

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Gustavo Enck Sambrano

**Determinantes de Virulência em
isolados Clínicos de *Streptococcus
pyogenes* da Cidade de Porto
Alegre.**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2014

Gustavo Enck Sambrano

**Determinantes de Virulência em
Isolados Clínicos de Streptococcus
pyogenes da Cidade de Porto
Alegre.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para obtenção do grau de mestre.

Orientador: Dr. Pedro Alves d'Azevedo
Co-orientador: Dr. Gustavo Pelicoli Riboldi

Porto Alegre, 2014

Catálogo na Publicação

Sambrano, Gustavo Enck

Determinantes de virulência em isolados clínicos de *Streptococcus pyogenes* da cidade de Porto Alegre / Gustavo Enck Sambrano. -- 2014.

78 p. : graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Orientador(a): Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo ;
coorientador(a): Dr. Gustavo Pelicioli Riboldi.

1. *Streptococcus pyogenes*. 2. emm typing. 3. fatores de virulência. 4. Real-time PCR. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Dr. Pedro Alves d'Azevedo, pela oportunidade de seguir trabalhando com microbiologia e pela confiança depositada em meu trabalho. Agradeço também o apoio nos momentos de dificuldade.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Gustavo Pelicioli Riboldi por toda ajuda, ensinamentos e parceria. Muito obrigado, meu aprendizado nesta área foi muito devido às tuas explicações e ensinamentos.

Agradeço aos meus colegas de laboratório especialmente Bruna Batista, Keli Reiter, Mariana Mott, Thiago Paim, Paulo Fallavena e Fernando Hayashi pela parceria durante os dias de trabalho.

Aos meus pais e irmã, Henrique, Vera e Helena pela confiança que sempre depositaram em mim.

Agradeço por fim à Alessandra que esteve presente durante toda minha formação, tanto acadêmica quanto pessoal. Tu és muito importante e especial pra mim. Obrigado por tudo.

RESUMO

Objetivos: O objetivo do presente estudo foi avaliar 33 genes que codificam fatores de virulência encontrados em isolados clínicos de *Streptococcus pyogenes* da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Materiais e Métodos:** Vinte e seis isolados clínicos de *S. pyogenes* tiveram o gene *emm* sequenciado com a posterior tipagem do mesmo. Para a avaliação da presença ou ausência dos 32 genes dos fatores de virulência foi utilizada a técnica de PCR Real-time para 29 isolados clínicos de *S. pyogenes*. **Resultados:** No sequenciamento para tipagem do gene que codifica a proteína M, foram encontrados ao todo 14 sorotipos diferentes dentre os 26 isolados analisados. O tipo mais encontrado de *emm* foi o *emm1* sendo encontrado em 30,77% de todos os isolados. Os sorotipos 12, 27, 57, 60 e 68 estiveram presentes em 7,69%. Outros sorotipos foram encontrados somente em 3,85%, os quais são *emm* 8, 22, 44, 58, 59, 73, 90 e 92. Analisando os dados de presença dos 32 fatores de virulência dentre os 29 isolados envolvidos no estudo, verificou-se que em média estes apresentaram 71% dos genes que codificam fatores de virulência, enquanto os isolados que apresentaram um menor número de genes de virulência apresentaram 53,13%, e o isolado mais virulento, em número de genes, apresentou 90,6%. Analisando os resultados por sítio de isolamento, os isolados de orofaringe foram os que apresentaram um maior número de fatores de virulência, em média (84,48%), seguidos por isolados de lesão de pele (79,02%) e pelos isolados de hemocultura (74,14%). Avaliando a presença dos fatores de virulência em relação ao número de isolados que apresentou cada um dos genes obtiveram-se os seguintes resultados: quando se verificou os superantígenos (SAGs) com os genes *speA* alelos 1, 2 e 3 estes estiveram presentes em 41,38% do total de 29 isolados, assim como o alelo 5 que esteve presente em 51,72% e o alelo 4 que não foi encontrado em nenhum isolado. Os SAGs mais frequentes foram, em ordem do mais frequente para o menos frequente, os seguintes: *speG* 96,55%, *speL* 89,66%, *smeZ* e *speJ* em 79,31%, *speM* em 72,41%, *speI* em 68,97%, *speH* em 55,17% e os três menos frequentes foram *speC* em 37,93%, *ssa* em 31,03% e *speK* em 27,59%. Outro grupo de fatores de virulência avaliado foi o operon *sagABCDEFGHI*, responsável pela codificação da SLS *sagA*, *sagB*, *sagG* estiveram presentes em 79,31% dos isolados, *sagI* 75,86%, *sagD* em 72,41%, *sagF* em 68,97%, *sagC* e *sagE* em 58,62% e o último e menos frequente *sagH* presente em 37,93% de todos os 29 isolados. Três fatores mitogênicos foram avaliados quanto a sua

presença dentre os isolados de *S. pyogenes* e sua frequência foi a seguinte: *mf2* 89,66%, *mf3* 72,41% e *dnaseB* (*SpeF*) encontrada em 62,07% dos isolados. Dois fatores de opacidade do soro foram avaliados *sofC* encontrado em 62,07% e *sofN* 44,83%. Três genes foram encontrados em todos os isolados, os quais foram: *slo*, *scpa* e *spna*. Os genes *sda* e *nga* foram encontrados em 89,66% e o gene *sic* esteve presente em 79,31% dos 29 isolados.

Palavras-chave: *Streptococcus pyogenes*, fatores de virulência, proteína M, tipagem do gene *emm*, Real-time PCR.

ABSTRACT

Objectives: The aim of the present study was to evaluate 33 genes encoding virulence factors of clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* collected from Porto Alegre, RS, Brazil. **Methods:** The *emm* gene of twenty six *S. pyogenes* isolates was sequenced directly in both directions to obtain the most frequent serotypes found in South of Brazil. Thirty two genes encoding virulence factors of *S. pyogenes* were evaluated by Real-Time PCR to verify their presence or absence in 29 isolates of *S. pyogenes*. **Results:** Fourteen different *emm* types were detected among the twenty six clinical isolates. The most frequent *emm* type found was *emm1* (30.77%), followed by the *emm* types 12, 27, 57, 60 and 68 each one of them presenting 7.69% of the total isolates. The twenty nine isolates presented in mean, 71% of the virulence factors genes. The isolates the presented more and less virulence factors had 90.6% and 51.13% of the thirty two genes. The analysis of the presence of superantigens genes showed that from the 29 isolates evaluated, the amount of each gene found was in percentage as follows: *speA* alleles 1, 2 and 3 (41.38%), *speA* allele 5 (51.72%), *speG* (96.55%), *speL* (89.66%), *smeZ* and *speJ* (79.31%), *speM* (72.41%), *speI* (68.97%), *speH* (55.17%), *speC* (37.93%), *ssa* (31.03%) and *speK* (27.59%). The operon *sagABCDEFGHI* was present by gene; *sagA*, *sagB*, *sagG* in 79.31%, *sagI* in 75.86%, *sagD* in 72.41%, *sagF* in 68.97%, *sagC* and *sagE* in 58.62% and the last and less frequent *sagH* in 37.93% of all isolates. Three mitogenic factors were evaluated in this study, and were present in 89.66% (*mf2*), 72.41% (*mf3*) and 62.07% (*dnaseB SpeF*) of all twenty nine isolates. The two serum opacity factors analyzed were *sofC* and *sofN* found respectively in 62.07% and 44.83% of the isolates. The *sdal* and *nga* genes were found in 89.66% and the *sic* gene was found in 79.31% of the *S. pyogenes* strains. Finally, three genes were present in all isolates that were: *slo*, *scpa* and *spna*.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*, virulence factors, M protein, *emm* typing, Real-time PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Frequency of Superantigens among the twenty nine isolates of *S. pyogenes*..... 61
- Figura 2** - Frequency of genes of the operon *sagABCDEFGHI* among the twenty nine isolates of *S. pyogenes* 61
- Figura 3** - Frequency of virulence factors genes among the twenty nine isolates of *S. pyogenes*..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequency of <i>emm</i> types according to clinical specimen in <i>S. pyogenes</i> isolates from the South of Brazil.....	42
Tabela 2 - Composition of primer mixes used in this study.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

LAP – Leucina aminopeptidase
pH – Potencial hidrogeniônico
NaCl – Cloreto de sódio
GAS – estreptococos do grupo A
OMS – Organização Mundial da Saúde
SAgs – Superantígenos
SLS – Estreptolisina S
SLO – Estreptolisina O
HDL – Lipoproteína de Alta Densidade
SIC – Inibidor estreptocócico do Complemento
RNA_r – Ácido ribonucleico ribossômico
MLS_B - Macrolide Lincosamide Streptogramin type B
_cMLS_B - Macrolide Lincosamide Streptogramin type B Constitutive
iMLS_B - Macrolide Lincosamide Streptogramin type B Inducible
erm - erythromycin ribosome methylation
ATP – Adenosina tri-fosfato
CDC - Centers for Disease Control and Prevention
CO₂ - dióxido de carbono
DNA - ácido desoxirribonucleico
PCR - reacção em cadeia por ação da polimerase
°C - Graus Celsius
µg/ml - micrograma por microlitro

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. <i>O Gênero Streptococcus</i>	11
1.2. <i>Streptococcus pyogenes</i>	14
1.3. <i>Infecções causadas por Streptococcus pyogenes</i>	17
1.4. <i>Fatores de virulência</i>	20
1.4.1. <i>Proteína M</i>	20
1.4.2. <i>Superantígenos</i>	22
1.4.3. <i>Estreptolisinas</i>	23
1.4.4. <i>DNases</i>	23
1.4.5. <i>Fator de Opacidade do Soro</i>	23
1.4.6. <i>C5a-peptidase</i>	24
1.4.7. <i>NAD-glicohidrolase</i>	24
1.4.8. <i>Nuclease A e Streptodornase 1</i>	24
1.4.9. <i>Inibidor estreptocócico do complemento (SIC)</i>	24
1.5. <i>Resistência aos Antimicrobianos</i>	25
1.6. <i>Referências</i>	26
JUSTIFICATIVA	30
2. OBJETIVOS	31
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	31
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	31
3. MANUSCRITO I	32
3.1. <i>Instruções para Autores - Diagnostic Microbiology and Infectious Disease</i> ..	43
4. MANUSCRITO II	49
4.1. <i>Instruções para Autores - Medical Microbiology and Immunology</i>	63
5. CONCLUSÕES	70
ANEXOS:	71
<i>ANEXO I - Parecer Consubstanciado CEP - UFCSPA</i>	71
<i>ANEXO II – Parecer Consubstanciado CEP - ISCMPA</i>	73
<i>ANEXO III - Resumos Publicados em Congressos Internacionais</i>	76
<i>ANEXO IV - Resumo Publicado em Congresso Nacional</i>	79
<i>ANEXO V - Participação em Trabalhos Publicados</i>	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Gênero *Streptococcus*

O gênero *Streptococcus* apresenta microorganismos com a morfologia esférica e positivos para a coloração de Gram. Estas bactérias pertencem à classe *Bacilli* e a ordem *Lactobacillales*. O grupo é vasto e compreende muitas espécies clinicamente importantes, as quais são responsáveis por uma grande variedade de infecções em humanos e animais. Espécies como *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus pneumoniae* são importantes, pois causam sérias infecções agudas em homens, porém muitas outras espécies estão envolvidas também em um grande número de doenças, como endocardites infecciosas, abscessos e outras condições patológicas (DEVI, MANSI e RUP, 2011).

Espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Streptococcus* não possuem a enzima catalase e tendem a crescer em cadeias em meios líquidos. A composição da parede celular é típica de Gram-positivos e consiste principalmente de peptidoglicano com glucosamina e ácido murâmico, como amino açúcares e galactosamina como componentes variáveis. *Streptococcus* são bactérias anaeróbias facultativas. Na presença de atmosfera contendo 5% CO₂ muitas espécies têm seu crescimento melhorado. A temperatura ótima de crescimento para estreptococos é de 35-37°C. A adição de sangue ou soro ao meio de cultura leva a uma melhora no crescimento destes microrganismos. Glicose e outros carboidratos são metabolizados produzindo, como resultante, o ácido láctico. Leucina aminopeptidase (LAP) é produzida por todos os estreptococos (SPELLERBERG e BRANDT, 2007).

Provavelmente a primeira tentativa para diferenciar os estreptococos foi feita em 1903 por Shottmuller, quando este utilizou ágar sangue para diferenciar isolados que apresentavam beta hemólise daqueles que não apresentavam. Antes de 1933 testes de tolerância e de fermentação eram os únicos utilizados para diferenciação dos estreptococos. Em 1933, Rebeca Lancefield desenvolveu uma técnica que demonstrava a associação de carboidratos específicos, considerados grupos antigênicos, com isolados beta hemolíticos. Em 1937, Sherman propôs um esquema que dividia os estreptococos em 4 categorias, as quais eram organizadas por reação hemolítica, grupo antigênico de

carboidrato e testes fenotípicos (principalmente testes de fermentação e de tolerância). As quatro categorias de Sherman eram as seguintes: piogênica, viridans, lática e enterococos. A primeira delas incluía isolados beta-hemolíticos com grupos antigênicos definidos (A, B, C, E, F e G). Esta divisão não apresenta diferenças muito significativas em relação à divisão atual (FACKLAM, 2002).

A diferenciação clássica de estreptococos separa estes microrganismos em dois principais grupos, de acordo com o padrão de hemólise apresentado em ágar sangue, os beta-hemolíticos e aqueles que não apresentam beta hemólise. Estreptococos beta-hemolíticos, também conhecidos como estreptococos piogênicos, incluem espécies patogênicas para seres humanos, como: *S. pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis*, bem como microrganismos responsáveis por infecções veterinárias. A nomenclatura estreptococos piogênicos é mais precisa, visto que o grupo inclui espécies que não apresentam beta hemólise como *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*. Além disso, este termo exclui isolados beta-hemolíticos como o grupo *S. anginosus*, os quais pertencem ao grupo de estreptococos viridans (SPELLERBERG e BRANDT, 2011).

Embora a classificação de Lancefield para os estreptococos beta-hemolíticos possa ser confiável para identificação de *S. agalactiae* (*Streptococcus* do grupo B) e, com algumas exceções, para *S. pyogenes* (*Streptococcus* do grupo A), os antígenos dos grupos C, F e G podem ser expressos por diferentes microrganismos com diferentes potenciais patogênicos e características ecológicas. Os antígenos C e G de Lancefield são comumente expressos por isolados de *Streptococcus dysgalactiae* e por *Streptococcus equi* e *Streptococcus canis*, sendo que todos pertencem ao grupo piogênico, porém também pertencentes a estes grupos estão muitas espécies do grupo *anginosus*. Atualmente, em conjunto com características da colônia e atividade hemolítica, os antígenos de Lancefield são os marcadores mais comuns para identificação de *Streptococcus* beta-hemolíticos no laboratório clínico (JENSEN e KILIAN, 2011).

O grupo de estreptococos não piogênicos inclui em sua maioria isolados que apresentam alfa-hemólise ou não apresentam hemólise em ágar sangue além de espécies que apresentam beta-hemólise e são classificadas como do grupo viridans. Em um estudo sobre o gênero *Streptococcus* baseado em comparações na sequência de genes da subunidade 16S do RNA ribossomal, cinco grupos de espécies pertencentes ao grupo viridans foram encontrados além do grupo piogênico (beta-hemolítico, apresentando

colônias de tamanho considerado grande). Estes grupos não piogênicos foram designados da seguinte maneira: grupo *S. mitis*, grupo *S. anginosus*, grupo *S. mutans*, grupo *S. salivarius* e grupo *S. bovis*. Muitas espécies de estreptococos não foram encaixadas em nenhum destes grupos e permanecem sem grupo. Dentre os estreptococos alfa-hemolíticos, o *S. pneumoniae* pode ser separado de outros estreptococos do grupo viridans através dos testes de bile solubilidade e suscetibilidade à optoquina. Contudo, a caracterização fenotípica e as considerações taxonômicas enquadram este microrganismo no grupo *S. mitis*. A relação entre *S. pneumoniae* e outras espécies do grupo *S. mitis* é tão estreita que análise do gene da subunidade 16S do RNA ribossomal de *Streptococcus pneumoniae* revela uma identidade entre as sequências nucleotídicas maior do que 99% quando comparadas com *S. mitis* e *S. oralis*, tornando um desafio a separação das espécies neste grupo. *S. pseudopneumoniae*, uma nova espécie recentemente identificada, apresenta microrganismos que eram antigamente identificados como *S. pneumoniae*. Para esta identificação estudos de hibridização de DNA-DNA e caracterização fenotípica foram conduzidos, identificando algumas características como as seguintes: isolados não encapsulados, insolúveis em bile e suscetíveis à optoquina somente quando incubados em ambiente com a presença de ar, sendo estes isolados associados com doença crônica pulmonar obstrutiva (SPELLERBERG e BRANDT, 2011).

Atualmente, o gênero *Streptococcus* compreende 99 espécies reconhecidas, muitas delas associadas a doenças em humanos e animais (THOMPSON et al., 2013).

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 1,2 milhões de crianças com idade abaixo de cinco anos morrem a cada ano devido à pneumonia, sendo a principal causa desta doença infecções por *S. pneumoniae*. Outra causa importante de doenças e mortalidade relacionadas ao gênero *Streptococcus* são as infecções invasivas causadas por *S. pyogenes*. Esta espécie é responsável por aproximadamente 700 milhões de infecções por ano, resultando em aproximadamente 500.000 mortes (KRZYŚCIAK et al., 2013).

1.2. *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes frequentemente citado como estreptococo do grupo A (GAS) é um patógeno Gram-positivo que infecta estritamente humanos e é o agente causador de doenças mais leves como faringites e impetigo, bem como de doenças mais severas como fascite necrotizante. Infecções causadas por GAS ocorrem em centenas de milhões de pessoas, resultando em mais de 500.000 mortes e contribuindo para problemas de saúde pública em todo o mundo. Este microrganismo é capaz de se adaptar em diversos nichos do corpo humano para que consiga obter os nutrientes necessários, aderir a tecidos, evadir do sistema imune e se replicar. Tem se tornado mais evidente que esta adaptação ao hospedeiro ocorre devido a grandes alterações no transcriptoma destes microrganismos em resposta aos diversos ambientes encontrados *in vivo* durante uma infecção (HAUSE e MCLVER, 2013).

No entanto, *S. pyogenes* pode ser encontrado como colonizador do trato respiratório superior de seres humanos sem manifestar doença. Em crianças na faixa etária de 5-15 anos as taxas de colonização por este microrganismo podem exceder 30% (WILLEMS et al., 2011).

Rebecca Lancefield foi a cientista que mais contribuiu para o conhecimento deste microrganismo, dos anos 1920 até 1970 com as descobertas do grupo polissacarídico estreptocócico e da proteína M, uma proteína ancorada na parede celular. Estas moléculas antigênicas são a base não somente para a caracterização patogênica do organismo como também para esquemas fenotípicos utilizados ao redor do mundo para tipagem destes microrganismos. Durante os anos 30, Fred Griffith, o fundador do Laboratório de Referência em *Streptococcus* do Reino Unido, trabalhou extensivamente em outra proteína da parede celular, conhecida como proteína T. Mesmo estando fisicamente muito distantes Griffith e Lancefield trabalharam muito perto no desenvolvimento de esquemas clássicos para sorotipagem de *Streptococcus* do grupo A (EFSTRATIOU, 2000).

Streptococcus pyogenes são microrganismos que apresentam colônias beta-hemolíticas, geralmente sensíveis à bacitracina (apresentando qualquer halo de inibição no teste de disco-difusão com o disco em uma concentração de 0,04U de bacitracina), mesmo que se tenham estudos descrevendo que alguns isolados podem ser resistentes a este composto (halo de 0mm ou uma concentração inibitória mínima > 0,4µg/ml). Os

microrganismos desta espécie aglutinam com antígeno do grupo A de Lancefield e possuem a enzima pirrolidônio arilamidase (MONTES e ARENZANA, 2007).

A análise da sequência completa do genoma de três tipos de *S. pyogenes* (M1, M3 e M18) permitiu demonstrar que o genoma destes microrganismos varia em tamanho de 1,85-1,9Mb. Dentre os três genomas analisados verificou-se que 1,7Mb da sequência completa de DNA é conservada e que o conteúdo de G+C permanece constante em 38,5-38,6%. Foram encontrados 6 operons de RNA ribossomal e entre 1752 e 1895 fases de leitura aberta (ORFs). A maioria das ORFs (aproximadamente 1500) é conservada entre os três sorotipos analisados, porém cada um possui um pequeno conjunto de ORFs (aproximadamente 100-200) que são próprias. Os cromossomos dos três isolados examinados continham genes que codificavam a cisteína proteinase SpeB, as estreptolisinas S e O, o operon codificador da cápsula de ácido hialurônico e a porção hipervariável da proteína M. A análise das sequências genômicas dos três isolados permitiu também observar e confirmar que fagos são extremamente importantes para a variabilidade genética e que a introdução de genes codificando toxinas e outras proteínas associadas à virulência frequentemente ocorrem por transdução mediada por estes fagos (BISNO et al., 2003).

Muitos estudos de vigilância epidemiológica têm sido realizados devido à severidade das infecções causadas por *S. pyogenes*, os quais são baseados na tipagem dos isolados bacterianos coletados. Para tanto, diversos métodos foram desenvolvidos, sendo o mais extensivamente utilizado o da tipagem baseada na proteína M. Esta é uma proteína de superfície celular que é considerada o principal determinante de virulência de *S. pyogenes*. A tipagem sorológica clássica baseada em métodos de aglutinação foi amplamente substituída pela tipagem baseada na sequência da extremidade 5' do gene que codifica a proteína M (*emm*) no final da década de 1990. Com isso, atualmente, muitos estudos epidemiológicos sobre faringites e doenças invasivas relacionadas a *S. pyogenes* tem sido realizados utilizando o sequenciamento do gene *emm*, principalmente nos Estados Unidos da América, Canadá e Europa, porém muitos outros países tem também desenvolvido estudos nesta área (STEER et al., 2009a).

No entanto, mesmo com o maior entendimento das infecções causadas por *S. pyogenes* devido ao sequenciamento de certos tipos de *emm*, muito ainda precisa ser elucidado. Foram verificadas mudanças moleculares em isolados de *S. pyogenes* que permitem a evolução de clones mais virulentos classificados como um determinado tipo de *emm*. Análise comparativa de mais de 300 isolados classificados como *emm3*

provenientes de três epidemias causadas por *S. pyogenes* em Ontario trouxe novas informações sobre genética populacional bacteriana. Estes dados demonstraram que as populações de *S. pyogenes* não são estáticas, mas são formadas por muitas subpopulações dentro de um mesmo tipo de *emm*. Cada epidemia foi causada por uma mudança na dinâmica populacional destes microrganismos, resultando na emergência de uma subpopulação de *emm3* dentro da comunidade previamente imune. Este fato pode explicar o ciclo tradicional de 4-7 anos de epidemias causadas por *S. pyogenes*. Contudo, o tipo *emm1* conhecido causador de epidemias, não obedece a este ciclo e tem persistido por 25 anos como causador de infecções em humanos (LYNSKEY et al., 2011).

A análise molecular de isolados de *S. pyogenes* circulantes demonstra que infecções invasivas são principalmente atribuíveis a uma população clonal hipervirulenta do tipo *emm1* (LUCA-HARARI et al., 2009).

O clone *emm1* possui uma característica importante para sua sobrevivência que é a habilidade de alterar rapidamente seu fenótipo para um fenótipo hipervirulento durante as infecções, o que foi demonstrado por análises transcricionais e proteômicas (HASEGAWA et al., 2010).

Diante da importância de se controlar infecções causadas por *S. pyogenes*, o desenvolvimento de vacinas que impeçam estes microrganismos de estabelecerem infecções tem sido discutido a algum tempo. O desenvolvimento de vacinas contra *S. pyogenes* voltou-se para a região N-terminal da proteína M, porém atualmente, a atenção tem-se voltado para epitopos conservados destes microrganismos. Contudo, a realidade demonstra que somente uma vacina, a multivalente N-terminal, foi aprovada para ensaios clínicos nos últimos 30 anos. Devido a diferenças significativas na epidemiologia dos *S. pyogenes* ao redor do mundo, esta vacina pode obter resultados pouco efetivos em algumas localidades mundiais. Já vacinas baseadas em epitopos conservados possuem a capacidade de oferecer proteção contra todos os tipos de *S. pyogenes*, podendo assim ser consideradas verdadeiras vacinas globais. No entanto, somente um destes candidatos a vacinas, a vacina J8, entrará em fase I de ensaio clínico em um futuro próximo (STEER et al., 2009b).

1.3. Infecções causadas por *Streptococcus pyogenes*

No século XIX as infecções causadas por *S. pyogenes* eram associadas com severos e frequentes episódios de epidemias por doenças invasivas e frequentemente fatais, incluindo a pandemia de febre escarlatina nos Estados Unidos da América e Grã-Bretanha. Infecções invasivas causadas por *S. pyogenes* apresentando severas manifestações, continuaram através da década de 1920. Até o início da década de 1980 a severidade destas doenças teve um declínio considerável, quando, em diferentes partes do mundo industrializado, um aumento estatisticamente significativo ocorreu (AZIZ e KOTB, 2008).

Dentre as doenças causadas por *Streptococcus pyogenes* estão incluídas faringites e pioderma, relatadas como mais brandas, bem como síndrome do choque tóxico, fascite necrotizante, glomerulonefrite e doença reumática cardíaca, representando as mais severas. Os maiores reservatórios destes microrganismos são as crianças. Países em desenvolvimento apresentam a maior prevalência de infecções por GAS, bem como suas complicações (TARTOF *et. al.*, 2010).

De acordo com a organização mundial da saúde, *S. pyogenes* é responsável por 15-20% dos casos de faringite bacteriana que afeta principalmente indivíduos na faixa etária de 5-18 anos. A incidência da faringite bacteriana varia entre países e muitas vezes até mesmo dentro do mesmo país, existem variações em diferentes regiões de acordo com fatores como idade, classe socioeconômica e fatores ambientais além de qualidade de serviços em saúde (AMICIS *et al.*, 2013).

Febre reumática é também uma doença causada por *S. pyogenes* e ocorre após uma infecção de garganta não tratada em indivíduos susceptíveis, principalmente crianças e adolescentes (3 a 19 anos). No entanto, outros fatores estão envolvidos neste tipo de doença, como baixo padrão de vida e a falta de acesso a cuidados médicos. A incidência de febre reumática aguda em países em desenvolvimento excede a taxa de 50 por 100.000 crianças (GUILHERME e KALIL, 2010).

As principais características clínicas dessa doença são poliartrite, cardite, coreia, eritema marginal e nódulos subcutâneos. A característica que primeiro aparece em casos de febre reumática é, na maioria dos casos, a artrite que está presente em 60% a 80% dos pacientes. Cardite, a complicação mais séria ocorre em poucas semanas após a infecção em 30% a 45% dos pacientes. Endocardite frequentemente leva a doença

reumática cardíaca crônica, que é caracterizada por lesões valvulares progressivas e permanentes (GUILHERME e KALIL, 2010).

Outra doença importante relacionada a infecções causadas por *S. pyogenes* é a glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica, a qual é considerada uma seqüela não supurativa de ocorrência posterior a uma infecção por *S. pyogenes*. Crianças e adultos jovens são os mais comumente afetados, sendo que o dobro da incidência é verificado em homens em relação a mulheres. Por volta dos anos de 1940, foram encontradas evidências de que infecções de pele causadas por estreptococos eram associadas com glomerulonefrite aguda e que estas infecções usualmente não causavam febre reumática, sugerindo que alguns isolados eram reumatogênicos e outros eram nefritogênicos. Posteriormente, divergências de padrões de pico sazonais foram verificadas, separando os isolados de *S. pyogenes* nefritogênicos e reumatogênicos. Os casos de glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica possuíam seu pico no final do verão, simultaneamente com infecções de pele, enquanto infecções reumatogênicas e de garganta, possuíam seus picos em outubro. Com isso, evidências clínicas sugerem a existência de uma subpopulação de *S. pyogenes* que estava adaptada para a colonização e para a infecção de pele, a qual possuía um painel de fatores de virulência que levaram a uma glomerulonefrite aguda posterior a esta infecção (McSHAN et al., 2008).

O choque séptico é uma síndrome iniciada por uma infecção que resulta na produção e liberação de mediadores endógenos de monócitos, macrófagos, neutrófilos e endotélio. Estes mediadores induzem a um estado de vasodilatação, depressão miocárdica, extravasamento de capilares, imunossupressão e falência de órgãos. Tanto bactérias Gram positivas quanto Gram negativas produzem características clínicas semelhantes, no entanto os produtos bacterianos que iniciam a síndrome são diferentes. Ao ser iniciada por *S. pyogenes*, essa síndrome é nomeada síndrome do choque tóxico estreptocócico, a qual se acredita seja mediada pela liberação de superantígenos, os quais estimulam a liberação de células T em excesso, bem como a produção de citocinas, resultando na síndrome do choque tóxico estreptocócico (BAXTER e MCCHESENEY, 2000).

O ressurgimento mais recente de infecções causadas por *S. pyogenes* foi a epidemia de febre escarlatina ocorrida em 2011 na cidade de Hong Kong. Esta doença esteve muito presente antes do século XX, causando frequentes epidemias ou surtos localizados, apresentando altas taxas de mortalidade. No século XIX, as epidemias ocorriam na Inglaterra e no País de Gales com regularidade a cada 5-6 anos, parecendo

estar relacionadas com anos em que a pluviosidade era baixa. Em países de clima temperado a doença é mais prevalente durante as estações do outono e inverno, sendo mais comumente vista em crianças (especialmente com idade abaixo dos 10 anos), contudo adultos também apresentam suscetibilidade a febre escarlatina. Os surtos de febre escarlatina são particularmente problemáticos em escolas com taxas de incidência acima dos 20%-30%, principalmente devido a grande proximidade entre os indivíduos suscetíveis em ambientes fechados. Os surtos escolares podem durar por semanas e na era pré-antimicrobiano persistiam até por 10 meses (WONG e YUEN, 2012).

Em uma escala global, pode-se dizer que *S. pyogenes* é uma importante causa de morbidade e mortalidade, principalmente em países menos desenvolvidos. Uma estimativa mínima de mais de 500.000 mortes por ano coloca este microrganismo entre os maiores patógenos humanos, sendo superado apenas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum* e *Streptococcus pneumoniae*. Porém provavelmente comparados a patógenos como rotavírus, *Haemophilus influenza* tipo b e o vírus da Hepatite B. *Streptococcus pyogenes* leva a uma maior morbidade a longo prazo do que estes patógenos, sendo importante salientar que sua importância global é subestimada (CARAPETIS et al., 2005)

1.4. Fatores de virulência

1.4.1. Proteína M

Para a patogênese de infecções por *Streptococcus pyogenes* a aderência e a internalização em células do hospedeiro são fatores que contribuem de maneira significativa. A proteína M, codificada pelo gene *emm*, geralmente media estas infecções e tem sido considerada alvo para tipagem de *S. pyogenes*. Além disso, a tipagem da sequência do gene *emm* vem se tornando o método padrão e mais de 150 tipos de *emm* já foram descritos (BLANDINO et al., 2011).

A proteína M é um importante fator de virulência de *S. pyogenes*, dificultando a fagocitose deste microrganismo pelo sistema imune do hospedeiro. Esta está ancorada na parede celular e estende-se para a superfície celular. A estrutura central básica desta proteína consiste em regiões conservadas, variáveis e hipervariáveis que possuem uma periodicidade de sete resíduos e a porção N-terminal (Amino-terminal) encerra-se num segmento opso gênico hipervariável. Proteínas M de estreptococos do grupo A podem ser divididas em moléculas de classe I e classe II baseado em variações na estrutura de segmentos repetidos na região conservada C-terminal. Esta proteína é multifuncional e os domínios variável e conservado apresentam importância na patogênese da doença causada por estreptococos (Fig 1.) (KITANG et. al, 2011).

Esta proteína é codificada pelo gene *emm*. Funcionalmente, na ausência de anticorpos de opsonização, a proteína M é antifagocítica, inibe a deposição de complementos, interage com um número grande de proteínas do hospedeiro, possui atividade pró-inflamatória e contribui para adesão a mucosas. O mimetismo molecular da proteína M é implicado na patogênese de doenças como glomerulonefrite pós-estreptocócica e febre reumática aguda. Anticorpos contra a proteína M conferem imunidade tipo-específica em humanos, porém existe pouca imunidade heteróloga com outros tipos de Proteína M e a atividade protetiva de opsonização dos anticorpos parece ser restrita a isolados que apresentem uma relação muito estreita ou apresentem o mesmo tipo de proteína M. A persistência dos anticorpos tipo específicos após uma infecção natural é variável; em alguns casos com o passar do tempo há uma diminuição da concentração destes e em outros casos pode ocorrer uma persistência desta concentração por até 32 anos. A tipagem da proteína M tem sido utilizada por mais de 60 anos e tem provado ser muito útil na diferenciação de isolados com certo tropismo

tecidual. Com um aumento no número de tipos de proteína M descritos, um novo sistema, baseado na análise da sequência do gene *emm*, codificador desta proteína, foi adotado. Atualmente existem mais de 150 tipos de *emm* (com 941 subtipos) e 326 sequências ainda não tipadas. Esta tipagem correlaciona-se de maneira bastante forte com o tropismo tecidual de isolados individuais de *S. pyogenes*. A presença de múltiplos tipos de proteína M e da possível imunidade protetiva restrita a um isolado, significa que re-infecções devidas a *S. pyogenes* são inevitáveis. Além disso, este tipo de imunidade também afeta diretamente o desenvolvimento de vacinas baseadas na proteína M (WONG e YUEN, 2012).

Outro método mais recente de tipagem de proteína M é chamado de padrão de tipagem *emm* e distingue arquiteturas cromossômicas (padrões A-C, D e E) baseado na presença e arranjo dos genes *emm* e *emm-like* presentes no genoma de *S. pyogenes*. O padrão *emm* também se correlaciona de maneira eficaz com o tropismo tecidual, embora muitas exceções tenham sido relatadas. Os isolados que apresentam padrões A-C estão normalmente associados com infecções de garganta, isolados com o padrão D são principalmente recuperados de lesões superficiais de pele (impetigo) enquanto que o padrão E representa um grupo “generalista” associado com ambos os sítios de isolamento. Mesmo representando uma pequena proporção de tipos *emm*, os isolados que apresentam o padrão A-C tem sido os mais estudados. Muito do conhecimento atual sobre estrutura e função da proteína M é baseado em trabalhos anteriores com a proteína M tipo 6 (M6), o qual é associada a um padrão *emm* tipo A-C. O protótipo M6 contém muitas sequências repetidas nomeadas repetições “A”, “B”, “C” e “D”. Porém muito menos é conhecido sobre a estrutura de muitas outras proteínas M, principalmente aquelas que pertencem aos padrões *emm* D e E (McMILLAN et al., 2013).

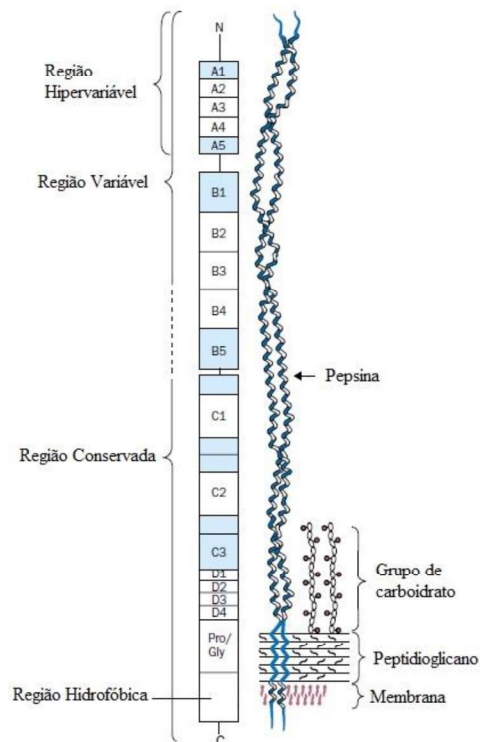


Figura 1. Estrutura da Proteína M (Adaptado de BISNO et al., 2003)

1.4.2. Superantígenos

Superantígenos (SAGs) são uma família de toxinas que são capazes de ativar uma grande quantidade de células T humanas, resultando em uma massiva produção de citocinas pró-inflamatórias. Antígenos convencionais são processados em pequenos fragmentos por células apresentadoras de antígenos antes da translocação do domínio de ligação a antígeno da molécula MHC de classe II. Em contraste, SAGs são capazes de se ligarem de maneira cruzada e não específica a moléculas de MHC classe II com o domínio N-terminal do receptor da célula T (REGLINSKI e SRISKANDAN, 2014).

A análise de treze genomas inteiros de isolados de *S. pyogenes* demonstrou que cada um contém de dois a sete genes que codificam os superantígenos e que estes genes são localizados em regiões de profagos presentes no genoma. Em contraste, genes que codificam os SAGs *speG* e *smez* em isolados de *S. pyogenes* não estão localizados nestes elementos genéticos móveis. Assim, *speG* e *smez* em *S. pyogenes* podem ter sido herdados por transferência genética horizontal (OKUMURA et al., 2012).

1.4.3. Estreptolisinas

Streptococcus pyogenes é conhecido por sua habilidade de hemolisar eritrócitos, nomeada beta hemólise. Existem duas toxinas distintas que são responsáveis por esta característica, as quais são estreptolisina S (SLS) que é sensível na presença do oxigênio e a estreptolisina sensível a oxigênio O (SLO). A SLS é citolítica somente quando associada com a superfície celular bacteriana ou na presença de certas moléculas carreadoras. O espectro citolítico da toxina é amplo e inclui eritrócitos, leucócitos, plaquetas e organelas subcelulares, porém exclui bactérias com paredes celulares intactas (MOLLOY et al., 2011).

1.4.4. DNases

Alguns fatores de virulência possuem atividade de DNase, a qual induz a produção de anticorpos anti-DNase após faringite e infecção de pele. Os mais conhecidos fatores de virulência com atividade de DNase são os três fatores mitogênicos *mf2*, *mf3* e *dnase (speF)* (HASEGAWA et al., 2002).

1.4.5. Fator de Opacidade do Soro

Esta é uma substância que é secretada por *S. pyogenes* responsável por transformar o soro que é transparente em soro turvo. Essa substância induz a opacificação do soro por ligação a lipoproteínas de alta densidade (HDLs), deslocando apolipoproteína A-I, destruindo a molécula de HDL, resultando na formação de grandes partículas de lipídios, transformando o soro em opaco. Esta é uma proteína única que exibe múltiplas funções que incluem não somente o fato de tornar o soro opaco, mas também possui a habilidade de se ligar a uma variedade de proteínas do hospedeiro como fibronectina e fibrinogênio, as quais estão envolvidas na adesão bacteriana (COURTNEY e POWNALL, 2010).

1.4.6. C5a-peptidase

A enzima protelítica C5a-peptidase uma endopeptidase encontrada na superfície de estreptococos do grupo A e também é conhecida como um fator de virulência. Esta peptidase cliva a quimiostatina derivada do complemento C5a, no sítio de ligação de neutrófilos polimorfo nucleares. Este evento impede a fagocitose, por inibir o recrutamento de células fagocíticas no local da infecção (KAGAWA et al., 2009).

1.4.7. NAD-glicohidrolase

Alguns fatores de virulência são conectados e possuem suas ações ligadas para auxiliar a bactéria na sobrevivência no hospedeiro. A SLO é também uma proteína formadora de poros que funciona como conduto para injetar a toxina NAD-glicohidrolase no interior da célula do hospedeiro. Uma vez no interior da célula do hospedeiro, esta toxina altera funções celulares e induz uma resposta citotóxica, levando a morte celular (TATSUNO et al., 2007).

1.4.8. Nuclease A e Streptodornase 1

Nuclease A é uma DNase recém descoberta em *S.pyogenes* que possui uma região estrutural conservada da proteína de parede celular e portanto, é localizado na superfície da célula. Estudos com modelos animais demonstram que essa nuclease permite a bactéria evadir do sistema imune do hospedeiro, degradando as redes formadas por neutrófilos. Sabe-se que a DNase Sda1 também possui a mesma função da nucleasse A, facilitando a bactéria a escapar das redes de neutrófilos (WALKER et al., 2007).

1.4.9. Inibidor estreptocócico do complemento (SIC)

O inibidor estreptocócico do complemento é uma proteína de superfície presente em isolados de *S. pyogenes* que possui basicamente duas funções as quais são: proteção contra o sistema imune do hospedeiro e também, em alguns casos, é responsável por iniciar uma resposta imune não específica bastante severa no hospedeiro (MA et al., 2002).

1.5. Resistência aos Antimicrobianos

Mesmo após 50 anos de uso extensivo penicilina permanece o antimicrobiano de escolha para o tratamento de infecções causadas por *S. pyogenes*. No entanto, casos de falha terapêutica com o uso de penicilina têm sido reportados mesmo em isolados de orofaringe. Como alternativa ao uso de penicilina, seja por falha terapêutica ou por alergia do paciente, o antimicrobiano eritromicina tem sido utilizado desde a década de 1950. Contudo, no final desta década já haviam casos relatados de resistência à eritromicina. Da mesma forma, resistência à tetraciclina tem sido relatada em todo o mundo desde o primeiro isolado resistente em 1954. No Brasil, dados sobre ocorrência de resistência aos antimicrobianos de *S. pyogenes* ainda são raros (DE MELO et al., 2003).

Existem dois principais mecanismos de resistência a macrolídeos descritos em estreptococos, a modificação de sítio alvo e os sistemas de efluxo de macrolídeos. O primeiro é alcançado através de uma família de enzimas (RNAr metilases) que metilam o resíduo de adenina (A2058) do domínio V da porção 23S do RNAr. Isto leva a uma mudança conformacional que reduz a ligação de macrolídeos, lincosaminas e estreptogramina B aos ribossomos, conferindo co-resistência a estes antimicrobianos (fenótipo MLS_B). Este fenótipo pode ser expresso constitutivamente (cMLS_B) ou pode ser induzível (iMLS_B). Estas metilases são codificadas pelos genes *erm*, sendo os genes *erm(B)* e *erm(A)* os mais comuns. No mecanismo de efluxo de macrolídeos, o sistema de transporte de proteínas expulsa moléculas destes antimicrobianos para fora da célula (fenótipo M). O fenótipo M é associado com a presença dos genes *mef(A)* e *msr(D)*, os quais codificam domínios para proteínas transmembrana e a bomba de ligação de ATP, respectivamente (RÚBIO-LOPEZ et al., 2012).

O perfil de resistência destes isolados de *S. pyogenes*, de maneira geral, tem sido bastante correlacionado com a região na qual estes foram encontrados, demonstrando uma determinada regionalização do perfil de resistência. Além disso, mesmo com casos de resistência através do mundo a maior preocupação com os *S. pyogenes* atualmente está relacionada aos fatores de virulência apresentados por estes microrganismos (ABBAS et al., 2012).

1.6. Referências

ABBAS, N.; ISMAIL, M.; EBEID, M. S.; Response of Different Antibiotic Resistant Group of *Streptococcus pyogenes* to Environmental Stresses. **Indian Journal Microbiology**. v.52; p. 354-359; 2012.

AMICIS, K.M.D et al.; Analysis of the coverage capacity of the StreptInCor candidate vaccine against *Streptococcus pyogenes*. **Vaccine**, 2013.

AZIZ, R.K. e KOTB, M. Rise and persistence of global M1T1 clone of *Streptococcus pyogenes*. **Emerg Infect Dis**. v.14; p.1511-1517. 2008.

BAXTER, F.; McCHESNEY, J.; Severe group A Streptococcal infection and Streptococcal Toxic Shock Syndrome. **Canadian Journal of Anesthesia**. v. 47; p. 1129–1140. 2000.

BISNO, A.L. et al. Molecular basis of group A streptococcal virulence. **Lancet Infect Dis**. v. 3; p. 191-200. 2003.

BLANDINO, G. et al. *Streptococcus pyogenes emm* types and subtypes of isolates from paediatric asymptomatic carriers and children with pharyngitis. **New Microbiologica**. V.34, pg.101-104, 2011.

CARAPETIS, J.R. et al. The global burden of group A streptococcal disease. **Lancet Infect Dis**. v.5; p.685-694. 2005.

COURTNEY, H.S. POWNALL, H.J. The structure and function of serum opacity factor: a unique streptococcal virulence determinant that targets high-density lipoproteins. **J Biomed Biotechnol**, 2010.

DE MELO, M.C.N.; FIGUEIREDO, A.M.S.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; Antimicrobial susceptibility patterns and genomic diversity in strains of *Streptococcus pyogenes* isolated in 1978–1997 in different Brazilian cities. **Journal of Medical Microbiology**. v. 52; p. 251–258. 2003.

DEVI, L.; MANSI, V.; RUP, L.; Exploring Internal Features of 16S rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus *Streptococcus*. **Annals of clinical microbiology and Antimicrobials**, v.10, n. 28, 2011.

EFSTRATIOU, A.; Group A streptococci in the 1990s. **J Antim Chem**, v. 45, topic T1, p. 3-12, 2000.

FACKLAM, R.; What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. **Clin Micr Rev**, v. 15, n. 4, p. 613-630, 2002.

GUILHERME, L.; KALIL, J.; Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease: Cellular Mechanisms Leading Autoimmune Reactivity and Disease. **Journal of Clinical Immunology**. v. 30; pg.17-23; 2010.

HASEGAWA, T. et al. Cloning and characterization of two novel DNases from *Streptococcus pyogenes*. **Arch Microbiol**, v.177, n. 6, p. 451-456; 2002.

HASEGAWA, T. et al. Detection of invasive protein profile of *Streptococcus pyogenes* M1 isolates from pharyngitis patients. **APMIS**; v. 118; p. 167–178. 2010.

HAUSE, L. L.; MCLVER, K. S.; Nucleotides Critical for the Interaction of the *Streptococcus pyogenes* Mga Virulence Regulator with Mga-Regulated Promoter Sequences. **Journal of Bacteriology**. v. 194; p. 4904–4919; 2012.

JENSEN, A.; KILIAN, M.; Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, Its Subspecies, and Its Clinical and Phylogenetic Relationship to *Streptococcus pyogenes*. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 1, p. 113–126, Nov 2011.

KAGAWA, T.F. et al. Model for Substrate Interactions in C5a Peptidase from *Streptococcus pyogenes*: A 1.9 Å Crystal Structure of the Active Form of ScpA. **Journal of Molecular Biology**. v. 386; p.754–772. 2009.

KITTANG, B. R. et al. emm Gene Diversity, Superantigen Gene Profiles and Presence of SlaA Among Clinical Isolates of Group A, C and G streptococci from Western Norway. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 30, pg. 423-433. 2011.

KRZYŚCIAK et al. The pathogenicity of the Streptococcus genus. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 32; p. 1361-1376. 2013.

LUCA-HARARI B., et al. Clinical and microbiological characteristics of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. **J Clin Microbiol.** v. 47; p. 1155–1165. 2009.

LYNSKEY, N. N. et al. New understandings in *Streptococcus pyogenes*. **Curr Opin Infect Dis.** v.24; p.196-202. 2011.

MA, X. et al. Association of the prtF1 gene (encoding fibronectin-binding protein F1) and the sic gene (encoding the streptococcal inhibitor of complement) with emm types of group A streptococci isolated from Japanese children with pharyngitis. **J Clin Microbiol.** v.40; p.3835-3837. 2002.

McMILLAN, D.J. et al. Updated model of group A *Streptococcus* M proteins based on a comprehensive worldwide study. **Clin Microbiol Infect.** v.19; p.E222-E229. 2013.

MCSHAN, W.M. et al. Genome Sequence of a Nephritogenic and Highly Transformable M49 Strain of *Streptococcus pyogenes*. **Journal of bacteriology.** v. 190; p. 7773–7785. 2008.

MOLLOY, E.M. et al. Streptolysin S-like virulence factors: the continuing saga. **Nat Rev Microbiol,** v.9, n.9, 670-681. 2011.

MONTES, M.; ARENZANA, J.M.G; Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** v. 3; p. 14-20. 2007.

OKUMURA, K. et al. Evolutionary paths of streptococcal and staphylococcal superantigens. **BMC Genomics.** v.13; p.404-420. 2012.

REGLINSKI, M.; SRISKANDAN, S.; The contribution of group A streptococcal virulence determinants to the pathogenesis of sepsis virulence. **Virulence,** v.5, n.1, p. 1-10. 2014.

RUBIO-LÓPEZ, V. et al. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994–2006). **BMC Microbiology.** v. 12: 215. 2012.

SPELLERBERG, B.; BRANDT, C.; **Manual of Clinical Microbiology.** Ed. 9th. v.1. pg. 413-414. 2007.

SPELLERBERG, B.; BRANDT, C.; **Manual of Clinical Microbiology**. Ed. 10th. v.1. pg. 331-332. 2011.

STEER, A. C. et al. Global *emm* type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. **Lancet Infect Dis**. v. 9; p. 611-616. 2009a.

STEER, A. C. et al. Group A streptococcal vaccines: facts versus fantasy. **Curr Opin Infect Dis**. v.22; p.544-552. 2009b.

TARTOF, S. Y.; *et. al.*; Factors Associated with Group A *Streptococcus emm* type diversification in a large urban setting in Brazil: a cross sectional study. **BMC Infectious Diseases**., v. 10. 2010.

TATSUNO, I. et al. Characterization of the NAD-glycohydrolase in streptococcal strains. **Microbiology** v.153; p.4253-4260. 2007.

THOMPSON, C.C. et al. Streptococcal taxonomy based on genome sequence analyses. **F1000 Research**. v.2. 2013.

WALKER, M.J. et al. DNase Sda1 provides selection pressure for a switch to invasive group A streptococcal infection. **Nat Med**. v.13; p.981-985. 2007.

WILLEMS, R.J.L. et al. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. **FEMS**. v. 35; p. 872-900. 2011.

WONG, S.S.Y. e YUEN, K.Y. *Streptococcus pyogenes* and re-emergence of scarlet fever as a public health problem. **Emerg Microbes and Infec**. v.1; e2. 2012.

JUSTIFICATIVA

Muitos estudos relatam a diversidade de doenças causadas por microrganismos da espécie *Streptococcus pyogenes*, variando de doenças mais brandas como faringites até aquelas mais severas como a síndrome do choque tóxico estreptocócico. Além disso, muitas sequelas pós-infecção estreptocócica podem ser vistas, como febre reumática, doença cardíaca reumática e glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica, as quais são consideradas em alguns países como problemas de saúde pública.

Diversos fatores de virulência têm sido descritos em *S. pyogenes*, sendo o principal a proteína M. A tipagem do gene que codifica esta proteína vem sendo utilizado como marcador epidemiológico para infecções causadas por estes microrganismos. Além disso, a busca por relações entre determinados fatores de virulência e as doenças causadas por *S. pyogenes* tem sido alvo de diversos estudos, porém em sua maioria estes não tem sido conclusivos.

No entanto, em sua maioria, os estudos relacionando fatores de virulência e *S. pyogenes* possuem um perfil regional, dificultando a realização de um panorama mundial.

Diante do exposto, fica clara a necessidade de estudos no Brasil e principalmente nas diferentes regiões brasileiras que demonstrem o perfil de virulência dos isolados de *S. pyogenes*, visto que trabalhos envolvendo estes microrganismos são extremamente raros em nosso país.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar genotipicamente a presença de fatores de virulência em isolados clínicos de *Streptococcus pyogenes* da cidade de Porto Alegre.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar fenotipicamente e genotipicamente os isolados;
- Avaliar a distribuição dos principais tipos de *emm* encontrados na região sul do Brasil;
- Realizar um comparativo dos dados encontrados para os fatores de virulência em isolados clínicos de *S. pyogenes* da cidade de Porto Alegre, com dados mundiais.

3. MANUSCRITO I

Será submetido à revista **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.**

The *emm* gene diversity among clinical isolates of Group A *Streptococcus pyogenes* (GAS) in South of Brazil.

Running title: *Streptococcus pyogenes emm* typing in South Brazil.

Gustavo Enck Sambrano; Gustavo Pelicioli Riboldi, Thiago Galvão da Silva Paim; Keli Cristine Reiter; Bruna Gerardon Batista; Pedro Alves d'Azevedo.

Corresponding author: Dr. Pedro Alves d'Azevedo. Mail Address: Laboratório de Cocos Grampositivos, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 245, Sarmiento Leite Street. Zip code: 90050-170 Porto Alegre – RS, Brazil.

Phone number: 55(51) 33038840. Fax number: 55(51) 33038810. E-mail: gustavo.sambrano@gmail.com.

Abstract

The aim of the study was to evaluate the distribution of *emm* types among 26 clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* in the South of Brazil. The complete DNA of *emm* gene was sequenced directly using primers described by CDC. Fourteen different *emm* types were detected. The most frequent *emm* type was *emm* 1 (8/26, 30.77%) followed by *emm* types 12, 27, 57, 60 e 68 (2/26 each, 7.69%). The study is preliminary, but it is important to note that the prevalence of *emm* types is different comparing with other countries. In the same way, even when compared with other Brazilian studies, the most prevalent *emm* types were not the same. No relation between the site of isolation and the *emm* type was found. This is the first study aimed on M protein determination in Southern Brazil.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*, *emm* typing, M protein.

Introduction

Streptococcus pyogenes, a Group A streptococci (GAS), is an important human pathogen that causes a wide range of infections from mild pharyngitis and skin lesions to severe invasive diseases such as necrotizing fasciitis, streptococcal toxic shock and myositis (Oliver et al. 2008).

Streptococcus pyogenes has a variety of virulence factors and many of them are not completely understood. Considered one of the most important virulence factor, the M protein is a fibrillar coiled-coil dimer that extends from the bacterial cell wall. It is a multifunctional protein that promotes host interactions, adherence to human epithelial cells and mainly helps the bacteria to escape from host immune response by inhibition of phagocytosis in absence of opsonizing antibodies (McMillan et al. 2013). The M protein structure is an homodimer built up of four repeat regions (A to D) that differ in size and amino acid sequence. The C and D repeats, extruding the cell wall, are highly conserved among GAS serotypes and are involved in binding to factor H and serum albumin. The B segment is a semi-variable region while the amino-terminal region A is highly variable and constitutes GAS serotype specificity (Oehmcke et al. 2010).

Serotyping of *S. pyogenes* based on M protein has been long used as the gold standard for the epidemiological surveillance of infections caused by this microorganism. In the recent years it has been widely replaced by an equivalent approach based on sequencing the hypervariable region of the *emm* gene encoding the M protein (Friães et al. 2012). The *emm* typing system efficiently distinguishes GAS into more than 250 *emm* types (Smeesters et al. 2010). This differentiation based on the hypervariable region of the M protein has been the focus of vaccine research. Although, this diversity of *emm* types is responsible for the developing of a unique vaccine candidate challenging (Lynskey et al. 2011). Recently, a vaccine candidate that contains the 30 M proteins most frequently found in Europe and North America (30-valent) has demonstrated promising results. It was immunogenic in rabbits and evoked bactericidal antibodies against all 30 *emm* serotypes present in the vaccine (Dale et al. 2011 and Dale et al. 2013).

Brazilian data is difficult to obtain once studies involving *S. pyogenes* are very rare. A study from São Paulo demonstrated *emm* types that were not found among the most prevalent in high-income countries (Guilherme et al. 2006).

The aim of this study was to evaluate the distribution of M protein types among isolates of *Streptococcus pyogenes* obtained from clinical specimens in the South of Brazil, and compare it with data obtained worldwide.

Material and Methods

Bacterial Isolates

Twenty six isolates collected from two hospitals in Porto Alegre, South of Brazil, were included in the study. They were selected between August 2012 and September 2013 and previously identified as GAS by the hospitals laboratories. The isolation site was also provided.

Identification of Bacterial Species

The GAS isolates were grown overnight on trypticase soy agar supplemented with 5% sheep blood for a better identification. The API 20 Strep system (bioMérieux SA, Marcy L'Etoile, France) was used as a biochemical test for identification at species level. After this biochemical test the isolates were submitted to conventional PCR for molecular identification based on 16S rRNA gene, to confirm the phenotypic results. The primers used to identify the isolates were as follows: F: GTGAGTAAC GCGTAGGTAACCTACCTCATAG; R: CCCAGGCGGAGTGCTTAATG (Lintges et al. 2007).

Conventional PCR for sequencing

All GAS colonies of an overnight growth on trypticase soy agar supplemented with 5% sheep blood were used for DNA extraction by the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). The extraction product was measured by NanoSpec (Nanometrics) to verify the amount and the quality of DNA obtained.

The PCR reaction was performed for *emm* gene, in triplicate for each isolate, using primers available at Centers for Disease Control and Prevention (www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.htm) as follows: F: TATTCGCTTAGAAAATTA; R: GCAAGTTCCTCAGCTTGTTT. Briefly, 1 µl (20-80 ng/µl) of DNA was added to 19 µl of PCR mixture containing GoTaq® Hot Start

Colorless Master Mix (Promega), 0.02 μ M of each primer (Invitrogen) and RNase free water. Amplification was performed in a LifePro Thermal Cycler (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltda) beginning with an initial denaturation step at 95°C for 5 min followed by 35 cycles of 95°C for 1 min, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min, ending with a final extension step at 72°C for 5 min. PCR products (1175 bp) were detected on a 1.5% agarose gel with ethidium bromide and compared with a molecular weight pattern.

Sequencing Reaction

PCR products were purified with Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) and they were measure to guarantee a correct DNA concentration. The amount of DNA used for this reaction ranged from 20-40ng/ μ l. The complete DNA of *emm* gene was sequenced directly in both directions and individually (Primer Forward and Primer Reverse) using primers described by CDC in a concentration of 4pmol/ μ l. The reaction final volume was 6 μ l and the quantities of DNA and primers were adjusted respecting the concentrations mentioned above.

Sequence Analysis

Three sequencing results from each isolate were analyzed using the software Geneious 6.1.6. Once the gene was sequenced individually in both directions, six sequences were obtained to form one consensus sequence. For that, each primer reverse result was transformed in a reverse complement to allow the performance of de novo assembly in order of obtaining a consensus sequence with the six results. The consensus sequence obtained was manually adjusted with chromatograms analysis. Each base pair had a phred score of at minimum 20, representing high confidence of the results. The nucleotide sequences were compared with all types and subtypes of *S. pyogenes* by using basic local sequence alignment (BLASTn, GenBank).

Results

All isolates were β -hemolytic in trypticase soy agar supplemented with 5% sheep blood after overnight growth. API 20 Strep system identified the microorganisms as *Streptococcus pyogenes*, as well as the molecular analysis by 16S rRNA gene. The conventional PCR for the *emm* showed a positive reaction for all twenty six isolates.

After sequencing each isolate, the BLASTn results were very acceptable regarding query cover (range from 91-100%), E-value (zero) and identity (range from 93-100%). Hence, it is possible to conclude that the result found was the M protein of *S. pyogenes*.

Fourteen different *emm* types were detected among the twenty six clinical isolates. The most frequent *emm* type was *emm1* 8/26 (30.77%), followed by *emm* types 12, 27, 57, 60 and 68 (2/26 each, 7.69%). Other *emm* types were found in only one isolate of the total (3.85%), namely *emm* types 8, 22, 44, 58, 59, 73, 90 and 92. Ten isolates were obtained from skin lesion, seven from blood, six from oropharynx and the last three were isolated from pleural liquid, sputum and vaginal secretion. Among the eight *emm* type 1 specifically, four were isolated from blood, and one from skin lesion, vaginal secretion, pleural liquid and sputum (Table 1).

Discussion

Streptococcus pyogenes is estimated to be responsible for over 600 million new cases of pharyngitis each year. In addition to triggering autoimmune sequelae, such as acute rheumatic fever, nasopharyngeal infection with *S. pyogenes* represents the major reservoir for invasive diseases such as necrotizing fasciitis, pneumonia and toxic shock syndrome that together cause an estimated 163,000 deaths worldwide each year (Alam et al. 2013). Numerous typing schemes have been used to characterize and measure the genetic diversity among isolates of *S. pyogenes* and one of the most used is *emm* typing, in which the hypervariable portion of the M protein encoded by the *emm* gene is sequenced (McGregor et al. 2004).

A 2009 study in Australia showed that the most common *emm* type worldwide was *emm1* representing 18.3% of 38081 isolates. Other *emm* types were also

representative like *emm12* (11.1%), *emm28* (8.5%), *emm3* and *emm4* (6.9%). Besides, this study also verified differences in *emm* type distribution by region. This distribution was organized by high-income countries, Asia, Middle East and Latin America in contrast to Africa and Pacific Region. The two most common *emm* types in Latin America were *emm1* and *emm12* (Steer et al. 2009). In our study, only *emm1* and *emm12* were predominantly found.

A European study which included eleven countries demonstrated that most frequent *emm* type was *emm1* representing 19% of 4353 isolates, followed by *emm28* (12%), *emm3* (10%), *emm89* (8%), *emm87* (6%), *emm12* and *emm4* (5% each). Even with a few changes among the countries these *emm* types were the most present in Europe and again the *emm1* was the most abundant (Luca-Harari et al. 2009). Also, in a United States of America (USA) study with 4350 isolates, the predominant *emm* type was *emm1* (22%). (O'Loughlin et al. 2007)

Some *emm* types are common among isolates of *S. pyogenes* from Europe, USA and Canada, like *emm1*, *emm12*, *emm3* and *emm28*, but when compared with isolates from South of Brazil, only the *emm1* and *emm12* are present. The *emm3* and *emm28* were not found among the most prevalent *emm* types in South of Brazil. Recently, a study from São Paulo, Brazil, demonstrated that the most predominant *emm* types of GAS isolates were *emm1*, *emm6*, *emm12*, *emm22*, *emm77* and *emm87* (Amicis et al. 2013).

The *emm1* is considered the most frequent *emm* type over the world (Oehmcke et al. 2010, Amicis et al. 2013) and the *emm12* was also found in many places as also demonstrated by our study.

It is generally accepted that certain *emm* types are preferentially associated with certain severe diseases. Along with that the *emm1* is frequently isolated from patients with necrotizing fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome (Oehmcke et al. 2010). In our study we were not able to correlate the *emm* types with diseases, but it was possible to verify that 50% of our *emm1* isolates were isolated from blood, a sterile site, demonstrating some characteristic of invasiveness of these isolates. The *emm* types *emm27*, *emm57*, *emm60* and *emm68* were not often found in other studies. Hence it is possible to demonstrate that the South region of Brazil demonstrates a particular *emm* epidemiology.

This is a preliminary study and the first aimed on *Streptococcus pyogenes* M protein determination in Southern Brazil therefore more studies need to be made using a higher number of isolates to have a better knowledge of this subject.

Aknoledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

Alam FM, Bateman C, Turner CE, Wiles S, Sriskandan S. Non-Invasive Monitoring of *Streptococcus pyogenes* Vaccine Efficacy Using Biophotonic Imaging. *PLOS ONE* 2013; 8: e82123.

Amicis KMD, Barros SF, Alencar RE, Póston E, Martins CO, Arcuri HA, Goulart C, Kalil J, Guilherme L. Analysis of the coverage capacity of the StreptInCor candidate vaccine against *Streptococcus pyogenes*. *Vaccine* 2013.

Barros SF, Alencar R, Higa F, Alcântara F, Rossi F, Muller R, Faé KC, Kalil J, Guilherme L. Identification of group A beta hemolytic *Streptococcus* strains in Brazil. *International Congress Series* 2006; 1289: 34-37.

Centers for Disease Control and Prevention. Streptococcus Laboratory. Protocol for emm typing. http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emm-type.htm (Acessado em 27 de novembro de 2011)

Dale JB, Fischetti VA, Carapetis JR, Steer AC, Sow S, Kumar R, Mayosi BM, Rubin FA, Mulholland K, Hombach JM, Schödel F, Henao-Restrep AM. Group A streptococcal vaccines: Paving a path for accelerated development. *Vaccine* 2013; 31S: B216–B222.

Dale JB, Penfound TA, Chiang EY and Walton WJ. New 30-Valent M Protein-Based Vaccine Evokes Cross-Opsonic Antibodies Against Non-Vaccine Serotypes of Group A Streptococci. *Vaccine* 2011; 29: 8175-8178.

Friães A, Pinto FR, Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J. Group A streptococci clones associated with invasive infections and pharyngitis in Portugal present differences in emm types, superantigen gene content and antimicrobial resistance. *BMC Microbiology* 2012; 12:280.

Lintges M, Arlt S, Uciechowski P, Plumakers B, Reinert RR, Al-Lahhamc A, Luticken R, Rink L. A new closed-tube multiplex real-time PCR to detect eleven superantigens of *Streptococcus pyogenes* identifies a strain without superantigen activity. *International Journal of Medical Microbiology* 2007; 297: 471-478.

Luca-Harari B, Darenberg J, Neal S, Siljander T, Strakova L, Tanna A, Creti R, Ekelund K, Koliou M, Tassios PT, Linden M, Straut M, Vuopio-Varkila J, Bouvet A, Efstratiou A, Schalén C, Henriques-Normark B. Clinical and Microbiological Characteristics of Severe *Streptococcus pyogenes* Disease in Europe. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47: 1155–65.

Lynskey NN, Lawrenson RA, Sriskandan S. New understandings in *Streptococcus pyogenes*. *Paediatric and neonatal infections* 2011; 11: 196-202.

McGregor KF, SprattBG, Kalia A, Bennett A, Bilek N, Beall B and Bessen DE. Multilocus Sequence Typing of *Streptococcus pyogenes* Representing Most Known *emm* Types and Distinctions among Subpopulation Genetic Structures. *Journal of Bacteriology* 2004; 186: 4285-4294.

McMillan Dj, Drèze PA, Vu T, Bessen DE, Guglielmini J, Steer AC, Carapetis JR, Melderer LV, Sriprakash KS, Smeesters PR. Updated model of group A *Streptococcus* M proteins based on a comprehensive worldwide study *Clinical Microbiology and Infection Dis* 2013; 19: E222-9.

O'Loughlin RE, Roberson A, Cieslak PR, Lynfield R, Gershman K, Craig A, AlbaneseBA, Farley MM, Barrett NL, Spina NL, Beall B, Harrison LH, ReingoldA, Beneden CV. The Epidemiology of Invasive Group A Streptococcal Infection and Potential Vaccine Implications: United States, 2000–2004. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 45: 853-62.

Oehmcke S, Shannon O, Mörgelin M, Herwald H. Streptococcal M proteins and their role as virulence determinants. *Clinica Chimica Acta* 2010; 411: 1172-80.

Oliver MA, Rojo JM, Córdoba SR, Alberti S. Binding of complement regulatory proteins to Group A *Streptococcus*. *Vaccine Dis* 2008; 26S: 175–8.

Smeesters PR, McMillan DJ, Sriprakash KS. The streptococcal M protein: a highly versatile molecule. *Trends in Microbiology* 2010; 18: 275-82.

Steer AC, Law I, Matatolu L, Beall BW, Carapetis JR. Global *emm* type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *The Lancet Infectious Diseases* 2009; 9: 611–16.

Table 1: Frequency of *emm* types according to clinical specimen in *S. pyogenes* isolates from the South of Brazil.

Clinical Specimen					
<i>emm</i> type	Blood	Skin lesion	Oropharynx	Others	Total
1	4	1	–	3	8 (30.77%)
12	1	–	1	–	2 (7.69%)
27	–	2	–	–	2 (7.69%)
57	–	1	1	–	2 (7.69%)
60	–	1	1	–	2 (7.69%)
68	1	1	–	–	2 (7.69%)
8	–	–	1	–	1 (3.85%)
22	–	–	1	–	1 (3.85%)
44	–	1	–	–	1 (3.85%)
58	1	–	–	–	1 (3.85%)
59	–	1	–	–	1 (3.85%)
73	–	1	–	–	1 (3.85%)
90	–	1	–	–	1 (3.85%)
92	–	–	1	–	1 (3.85%)
Total	7	10	6	3	26(100%)

3.1. Instruções para Autores - Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

All manuscripts must be submitted through the Diagnostic Microbiology and Infectious Disease online submission and review Web site (<http://ees.elsevier.com/dmid/>). Authors are requested to submit the text, tables, and artwork in electronic form (not as a PDF) to this address. In an accompanying letter, authors should state that the manuscript, or parts of it, have not been and will not be submitted elsewhere for publication. The letter should also state why the submitted work advances the field under study and why it is important for the DMID readership. In the process of submitting the article authors will be required to provide a list of five or more potential reviewers for their manuscript, with complete contact information, and who are not conflicted with the author's work.

Submission items include a cover letter (save as a separate file for upload), which lists the suggested reviewers, the manuscript (including title page, abstract, manuscript text, references, and table/figure legends), tables, and figures. Revised manuscripts should also be accompanied by a unique file (separate from the covering letter) with responses to reviewers' comments. The preferred order of files is as follows: cover letter, suggested reviewers, response to reviews (revised manuscripts only), manuscript file(s), table(s), figure(s). Files should be labeled with appropriate and descriptive file names (e.g., SmithText.doc, Fig1.eps, Tables3.doc). Upload text, tables and graphics as separate files. (You can compress multiple figure files into a Zip file and upload that in one step; the system will then unpack the files and prompt you to name each figure.) Do not import figures or tables into the text document and do not upload your text as a PDF. Complete instructions for electronic artwork submission can be found on the Author Gateway, accessible through the journal home page. Your figures will be tested by an artwork quality check tool; you will be asked to view the results before you can complete your submission. Your figures can move into review if not up to production standards, but you should be prepared to provide better quality figures should we express interest in your manuscript.

Manuscripts

Papers may be submitted that are full-length articles (including subject review articles), or short notes. Manuscripts are accepted with the understanding that they are original, unpublished work and are not being submitted elsewhere. All manuscripts are

subjected to peer review by the editors, by members of the Editorial Board, or by other qualified reviewers.

Papers must be accompanied by a letter signed by the corresponding author indicating that they have read and are familiar with the current "Instructions to Authors" (published in each issue) and will comply with the instructions and stated conditions. The letter should indicate that all of the named authors and acknowledged parties have agreed to the submitted draft of the paper or, as providers of personal communications, have consented to their inclusion, and that the content/submission is original/unpublished and has not been simultaneously submitted to another medical journal. Furthermore, previous or other publication of any or part of the content of the manuscript (including conference or congress proceedings, letters, and brief communications) must be declared on the title page. Failure to comply with the above mentioned policies may result in a 3-year suspension of publishing privileges in this journal.

Manuscripts should be submitted via the Elsevier Editorial System, in English, double-spaced, and, where appropriate, divided into Introduction; Materials and Methods, which should include sufficient technical information so that experiments can be repeated and which should give sources of unusual chemicals, reagents, equipment, or microbial strains; Results, which should describe the design of the experiments as well as the results using text, tables, or figures; and Discussion, which should provide an interpretation of the results in relation to previously published work. An abstract is required for all papers; it should be 150 words or less for full-length papers and 50 words or less for notes. Papers for the Notes category, which is intended for the presentation of brief observations (including instructive case reports), that do not warrant full-length papers, should not contain any section heading and should not exceed 1,000 words.

The first page of the manuscript should include: title, running title of not more than 45 characters and spaces, full names of all authors, address of the institution at which the work was performed, and the corresponding author's full address, telephone number, and FAX number. Any change of address by any of the authors should also be noted. Any footnotes to the text should be numbered using Arabic numerals and should be typed on the page of the manuscript on which they are referred to.

Tables

Tables should be on separate files and numbered using Arabic numerals. Each table should have a brief title with detailed information appearing as footnotes bearing superscript, lower-case letters. Vertical rules should be avoided.

References

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications should not be in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* uses the standard 'Vancouver' system with name and year in the text.

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated in wheat (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication: Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51-9.

Reference to a book: Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan, 1979.

Reference to a chapter in an edited book: Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age. New York: E-Publishing Inc.; 1994. p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (J Am Med Assoc 1997;277:927-34), see also http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html

Figures

All manuscripts must be accompanied by complete artwork. Each figure must be on a separate file. Electron micrographs should be of sufficient contrast to withstand reduction and printing at the journal page size. The cost of printing color photographs must be borne by the author. Any graphs, charts, or diagrams should be finished drawings, using type size large enough to be read easily when reduced to page size.

Open Access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

2. Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee.

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from

an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY NC SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Creative Commons Attribution (CC-BY): available only for authors funded by organizations with which we have established an agreement with. For a full list please see www.elsevier.com/fundingbodies

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses, such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. www.elsevier.com/fundingbodies

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The Open Access publication fee for this journal is \$USD 2,500, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy www.elsevier.com/openaccesspricing

Proofs and Reprints

The corresponding author will receive page proofs, which should be corrected and returned within 48 hours of receipt. Corrections are limited to printer's errors and no substantial author's changes will be made. Reprints may be ordered at the price listed on the order form accompanying the proofs.

Style and Nomenclature

Authors should use the CBE (Council of Biology Editors) Style Manual, 5th ed., as a general guide for style. The names of chemical compounds should conform with Chemical Abstracts and its indexes or The Merck Index, 11th ed. Enzymes and biochemical terms should bear the recommended, trivial name listed in the latest edition

of Enzyme Nomenclature. Whenever possible, use generic drug names. Binary names consisting of a generic name and a species name must be used for all microorganisms. Names of general and higher categories may be used alone. However, a species name must be preceded by the complete generic name the first time that it is used in the manuscript. Following this, the generic name should be abbreviated to the initial capital letter (for example, *S. aureus*), provided there can be no confusion with other genera of organisms used in the paper. The nomenclature for bacteria should follow well-established references such as *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (current edition) or the *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed., or validation lists and specific articles published in the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* since January 1, 1989. Informative web sites are available as well (<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm> and <http://www.bacterio.cict.fr>).

Nomenclature and classifications of fungi and yeasts are the responsibility of the manuscript authors as guided by published sources such as *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9th ed. (2001) and *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 4th ed. (1998).

Names used for viruses should be those listed in the International Committee on Taxonomy of Viruses publication (*Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee of Taxonomy and Viruses*, 2000). Synonyms may be used in parentheses when the name is first used in conjunction with the approved generic (or group) and family names.

Copyright

Upon acceptance of an article by the journal, the author(s) will be asked to transfer copyright of the article to the publisher. This transfer will insure the widest possible dissemination of information under the US copyright law. Unless this agreement is executed, the journal will not publish the manuscript.

4. MANUSCRITO II

Será submetido à revista *Medical Microbiology and Immunology*

Screening for detection of virulence factors in *Streptococcus pyogenes* in clinical isolates, in Porto Alegre, Brazil.

Gustavo Enck Sambrano; Gustavo Pelicioli Riboldi, Thiago Galvão da Silva Paim; Keli Cristine Reiter; Bruna Gerardon Batista; Pedro Alves d'Azevedo.

Corresponding author: Dr. Pedro Alves d'Azevedo. Mail Address: Laboratório de Cocos Grampositivos, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 245, Sarmiento Leite Street. Zip code: 90050-170 Porto Alegre – RS, Brazil.

Phone number: 55(51) 33038840. Fax number: 55(51) 33038810. E-mail: gustavo.sambrano@gmail.com.

Abstract

Objective: To identify the presence of 32 genes encoding virulence factors of clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* from Porto Alegre, RS, Brazil. **Methods:** Twenty nine isolates of *S. pyogenes* were evaluated by Real-time PCR. **Results:** Prevalence of superantigens genes was as follows: *speA* alleles 1, 2 and 3 (41.38%), *speA* allele 5 (51.72%), *speG* (96.55%), *speL* (89.66%), *smeZ* and *speJ* (79.31%), *speM* (72.41%), *speI* (68.97%), *speH* (55.17%), *speC* (37.93%), *ssa* (31.03%) and *speK* (27.59%). The operon *sagABCDEFGHI* was present by gene *sagA*, *sagB*, *sagG* in 79.31%, *sagI* in 75.86%, *sagD* in 72.41%, *sagF* in 68.97%, *sagC* and *sagE* in 58.62% and *sagH* in 37.93%. Three mitogenic factors were evaluated and were present in 89.66% (*mf2*), 72.41% (*mf3*) and 62.07% (*dnaseB*) of all twenty nine isolates. The two serum opacity factors analyzed were *sofC* and *sofN* (62.07% and 44.83%, respectively). The *sdal* and *nga* genes were found in 89.66% and the *sic* gene was found in 79.31%. Finally, three genes were present in all isolates *slo*, *scpa* and *spna*.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*, virulence factors, Real-time PCR.

Introduction

Streptococcus pyogenes (*S. pyogenes*), a Group A streptococci (GAS) representative, is one of the most virulent species of the genus and is involved exclusively in human infections. It produces a high number of exotoxins, superantigens (SAGs) and cell wall-associated proteins, resulting diverse clinical manifestations ranging from classical pyogenic infections to toxic-shock syndrome and post-infections immune mediated sequelae [1].

Studies involving Group A *S. pyogenes* have been seen since the last century, although with the advances in techniques of molecular biology deeper and intensively research are being conducted devoted to evaluate the virulence factors of these microorganisms [2]. Many virulence factors contribute to the pathogenesis of *S. pyogenes* diseases each one with a specific function and with a determined degree of importance [3].

One of the most well studied classes of virulence factors in *S. pyogenes* is the superantigens (SAGs). These are toxins capable of activating a large set of human T cells, resulting in a massive production of proinflammatory cytokines. The SAGs are capable of performing non-specifically cross linking to MHC class II molecules with the variable N-terminal domain of the T-cell receptor (TCR) β chain (denoted the V β region), without prior processing [4].

Streptococcus pyogenes is also known by its ability to haemolyse red blood cells (β -haemolysis). There are two distinct toxins that are responsible for this characteristic; streptolysin S (SLS) and the unrelated large cholesterol-dependent, oxygen-sensitive streptolysin O (SLO). SLS is cytolytic only when associated with the bacterial cell surface or in the presence of certain carrier molecules. The cytolytic spectrum of the toxin is broad and includes erythrocytes, leukocytes, platelets and subcellular organelles, but excludes bacteria with intact cell walls [5].

The other streptolysin, SLO is a member of an expansive family of highly conserved pore-forming cytolysins. Known as the cholesterol-dependent cytolysins (CDCs) (formerly called the thiol-activated cytolysins), members share 40%–70% homology and are secreted from the bacterium as water-soluble monomers that bind cholesterol in the target cell membrane [6].

Some virulence factors have DNase activity which *in vivo* induces the production of anti-DNase antibody after either pharyngeal or skin infection. The most

known DNases involved in virulence of *S. pyogenes* are the three mitogenic factors *mf2*, *mf3* and *dnase* (*SpeF*) [7].

The *S. pyogenes* produces a substance that causes the serum to become cloudy and is named Serum Opacity Factor (SOF). This substance induces opacification of serum by binding to high-density lipoproteins (HDLs), displacing apolipoprotein A-I (apo A-I) and disrupting the structure of HDL resulting in the formation of large, lipid particles that cause serum to become opaque. It is a unique protein exhibiting multiple functions including not only its ability to opacify serum but also an ability to bind to a variety of host proteins such as fibronectin, fibrinogen, and fibulin-1 which are involved in bacterial adhesion [8]. The C5a peptidase is a proteolytic enzyme (endopeptidase) found on the surface of Group A streptococci and is also known as a virulence factor. The peptidase cleaves the complement-derived chemotaxin C5a at its PMN-binding site. This event then inhibits the recruitment of phagocytic cells to the site of infection [9].

Some virulence factors are connected and have their action linked to help the bacteria to survive into the hosts. Group A Streptococcus encode a pore-forming protein Streptolysin O (SLO) that functions as a conduit to inject the toxin SPN (*S. pyogenes* β -NAD⁺ glycohydrolase) into the host cell. Once inside the host cell, SPN alters cellular functions and induces a cytotoxic response that ultimately causes cell death [10]. One of the most highly upregulated genes upon the regulatory “control of virulence” system (*covS*) mutation and initiation of invasive MIT1 GAS infection is *sic*, encoding the streptococcal inhibitor of complement. SIC is a secreted 31-kDa protein first discovered because of its location in the Mga virulence regulon. [13]

Some virulence factors have DNase activity which in vivo induces the production of anti-DNase antibody after either pharyngeal or skin infection. The most known DNases involved in virulence of *S. pyogenes* are the three mitogenic factors *mf2*, *mf3* and *dnase* (*SpeF*). [7] *S. pyogenes* nuclease A (*SpnA*) is novel DNase recently discovered in GAS. In contrast to other GAS DNases, *SpnA* possesses a cell wall-anchor motif and is therefore located on the cell surface. A GAS *spnA*-knockout mutant was shown to be less virulent in blood bactericidal assays and in a mouse infection model suggesting *SpnA* enables bacteria to evade the host immune response by degrading the DNA backbone of NETs [11]. The innate immune response plays a crucial role in satisfactory host resolution of bacterial infection. In response to chemotactic signals, neutrophils are early responding cells that migrate in large numbers to sites of infection. The discovery of secreted neutrophil extracellular traps (NETs)

composed of DNA and histones opened a novel dimension in the understanding of the microbial killing capacity of these specialized leukocytes. To help bacteria to resist to these NETs a DNase named Sda1 is necessary to be present [12].

Over this virulence factors panel and with the need to know more about the *S. pyogenes* virulence in South of Brazil, the aim of this study was to identify the presence of 32 virulence genes in clinical specimens of *S. pyogenes*, obtained from patients of Porto Alegre, Brazil.

Material and Methods

Bacterial Isolates

Twenty nine isolates collected from two hospitals in South of Brazil were included in the study. They were selected between August 2012 and September 2013 and previously identified as Group A streptococci (GAS) by the hospital laboratories. The site of isolation was also provided.

Bacterial identification

The isolates previously identified as GAS were grown overnight on trypticase soy agar supplemented with 5% sheep blood for a species identification. The API 20 Strep (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) system was used as a biochemical test for identification at species level. Then the isolates were submitted to conventional PCR for molecular identification based on 16S RNAr gene of *Streptococcus pyogenes* to confirm the phenotypic results [15].

DNA extraction

All colonies of a 24h growth on trypticase soy agar supplemented with 5% sheep blood were used to a DNA extraction by the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) as described by the manufacturers and the product was quantified in the NanoSpec (Nanometrics).

Real-time PCR standardization

To obtain a better efficiency of the Real-time PCR reaction, a DNA standard curve was performed using five different DNA concentrations (100ng, 50ng, 20ng, 10ng and 5ng) and a curve of primer concentration.

Real-time PCR

Twelve superantigens (*speC*, *speG*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speH*, *speI*, *speM*, *SMEZ*, *SSA*, *speAI-4* and *speAI-3,5*), nine-gene sag operon *sagABCDEFGHI*, three mitogenic factors (*dnase*, *mf2* and *mf3*), two serum opacity factors (*sofC* and *sofN*), one streptolysin O (*slo*), one C5a-peptidase (*scpa*), one NAD-glycohydrolase (*nga*), one nuclease A (*spna*), one DNase (*sdal*) and the streptococcal inhibitor of the complement (*sic*) were the virulence genes included in the study (Table 1).

The RT-PCR was performed using master mix containing reaction buffer 10x, MgCl₂, dNTPs, recombinant *Taq* DNA Polymerase, SYBR Green as a loading dye and Rox as a reference dye. To this mixture was added primer concentration previously checked for the best PCR efficiency result, 0.15mM of each dNTP, 10ng of DNA as a template and RNase free water to complete the final volume of 20µl. The reaction steps were with an initial denaturation step at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles (30 s at 94°C, 90 s at 57°C, 90 s at 72°C) with a final extension step (10 min at 72°C), and the platform used was the ABI7500 (Applied Biosystems). All reactions were performed in duplicate and a positive and a negative control for each primer were also run.

However, as no ATCC strain of *S. pyogenes* is known to present all the genes analyzed in this study, the positive controls considered for these experiments were clinical isolates that contained the determined gene. To confirm that every positive reaction used as a positive control was submitted to sequencing reaction followed by a comparison with a public data bank (GenBank). As a negative control, a strain of *S. agalactiae* ATCC® 13813™ was used.

Analysis of Real-time PCR results

Each RT-PCR was obtained in duplicate and to consider the presence of the gene in the isolate, both results had to present a positive amplification with a determined melting curve temperature. A positive amplification was considered when the melting temperature of each isolate reaction for a specific primer did not differ more than one Celsius degree from that found in the positive control. Besides, an analysis of the quantification plot was also made to ensure that the melting peak was a true amplification.

Results

A total of twenty nine isolates were evaluated for the presence and absence of thirty two virulence factors genes of *S. pyogenes*. The most virulent *S. pyogenes* strain, in number of genes, showed 29/32 (90.6%), followed by a strain with 28/32 (87.5%), two with 27/32 (84.37%) and three with 26/32 (81.25%). Among the less virulent, also in gene numbers, three isolates presented 18/32 (56.25%) and one presented 17/32 (53.13%).

Some of the virulence factors were organized into groups according to their activity when the gene is expressed. The superantigens (SAGs) group had 12 genes verified: two *speA* (*speA1-3,5* and *speA1-4*) whose prevalence of alleles 1, 2 and 3 was 41.38%, allele 5 was 51.72% and allele 4 was absent; *speG* (96.55%), *speL* (89.66%), *smeZ* and *speJ* (79.31%), *speM* (72.41%), *speI* (68.97%), *speH* (55.17%), *speC* (37.93%), *ssa* (31.03%) and *speK* (27.59%) (Fig. 1). The other group was the nine-gene *sag* operon (*sagABCDEFGHI*). The most frequent genes were *sagA*, *sagB* and *sagG* (79.31%), followed by *sagI* (75.86%), *sagD* (72.41%), *sagF* (68.97%), *sagC* and *sagE* (58.62%) and the less frequent *sagH* (37.93%) (Fig 2.). Among the three mitogenic factors studied, the most frequent was *mf2* (89.66%), followed by *mf3* (72.41%) and *dnaseB* (*SpeF*) (62.07%). The prevalence of the two serum opacity factors was: *sofC* (62.07%) and *sofN* (44.83%).

The last six virulence factors analyzed could not be grouped, then they were presented individually. Three of them were found in all isolates: streptolysin O (*slo*), a C5a-peptidase (*scpa*) and a nuclease A (*spna*). The Dnase (*sdaI*) and the NAD-

glycohydrolase (*nga*) were present in 89.66% the streptococcal inhibitor of the complement (*sic*) was present in 79.31% (Fig. 3).

Discussion

The isolates analyzed in this study presented a high number of virulence factors, with the less virulent strains showing 17/32 genes and the most virulent strain with 29/32. Although it is known that the severity of infections caused by *S. pyogenes* depends on multiple bacterial and host factors, the pathogenic properties of these microorganisms are also linked to the production of virulence factors. There are some particularities among the virulence factors that make them not equally distributed among the strains of *S. pyogenes*. The fact that some virulence factors are chromosomally encoded while other are related to the presence of mobile genetic elements affects this distribution and this gives characteristics to each strain of *S. pyogenes* [14].

The relation of isolation site and number of virulence factors is not frequently reported in literature; the majority of studies presents type of infection (e.g. pharyngitis, necrotizing fasciitis, STSS) but does not inform the isolation site. In this study, the type of infection could not be accessed, so comparisons with other studies became difficult.

Analyzing the overall panel of superantigens, is evident that this Southern Brazilian isolates had a different pattern of virulence factors. The greatest difference is regarding genes *speL* (89.66%), *speM* (72.41%), *speI* (68.97%) and the *speH* (55.17%). The presence of these genes in other studies reaches a maximum of 40% (*speH*) and analyzing particular cases of *speL/M* and *speI* this percentage does not cross 25%. The last three genes *speJ*, *ssa* and *speK* had very distinct frequencies, in some studies they were similar to our findings while in other they were different [15,18].

Dnase B, also known as *SpeF* or mitogenic factor (MF), is a chromosomally encoded streptococcal toxin with apparently similar mitogenic properties to superantigens though quite distinct structure [19]. The presence of this gene was not related in other studies and in this particularly study it was found in 62.07%. Otherwise, the last two mitogenic factors *mf2* and *mf3* which were found in 89.66% and 72.41%, respectively, in this study, showed different results when compared to the literature. Hasegawa et al. demonstrated the presence of these two genes among clinical isolates with *mf2* present in only 20% of the isolates and *mf3* present in 97.14% [7].

The streptococcal serum opacity factor (SOF) is a large extracellular and surface-bound protein of GAS which is capable of binding fibronectin. In our study the two domains (*sofN* and *sofC*) were evaluated and the most frequent gene between the two domains was *sofC*. No studies verified the presence of these two genes in clinical isolates, but a plausible reason for the *sofC* gene had higher frequency is that the C-terminus region is more conserved than N-terminus which facilitates the amplification based only in one pair of primers [20].

Among the thirty two virulence factor genes evaluated in this study, three of them were present in all 29 isolates; *slo*, *scpa* and *spna*. Respectively they represent a streptolysin O, a cell-surface-associated protease and a nuclease A. The data are in accordance with our findings [21-23]. No studies about the frequency of *sdal* in clinical isolates of *S. pyogenes* were found, although the presence of this gene in our study demonstrates a high prevalence (89.66%) among the isolates in South of Brazil.

Considering the overall analysis realized in this study is important to note that in South of Brazil the isolates of *S. pyogenes* have a high number of virulence factors, once the less virulent organism had 17/32 genes related to these characteristics. Also, the methodology used confers a high confidence for the results. Finally, in order to have a better understanding over the epidemiology of these microorganisms, further studies in this region must be realized with a higher number of isolates.

Aknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES:PDEE Institucional - #23038007207201144) of Brazil..

References

- 1 Wong, S.S. (2012) *Streptococcus pyogenes* and re-emergence of scarlet fever as a public health problem. *Emerging Microbes and Infections*, 1-10
- 2 Bisno, A.L. et al. (2003) Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis* 3 (4), 191-200
- 3 Yang, P. et al. (2013) Characteristics of group A *Streptococcus* strains circulating during scarlet fever epidemic, Beijing, China, 2011. *Emerg Infect Dis* 19 (6), 909-915
- 4 Reglinski, M. (2014) The contribution of group A streptococcal virulence determinants to the pathogenesis of sepsis *virulence* 5 (1), 1-10
- 5 Molloy, E.M. et al. (2011) Streptolysin S-like virulence factors: the continuing *sagA*. *Nat Rev Microbiol* 9 (9), 670-681
- 6 Madden, J.C. et al. (2001) Cytolysin-mediated translocation (CMT): a functional equivalent of type III secretion in gram-positive bacteria. *Cell* 104 (1), 143-152
- 7 Hasegawa, T. et al. (2002) Cloning and characterization of two novel DNases from *Streptococcus pyogenes*. *Arch Microbiol* 177 (6), 451-456
- 8 Courtney, H.S. and Pownall, H.J. (2010) The structure and function of serum opacity factor: a unique streptococcal virulence determinant that targets high-density lipoproteins. *J Biomed Biotechnol* 2010, 956071
- 9 Cunningham, M.W. (2000) Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *CLINICALMICROBIOLOGY REVIEWS* 13 470–511
- 10 Smith, C.L. et al. (2011) Structural basis of *Streptococcus pyogenes* immunity to its NAD⁺ glycohydrolase toxin. *Structure* 19 (2), 192-202
- 11 Chang, A. et al. (2011) Functional analysis of *Streptococcus pyogenes* nuclease A (SpnA), a novel group A streptococcal virulence factor. *Mol Microbiol* 79 (6), 1629-1642
- 12 Buchanan, J.T. et al. (2006) DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16 (4), 396-400
- 13 Pence, M.A. et al. (2010) Streptococcal inhibitor of complement promotes innate immune resistance phenotypes of invasive M1T1 group A *Streptococcus*. *J Innate Immun* 2 (6), 587-595

- 14 Borek, A.L. et al. (2012) Detection of *Streptococcus pyogenes* virulence factors by multiplex PCR. *Virulence* 3 (6), 529-533
- 15 Lintges, M. et al. (2010) Superantigen genes are more important than the emm type for the invasiveness of group A *Streptococcus* infection. *J Infect Dis* 202 (1), 20-28
- 16 Proft, T. et al. (2003) Two novel superantigens found in both group A and group C *Streptococcus*. *Infect Immun* 71 (3), 1361-1369
- 17 Lintges, M. et al. (2007) A new closed-tube multiplex real-time PCR to detect eleven superantigens of *Streptococcus pyogenes* identifies a strain without superantigen activity. *Int J Med Microbiol* 297 (6), 471-478
- 18 Meisal, R. et al. (2010) *Streptococcus pyogenes* isolates causing severe infections in Norway in 2006 to 2007: emm types, multilocus sequence types, and superantigen profiles. *J Clin Microbiol* 48 (3), 842-851
- 19 Sriskandan, S. et al. (2000) Mitogenic factor (MF) is the major DNase of serotype M89 *Streptococcus pyogenes*. *Microbiology* 146 (Pt 11), 2785-2792
- 20 Gillen, C.M. et al. (2002) Immunological response mounted by Aboriginal Australians living in the Northern Territory of Australia against *Streptococcus pyogenes* serum opacity factor. *Microbiology* 148 (Pt 1), 169-178
- 21 Jing, H.B. et al. (2006) Epidemiological analysis of group A streptococci recovered from patients in China. *J Med Microbiol* 55 (Pt 8), 1101-1107
- 22 Sagar, V. et al. (2012) Variability in the distribution of genes encoding virulence factors and putative extracellular proteins of *Streptococcus pyogenes* in India, a region with high streptococcal disease burden, and implication for development of a regional multisubunit vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 19 (11), 1818-1825
- 23 Hasegawa, T. et al. (2010) Characterization of a virulence-associated and cell-wall-located DNase of *Streptococcus pyogenes*. *Microbiology* 156 (Pt 1), 184-190

Fig.1. Frequency of Superantigens among the twenty nine isolates of *S. pyogenes*.

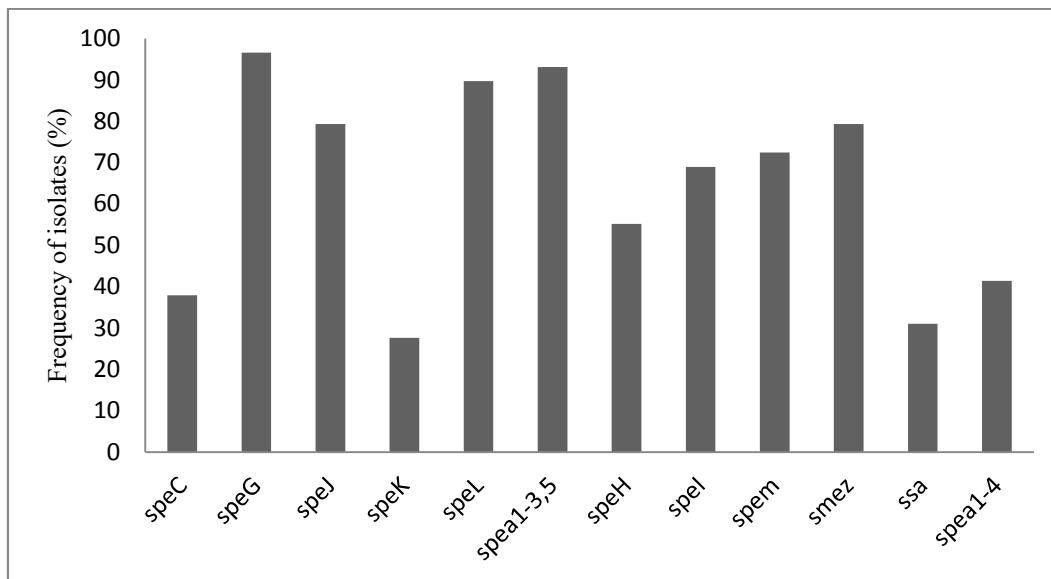


Fig. 2. Frequency of genes of the operon *SagABCDEFGHI* among the twenty nine isolates of *S. pyogenes*.

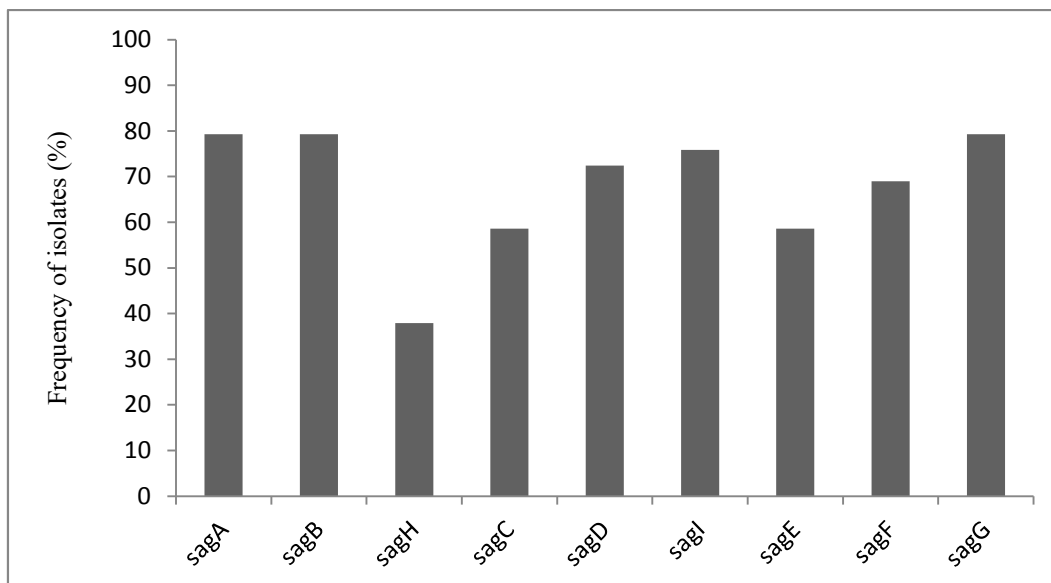
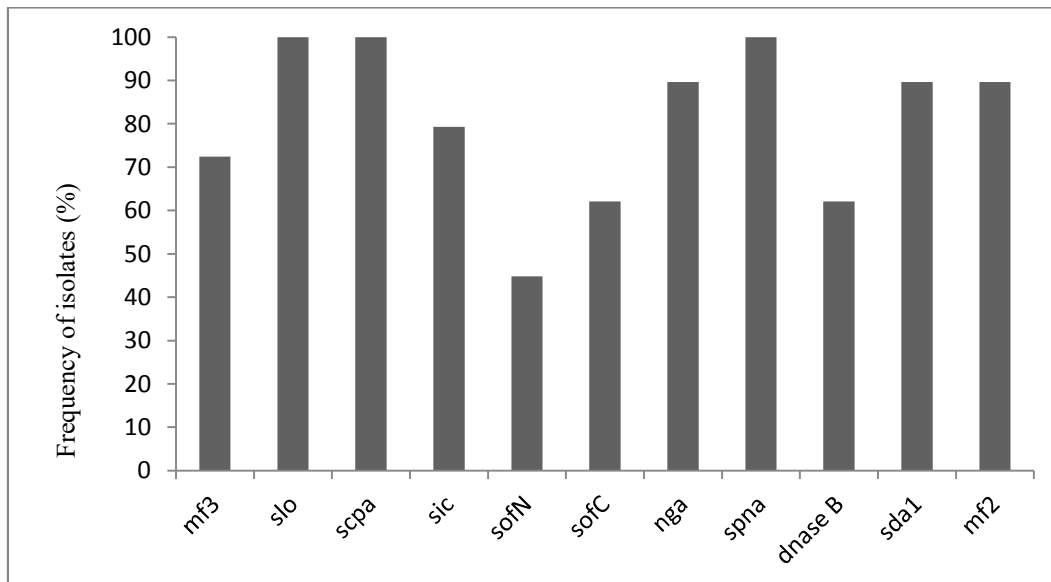


Fig. 3. Frequency of virulence factors genes among the twenty nine isolates of *S. pyogenes*.



4.1. Instruções para Autores - Medical Microbiology and Immunology

Medical Microbiology and Immunology publishes articles on all aspects of the interrelationship between infectious agents and their hosts.

The journal publishes Original Investigations, Reviews, Rapid Communications, and Editorials.

Material submitted to MMI must be arranged as follows (except for Editorials):

-Abstract

-Keywords

-Introduction

-Materials and Methods

-Results

-Discussion

-Acknowledgement(s)

-References

-Figure legends

-Tables

• Contributions that are part of a Special Issue must include the following footnote on the title page:

"This article is published as part of the Special Issue on [title of the Special Issue]"

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for

both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.

Genus and species names should be in italics.

The common names of animals should not be capitalized.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].

2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

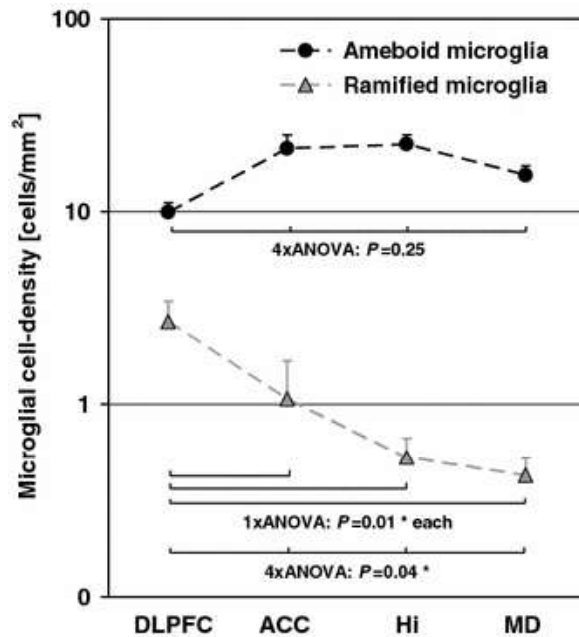
Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

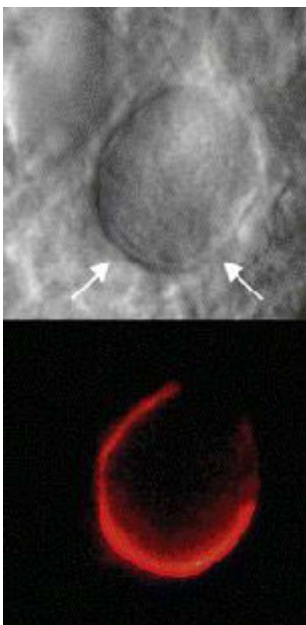
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

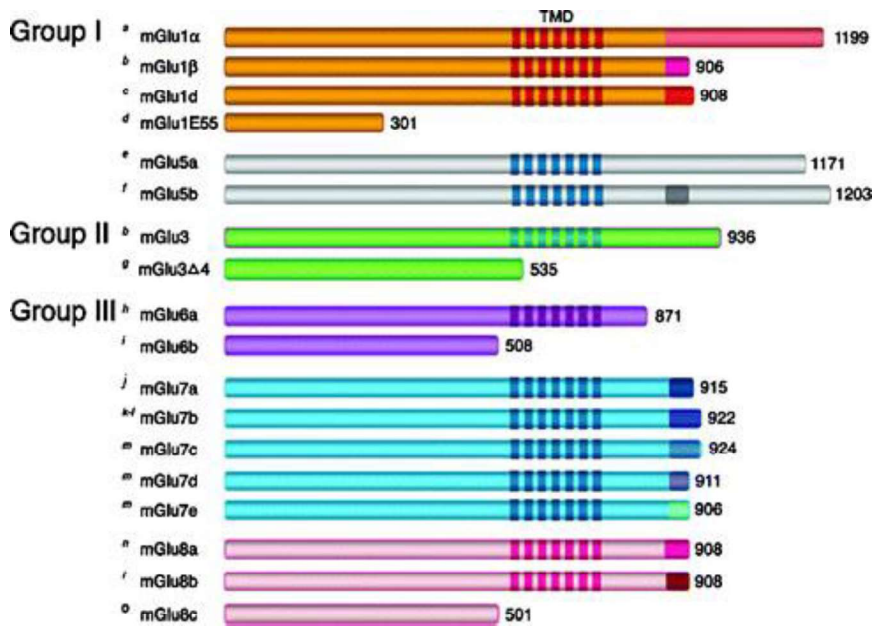


Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



5. CONCLUSÕES

- Os isolados foram todos identificados fenotipicamente e genotipicamente como *Streptococcus pyogenes*.

- O sequenciamento do gene *emm* que codifica a região hipervariável da proteína M de *S. pyogenes*, demonstrou um perfil singular da região Sul do Brasil. O sorotipo mais prevalente encontrado neste estudo *emm1* foi também aquele mais encontrado em todo o mundo. Além disso, o sorotipo *emm12*, encontrado entre os mais prevalentes neste estudo também foi encontrado em outros estudos dentre os mais prevalentes. No entanto, os outros sorotipos que estiveram entre os mais prevalentes neste estudo, não estiveram presentes entre os mais frequentes, nem mesmo em estudos brasileiros.

- O perfil dos fatores de virulência presentes nos isolados de *S. pyogenes* da região Sul do Brasil demonstrou também, assim como no perfil de tipagem do gene *emm*, que estes isolados apresentam diferenças quando comparados com isolados de outros países.

ANEXOS:**ANEXO I - Parecer Consubstanciado CEP - UFCSPA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinantes de Resistência e Virulência em Isolados Clínicos de Streptococcus pyogenes da cidade de Porto Alegre

Pesquisador: Gustavo Enck Sambrano

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 06659112.6.0000.5335

Instituição Proponente: IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 332.219

Data da Relatoria: 11/07/2013

Apresentação do Projeto:

Adequado

Objetivo da Pesquisa:

Adequado

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequado

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerando que a pesquisa já está em desenvolvimento e foi submetida ao CEP/UFCSPA na parte final da coleta de dados dos isolados bacterianos, recomenda-se a Leitura da CARTA Nº 0212/CONEP/CNS de outubro de 2010 e da

RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012 por parte dos pesquisadores envolvidos para adequação de encaminhamento em projetos futuros

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado

Recomendações:

Segere-se ao pesquisador a leitura da

RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012.

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro:

UF: RS

Telefone: (513)303-8804

Município: PORTO ALEGRE

CEP: 90.050-170

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 332.219

II.8 - instituição proponente de pesquisa - organização, pública ou privada, legitimamente constituída e habilitada, à qual o pesquisador responsável está vinculado;

II.9 - instituição coparticipante de pesquisa - organização, pública ou privada, legitimamente constituída e habilitada, na qual alguma das fases ou etapas da pesquisa se desenvolve;

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Para encaminhamentos futuros o pesquisador responsável deverá encaminhar o projeto de pesquisa primeiro para instituição na qual tem vínculo.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o Parecer do relator.

PORTO ALEGRE, 12 de Julho de 2013

Assinador por:
José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

ANEXO II – Parecer Consubstanciado CEP - ISCMPA

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinantes de Resistência e Virulência em Isolados Clínicos de Streptococcus pyogenes da cidade de Porto Alegre

Pesquisador: Gustavo Enck Sambrano

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 06659112.6.0000.5335

Instituição Proponente: IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 127.325

Data da Relatoria: 08/10/2012

Apresentação do Projeto:

Streptococcus pyogenes, frequentemente referido como Streptococcus grupo A (GAS), é uma significativa causa de morbidade humana em todo o mundo e é associado a uma variedade de doenças que podem apresentar-se com diferentes graus de severidades, desde mais brandas até mais severas. Para a patogênese de infecções por Streptococcus pyogenes a aderência e a internalização em células do hospedeiro são fatores que contribuem de maneira significativa. A proteína M, codificada pelo gene emm, geralmente media estas infecções e tem sido considerada alvo para tipagem de S. pyogenes. Além disso, a tipagem da sequência do gene emm vem se tornando o método padrão e mais de 150 tipos de emm já foram descritos. Além desta proteína outros fatores são associados à virulência destes microrganismos, como as toxinas eritrogênicas estreptocócicas A, B e C (SPE A, SPE B E SPE C), também conhecidas como exotoxinas pirogênicas estreptocócicas. Muitos estudos relatam a diversidade de doenças causadas por microrganismos da espécie Streptococcus pyogenes. Além disso, é notório o aumento de isolados resistentes aos antimicrobianos utilizados atualmente na clínica, revelando uma necessidade do conhecimento do perfil de suscetibilidade destes isolados clínicos para que se possa obter maior êxito no tratamento. É importante também notar que muitos estudos buscam desenvolver uma vacina contra o microrganismo em questão e para tanto, é necessário se conhecer os fatores de virulência mais importantes e prevalentes desta espécie para que se possa alcançar a efetividade desejada.

Endereço: R. Profº Annes Dias,285 Hosp.Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: 5132-1485 **Fax:** 5132-1485 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Objetivo da Pesquisa:

Determinar o perfil de suscetibilidade de isolados clínicos de *Streptococcus pyogenes* da cidade de Porto Alegre, bem como realizar o sequenciamento do gene emm, para caracterização da proteína de superfície M destes microrganismos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os únicos riscos deste estudo são inerentes ao manuseio dos isolados, portanto todos os pesquisadores atentarão para as principais regras de biossegurança.

Com este projeto, poder-se-á ter um panorama do perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos, o que será de extrema valia para a prática clínica.

Além disso, o conhecimento dos principais subtipos de proteína M também é muito importante, pois as vainas que estão sendo desenvolvidas baseiam-se neste tipo de proteína.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de Pesquisa atende as normas da regulamentação do CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos documentos estão adequados.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de Pesquisa atende as normas da regulamentação do CNS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Após reavaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

Endereço: R. Profº Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: 5132-1485 Fax: 5132-1485 E-mail: cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



2 - Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

PORTO ALEGRE, 22 de Outubro de 2012

Assinador por:
Claudio Teloken
(Coordenador)

ANEXO III - Resumos Publicados em Congressos Internacionais

ECCMID – Berlin, Alemanha. 2013

P1564**Abstract (poster session)****Evaluation of the accuracy of phenotypic methods in the detection of heteroresistant vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA)**

A.C.O. Silveira, G.E. Sambrano, T.G.S. Paim, C.M.M. Cordova, J. Caierão, P.A. d'Azevedo* (Porto Alegre, Blumenau, BR)

Objectives: To evaluate the sensitivity and specificity of three methods used for the phenotypic detection hVISA (Etest glycopeptide resistant detection (GRD), Etest macromethod and agar screening in Brain Heart Infusion (BHI) with 4 µg/mL of vancomycin and 16 g /L pancreatic digest of casein) when compared to the reference method, population analysis profile-area under the curve (PAP-AUC). Methods: A total of 102 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from hospitals in the state of Santa Catarina, Brazil, with vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) between 0.5 and 2 µg/mL. The Etest GRD was done according to the manufacturer's instructions using the double-sided predefined gradient of vancomycin and teicoplanin. A 0.5 McFarland suspension was prepared and swabbed onto Mueller Hinton agar with 5% sheep blood. The test isolate was considered positive for hVISA if, after 48 hours, the Etest GRD strip result was $\geq 8\mu\text{g/ml}$ for either vancomycin or teicoplanin. Etest macromethod was performed using 2.0 McFarland inoculum on BHI agar plates, using vancomycin Etest strips. Heteroresistant was defined as MICs for vancomycin of $\geq 8\mu\text{g/mL}$. Four 10 uL droplets from 0.5 McFarland suspension were dropped by a pipette onto the BHI with casein and 4 µg/mL vancomycin agar screening plates. An isolate was considered hVISA if at least one droplet had two or more colonies. PAP-AUC was performed as described by Wootton et al. HVISA phenotype were confirmed to if the AUC of the test isolate divided by the corresponding strain, MU3, was ≥ 0.9 . Results: Of the 102 MRSA tested, 14 (13.7%) had positive results for at least one as hVISA detection tests. The methodology of the Etest GRD had a sensitivity of 56% and specificity of 99%. As for the Etest macromethod sensitivity was 67% with a specificity of 92%. The screening with BHI agar with casein and 4 µg/mL of vancomycin showed a sensitivity of 88% and specificity of 92%. PAP-AUC isolated

confirmed 9 (8.8%) as hVISA, with ratios of 0.93 to 1.17. Conclusion: The methods used routinely to detect vancomycin resistance vary in sensitivity and specificity, and may fail to detect hVISA. The combination of the three methods may be the best alternative, since the ones with vancomycin MIC < 4 µg/mL, may have hetero-resistance and, in these cases, the correct characterization of hVISA may impact directly in the therapeutic success.

P1907

Abstract (poster session)

Screening for detection of virulence factors in *Streptococcus pyogenes* in clinical isolates in Porto Alegre, Brazil.

G. Enck Sambrano, G. Pelicioli Riboldi, C. Armídio Gomes Dias, P. Alves d'Azevedo* (Porto Alegre, BR)

Objectives: To identify the presence of 33 genes of virulence factors related to *Streptococcus pyogenes* in isolates from different clinical specimens, obtained from patients of Porto Alegre, Brazil. Methods: The emm gene was evaluated by PCR, while the presence of other 32 genes were studied by Real-Time PCR (qPCR), with specific primers and SYBR green as loading dye. A total of 11 isolates were evaluated in this study. Results: The analysis of emm gene revealed band patterns presenting different sizes, showing that a variety of this protein may be present. Seven Streptolysin S (sagH, sagC, sagD, sagI, sagE, sagF, sagG) genes, three superantigens (speG, spea1-3,5, smeZ), one Streptolysin O (slo), one C5a-peptidase (scpa), one serum opacity factor (sofC), one NAD-glycohydrolase (nga), one nuclease A (spna) and one Dnase B (sda1) were present in 100% of isolates. The super antigens speC, speL and speH had a frequency of 90.9%. The sagA, sagB (involved in streptolysin S formation) and the serum opacity factor sofN were present in 81.82% of the strains. Others six super antigens were evaluated and had the following frequencies: speJ (72.73%), spea-1-4 and spem (63.64%), speL (36.36%), speK (27.27%) and ssa (0.0%). Three mitogenic factors were analysed and presented a frequency of mf3 (36.36%), mf2 (90.91%) and dnase (0.0%). The streptococcal inhibitor of complement gene was also evaluated and presented a frequency of (90.91%). (Table 1) The number of virulence factors in each isolate was also evaluated with a mean of 26.18 +- 3.49 (SD). Conclusions: All isolates presented a high number of genes of virulence factors. The strains isolated from skin lesions presented 28, 29 and 30 genes of virulence while the strains isolated from throat secretions presented 25 and 26 of these genes. The absence of some genes like sic, sofN, mf3, spea1-4, speH and speK was the main difference among the most virulent and less virulent microorganisms. However both virulent and less virulent isolates presented all the Streptolysin S genes. Only two genes were not present in the isolates: ssa and dnase. The first is one of the pyrogenic exotoxins that may be implicated in streptococcal toxic

shock syndrome, while the second an extracellular streptococcal virulence factor. This work is part of a higher project focused on the characterization of Group A Streptococcus isolates involved in clinically relevant infections in Brazil, supported by FAPERGS/CAPES.

ANEXO IV - Resumo Publicado em Congresso Nacional

27^o Congresso Brasileiro de Microbiologia – Natal, RN. 2013.

The *emm* gene diversity among clinical isolates of Group A streptococci in South Brazil.

Sambrano G, Soares, R.O., Riboldi G, Paim TGS, d'Azevedo PA,

Background: Group A streptococci (GAS) produce a variety of proteins, including the antiphagocytic M protein, encoded by the *emm* gene. M proteins are streptococcal surface proteins that probably represent one of the best-known virulence determinants of this pathogen. M proteins are cell-surface attached proteins that are composed of two polypeptide chains that form an alpha-helical coiled-coil configuration. They have an LPXTG motif at their carboxy terminal part which is a sorting signal required for correct anchoring of the protein into the cell wall. Electron microscopic analysis revealed that the proteins are arranged in a hair-like structure on the bacterial surface. Each chain of the M protein homodimer is built up of 4 repeat regions (A to D) that differ in size and amino acid sequence. The amino-terminal region (A repeat region) is highly variable and constitutes the serotype specificity of GAS. The *emm* typing is considered a major tool in surveys aimed on GAS epidemiological data achievement.

Objectives: To identify the different M protein types of GAS using *emm* gene sequence analysis, and to acquire epidemiological data related to the *S. pyogenes* strains involved in clinical outcomes.

Methods: Eight clinical GAS isolated from blood, oropharynx, skin lesion and abscess from a hospital in South Brazil were evaluated. All isolates were identified by biochemical tests and by the Real-Time PCR reaction of 16S rRNA gene. The complete DNA of *emm* gene was sequenced directly in both directions using primers described by CDC. Alignments of all sequences were obtained using the ClustalW2 software program. The nucleotide sequences were compared with all types and subtypes of *S. pyogenes* using BLASTN (GenBank).

Conclusions: In the present study, five different *emm* types were detected among the eight clinical isolates. Two isolates presented the same type and subtype (19.1) and two isolates had the same type (*emm* 12) but showed different subtypes (*emm* 12 and *emm* 12.17). There was no relationship between *emm* type and the site of collection. The most common sites of collection were blood (3 isolates) and oropharynx (3 isolates). The other two isolates were collected from skin lesion and abscess. This is the first study aimed on GAS M protein determination in Southern Brazil.

ANEXO V - Participação em Trabalhos Publicados

1. REITER, K. C.; VILLA, B. ; SAMBRANO, G. E. ; PAIM, T. G. S. ; OLIVEIRA, C. F.; DAZEVEDO, P. A. . Rifampicin fails to eradicate mature biofilm formed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso)**, v. x, p. xx-xx, 2012.
Citações:1
2. REITER, K. C. ; VILLA, B. ; SAMBRANO, G. E. ; PAIM, T. G. S.; OLIVEIRA, C. F.; DAZEVEDO, P. A. . Enhancement of anti-staphylococcal activities of six antimicrobials against sasG negative methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: an in vitro biofilm model. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. x, p. xx-xx, 2012.