em: 19 maio 2023.
- BRENCIANI, Andrea *et al.* Genetic elements carrying erm(B) in Streptococcus pyogenes and association with tet(M) tetracycline resistance gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 1209–1216, 2007. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.01484-06>. Acesso em: 8 abr. 2024.
- CHEN, Swaine L. Genomic Insights Into the Distribution and Evolution of Group B Streptococcus. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 10, n. JUN, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31316488/>. Acesso em: 25 abr. 2024.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 33rd ed.ed. [S. l.]: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023. v. CLSI supplement M100 Disponível em: www.clsi.org. Acesso em: 7 abr. 2024.
- COSTA, Anderson Luiz Pena da; SILVA JUNIOR, Antonio Carlos Souza. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, Macapá, v. 7, n. n, p. 45–57, 2017. Disponível em: <https://periodicos.unifap.br/index.php/estacao>. Acesso em: 25 maio 2023.

DE LAMBALLERIE, X. *et al.* A one-step microbial DNA extraction method using “Chelex 100” suitable for gene amplification. **Research in microbiology**, [s. l.], v. 143, n. 8, p. 785–790, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1298031/>. Acesso em: 8 abr. 2024.

DEPARDIEU, Florence *et al.* Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 79–114, 2007. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00015-06>. Acesso em: 28 maio 2023.

DIKOUMBA, Annicet-Clotaire *et al.* Molecular epidemiology of antimicrobial resistance in central africa: A systematic review. **Access Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 8, 2023.

DONG, Ying *et al.* Neonatal sepsis: within and beyond China. **Chinese medical journal**, [s. l.], v. 133, n. 18, p. 2219–2228, 2020.

DONNER, Allan; KLAR, Neil. The statistical analysis of kappa statistics in multiple samples. **Journal of Clinical Epidemiology**, [s. l.], v. 49, n. 9, p. 1053–1058, 1996.

EDMOND, Karen M. *et al.* Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, [s. l.], v. 379, n. 9815, p. 547–556, 2012.

EKWANZALA, Mutshiene Deogratias *et al.* Systematic review in South Africa reveals antibiotic resistance genes shared between clinical and environmental settings. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], v. 11, p. 1907–1920, 2018.

ELNIFRO, Elfath M. *et al.* Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 559–570, 2000.

FIORELLA, Bianchi-Jassir *et al.* Systematic review of Group B Streptococcal capsular types, sequence types and surface proteins as potential vaccine candidates. **Vaccine**, [s. l.], v. 38, n. 43, p. 6682–6694, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32888741/>. Acesso em: 7 set. 2023.

FIORELLA, Bianchi-Jassir *et al.* Systematic review of Group B Streptococcal capsular types, sequence types and surface proteins as potential vaccine candidates. **Vaccine**, [s. l.], v. 38, n. 43, p. 6682–6694, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32888741/>. Acesso em: 7 set. 2023.

GONÇALVES, Bronner P. *et al.* Group B streptococcus infection during pregnancy and infancy: estimates of regional and global burden. **The Lancet Global Health**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. e807–e819, 2022.

HAJBA, László *et al.* Capillary Gel Electrophoresis of Proteins: Historical overview and recent advances. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 162, p. 117024, 2023.

HALSEY, N. A. *et al.* Revised Guidelines for Prevention of Early-onset Group B Streptococcal (GBS) Infection. **Pediatrics**, [s. l.], v. 99, n. 3, p. 489–496, 1997. Disponível em: [/pediatrics/article/99/3/489/67305/Revised-Guidelines-for-Prevention-of-Early-onset](https://pediatrics/article/99/3/489/67305/Revised-Guidelines-for-Prevention-of-Early-onset). Acesso em: 14 maio 2023.

HANNA, Morcos; NOOR, Asif. Streptococcus Group B. **StatPearls**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553143/>. Acesso em: 3 set. 2021.

- HAYES, Katherine; O'HALLORAN, Fiona; COTTER, Lesley. A review of antibiotic resistance in Group B Streptococcus: the story so far. **Critical reviews in microbiology**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 253–269, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32363979/>. Acesso em: 8 maio 2023.
- HENEGARIU, O. *et al.* Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. **BioTechniques**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 504–511, 2018. Disponível em: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/97233rr01>. Acesso em: 29 maio 2023.
- LAZAR JUNIOR, Istvan. **GelAnalyzer**®. [S. l.], 2023. Disponível em: <http://www.gelanalyzer.com/?i=1>. Acesso em: 19 mar. 2024.
- KAUNITZ, Jonathan D. The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power. **Digestive diseases and sciences**, [s. l.], v. 60, n. 8, p. 2230–2231, 2015.
- LARSEN, John W.; SEVER, John L. Group B Streptococcus and pregnancy: a review. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 198, n. 4, p. 440–450, 2008.
- LATINI, Laura *et al.* Prevalence of *mefE*, *erm* and *tet(M)* genes in *Streptococcus pneumoniae* strains from central Italy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 29–33, 1999.
- LIU, Guangjin *et al.* Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. **Diseases of Aquatic Organisms**, [s. l.], v. 122, n. 2, p. 163–170, 2016. Disponível em: <https://www.int-res.com/abstracts/dao/v122/n2/p163-170/>. Acesso em: 25 maio 2023.
- LUNA, Vicki A. *et al.* A variety of Gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 19–25, 1999. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/jac/44.1.19>. Acesso em: 8 abr. 2024.
- LYNCH, Michael; RABINOW, Paul. Making PCR: A Story of Biotechnology. **The Journal of the Royal Anthropological Institute**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 794, 1997.
- MADRID, Lola *et al.* Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 65, n. suppl_2, p. S160–S172, 2017. Disponível em: https://academic.oup.com/cid/article/65/suppl_2/S160/4589587. Acesso em: 14 maio 2023.
- MARIMÓN, José María *et al.* Erythromycin resistance and genetic elements carrying macrolide efflux genes in *Streptococcus agalactiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 49, n. 12, p. 5069–5074, 2005. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.49.12.5069-5074.2005>. Acesso em: 29 maio 2023.
- MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 47–51, 2002.
- MIRANDA, Isabela Carollayne da Silva; VIEIRA, Roberta Michelly Silva; SOUZA, Thamires Fernanda Moura Pedrosa. Consequences of inappropriate use of antibiotics: a literature review. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. e58411730225–e58411730225, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/30225>. Acesso em: 24 mar. 2024.

MULLIS, Kary B.; FERRÉ, François.; GIBBS, Richard (Richard A.). **The Polymerase chain reaction**. [S. l.]: Birkhäuser, 1994. Disponível em: https://books.google.com/books/about/The_Polymerase_Chain_Reaction.html?hl=pt-BR&id=gjrTBwAAQBAJ. Acesso em: 28 maio 2023.

NCBI. **Primer Blast**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Acesso em: 27 mar. 2024.

PÉREZ-TRALLERO, Emilio *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus pyogenes* isolates displaying the MLSB phenotype of macrolide resistance in Spain, 1999 to 2005. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 1228–1233, 2007. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.01054-06>. Acesso em: 29 maio 2023.

PERLMAN, Daniel; CHIKARMANE, Hemant; HALVORSON, Harlyn O. Improved resolution of DNA fragments in polysaccharide-supplemented agarose gels. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 163, n. 1, p. 247–254, 1987.

POYART, Claire *et al.* Genetic basis of antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 794–797, 2003. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.47.2.794-797.2003>. Acesso em: 29 maio 2023.

PROCOP, Gary W. et al. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. [S. l.]: Jones & Bartlett Publishers, 2020.

RAABE, Vanessa N.; SHANE, Andi L. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*) . **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 7, n. 2, 2019. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/spectrum>. Acesso em: 16 maio 2023.

RABELLO, Renata F. *et al.* Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. **Animals : an open access journal from MDPI**, [s. l.], v. 10, n. 4, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32224900/>. Acesso em: 8 abr. 2024.

ROBERTS, M. C.; KENNY, G. E. Dissemination of the tetM tetracycline resistance determinant to *Ureaplasma urealyticum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 350–352, 1986. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.29.2.350>. Acesso em: 8 abr. 2024.

SCHOSKE, Richard *et al.* Multiplex PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10 y chromosome short tandem repeat (STR) loci. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 375, n. 3, p. 333–343, 2003. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-002-1683-2>. Acesso em: 27 mar. 2024.

SCHRAG, Stephanie et al. **Prevention of perinatal group B streptococcal disease**. [S. l.], 2002. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00043277.htm>. Acesso em: 31 mar. 2024.

SHABAYEK, Sarah; SPELLERBERG, Barbara. Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 9, n. MAR, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29593684/>. Acesso em: 8 maio 2023.

SHARMA, J K; GOPALKRISHNA, V; DAS, B C. A simple method for elimination of unspecific amplifications in polymerase chain reaction. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 20, n. 22, p. 6117–6118, 1992.

SINGH, Rachna *et al.* Antibiotic resistance in major rivers in the world: A systematic review on occurrence, emergence, and management strategies. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 234, p. 1484–1505, 2019.

SINGH, Jagtar *et al.* International Journal of Advanced Research in Biological Sciences A critical review on PCR, its types and applications. **Int. J. Adv. Res. Biol.Sci**, [s. l.], v. 1, n. 7, p. 65–80, 2014. Disponível em: www.ijarbs.com. Acesso em: 5 abr. 2024.

SINT, Daniela; RASO, Lorna; TRAUGOTT, Michael. Advances in multiplex PCR: Balancing primer efficiencies and improving detection success. **Methods in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 898–905, 2012.

SUDAN, Vikrant *et al.* Standardization and validation of simple PCR, duplex PCR and RAPD in comparison to blood smear examination for diagnosing bovine tropical theileriosis. **Biologicals**, [s. l.], v. 46, p. 88–91, 2017.

TAZI, Asmaa *et al.* The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 207, n. 11, p. 2313–2322, 2010. Disponível em: www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20092594. Acesso em: 14 maio 2023.

THERMO FISHER. **Multiple Primer Analyzer**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>. Acesso em: 27 mar. 2024.

VILELA, Felipe Pinheiro; FALCÃO, Juliana Pfrimer; CAMPIONI, Fábio. Analysis of Resistance Gene Prevalence in Whole-Genome Sequenced Enterobacteriales from Brazil. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 594–604, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31746671/>. Acesso em: 8 abr. 2024.

VON WINTERSDORFF, Christian J.H. *et al.* Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. FEB, p. 174871, 2016. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 9 abr. 2024.

WANG, Jing *et al.* Maternal colonization with group B Streptococcus and antibiotic resistance in China: systematic review and meta-analyses. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, [s. l.], v. 22, n. 1, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36639677/>. Acesso em: 8 maio 2023.

WANG, Ping *et al.* Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of Streptococcus agalactiae isolates circulating in Beijing, China. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 3, 2015.

WEISBLUM, Bernard. MINIREVIEW Erythromycin Resistance by Ribosome Modification. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 577–585, 1995. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/aac>. Acesso em: 8 abr. 2024.

ZAKERIFAR, Mona *et al.* Antibiotic resistance genes and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women. **BMC Pregnancy and Childbirth**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1–13, 2023. Disponível em:
<https://bmcpregnancychildbirth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12884-023-05380-4>.
Acesso em: 16 maio 2023.