

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

**Gustavo Enck Sambrano**

**Avaliação do perfil genético e de resistência  
de isolados clínicos de *Streptococcus  
pyogenes* de pacientes da cidade de Porto  
Alegre.**

**UFCSPA**  
Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

**Porto Alegre**

**2018**

**Gustavo Enck Sambrano**

**Avaliação do perfil genético e de resistência  
de isolados clínicos de *Streptococcus  
pyogenes* de pacientes da cidade de Porto  
Alegre.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves d' Azevedo

**Porto Alegre**

**2018**

#### Catlogação na Publicação

Sambrano, Gustavo Enck

Avaliação do perfil genético e de resistência de isolados clínicos de *Streptococcus pyogenes* de pacientes da cidade de Porto Alegre / Gustavo Enck Sambrano. -- 2018.

77 f. : 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2018.

Orientador(a): Pedro Alves d'Azevedo.

1. *Streptococcus pyogenes*. I. Título.

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

## Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Resumo</b> .....                                    | <b>4</b>  |
| <b>2. Abstract</b> .....                                  | <b>5</b>  |
| <b>3. Revisão da Literatura</b> .....                     | <b>6</b>  |
| 3.1. <i>O Gênero Streptococcus</i> .....                  | 6         |
| <b>3.2. Streptococcus pyogenes</b> .....                  | <b>9</b>  |
| 3.3 <i>Infeções causadas por S. pyogenes</i> .....        | 13        |
| 3.4. <i>Fatores de Virulência</i> .....                   | 16        |
| 3.4.1. Proteína M .....                                   | 16        |
| 3.4.2. Superantígenos.....                                | 18        |
| 3.4.3. Estreptolisinas.....                               | 19        |
| 3.4.4. DNases.....  | 19        |
| 3.4.5. Fator de opacidade do soro .....                   | 19        |
| 3.4.6. C5a-peptidase .....                                | 20        |
| 3.4.7. NAD-glicohidrolase.....                            | 20        |
| 3.4.8. Nuclease A e Streptodornase 1 .....                | 20        |
| 3.4.9. Inibidor estreptocócico do complemento (SIC) ..... | 20        |
| 3.4.10. Cápsula de ácido hialurônico .....                | 21        |
| <b>3.5. Resistência aos antimicrobianos</b> .....         | <b>21</b> |
| <b>3.5 Perfil Genômico de S. pyogenes</b> .....           | <b>23</b> |
| <b>4. Referências</b> .....                               | <b>25</b> |
| <b>5. Objetivos</b> .....                                 | <b>30</b> |
| 5.1. <i>Objetivo Geral</i> .....                          | 30        |
| 5.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....                   | 30        |
| <b>6. Manuscrito I</b> .....                              | <b>31</b> |
| <b>7. Manuscrito II</b> .....                             | <b>50</b> |
| <b>8. Conclusões</b> .....                                | <b>72</b> |
| <b>9. Anexos</b> .....                                    | <b>75</b> |

## 1. Resumo

**Introdução:** *Streptococcus pyogenes*, frequentemente referido como *Streptococcus* grupo A (GAS), é associado a uma variedade de manifestações clínicas. Microrganismos desta espécie são bastante conhecidos por sua virulência. No âmbito de resistência antimicrobiana, os isolados de *Streptococcus pyogenes* são bastante conhecidos por apresentarem uma alta sensibilidade aos antimicrobianos utilizados na prática clínica, embora se tenha relatos de resistência. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de genético e de resistência aos antimicrobianos de isolados clínicos de *Streptococcus pyogenes*.

**Metodologia:** Para a análise do perfil de susceptibilidade 76 isolados de três diferentes hospitais foram coletados e o teste de disco difusão foi realizado para os seguintes antimicrobianos, penicilina, eritromicina, clindamicina e tetraciclina. Destes, 25 isolados foram selecionados para os posteriores testes, sequenciamento do gene *emm* e análise da presença ou ausência de 24 fatores de virulência. Dos 51 restantes, 4 foram selecionados de acordo com o sítio de isolamento para realização da técnica de sequenciamento do genoma completo e análises subsequentes. **Resultados:** Todos os isolados foram suscetíveis à penicilina, porém resistência aos outros antimicrobianos foram encontradas e definidas como as seguintes: tetraciclina 32,89%, eritromicina 18,42% e clindamicina 5,26%. Procedendo-se a análise do perfil genético dos 25 isolados, o sequenciamento da proteína M, revelou que o tipo mais prevalente foi o M1. A verificação dos genes de virulência demonstrou que os genes *speG*, *slo*, *C5a-peptidase* e *spna* estiveram presentes em todos os 25 isolados. Todos os isolados apresentaram genes cromossômicos bem como genes carregados por profagos. Os 4 genomas sequenciados apresentaram diferenças pontuais (Proteína M, ST, genes de resistência e regiões de profagos). Contudo, a análise do pangenoma revelou que 75% dos genes foram compartilhados por esses 4 isolados. **Conclusões:** O perfil de resistência dos isolados demonstrou que alternativas à penicilina estão apresentando taxas de resistência, em certas regiões, altas. A análise do perfil molecular revelou isolados com algumas diferenças pontuais, mas que no âmbito geral possuem genomas muito conservados e similares, todos com potencial de causar doenças invasivas, independente do sítio de isolamento ou tipo de proteína M.

## 2. Abstract

**Background:** *Streptococcus pyogenes*, usually referred to as Group A *Streptococcus* (GAS) are responsible for a variety of clinical manifestations. This species is well known by its virulence potential due to an extensive range of virulence factors present in their genomes. Regarding to antimicrobial susceptibility, these microorganisms are frequently susceptible to penicillin but some resistance rates were reported for its alternatives such as macrolides. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the susceptibility and genetic profile of *Streptococcus pyogenes* clinical isolates. **Methods:** A total of 76 clinical isolates of *S. pyogenes* were collected from 3 different hospitals. The disk diffusion test was done for the following antimicrobial agents: penicillin, erythromycin, clindamycin and tetracycline. Out of the 76, twenty five were randomly chosen for further investigations such as, *emm* typing and screening for presence of 24 virulence factors. From the 51 left, 4 were chosen for whole genome sequencing (WGS). **Results:** All isolates were susceptible to penicillin, however resistance was found to the other antimicrobial agents. Tetracycline, erythromycin and clindamycin resistance rates were as follows: 38.89%, 18.42% and 5.26%. The 25 isolates analysis revealed that M1 was the most frequent among all. The virulence screening demonstrated that four genes were present in all isolates, *speG*, *slo*, *C5a-peptidase* and *spna*. Also, in all isolates there were chromosomally encoded and phage encoded genes. The WGS analysis revealed that even with differences (M protein, ST type, resistance genes and prophage regions) the overall genomes are similar. The pangenome analysis showed that 75% of the genes are shared among the 4 clinical isolates and that variability is present on the phage encoded regions. **Conclusion:** Although penicillin remains with rare non-susceptibility rates, the antimicrobial agents used as alternative show some resistance, which may be important to consider for the treatment options. The genomic analysis revealed isolates with some differences but that in an entire genome analysis demonstrated a very conserved genome.

### 3. Revisão da Literatura

#### 3.1. 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% CO<sub>2</sub> 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 lático. 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).

### **3.2. *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 pirrolidonil 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 epítomos 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 epítomos 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).

### 3.3 Infecções causadas por *S. 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. *S. 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).

### **3.4. Fatores de Virulência**

#### **3.4.1. 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 opogênico 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).

### 3.4.2. Superantígenos

Superantígenos (SAGs) são uma família de toxinas que são capazes de ativar uma grande quantidade 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 localizadas nestes elementos genéticos móveis. Assim, *speG* e *smez* em *S. pyogenes* podem ter sido herdados por transferência genética horizontal (OKUMURA et al., 2012).

### 3.4.3. Estreptolisinas

*S. 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) e a estreptolisina sensível a oxigênio O (SLO). 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).

### 3.4.4. 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).

### 3.4.5. 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).

#### **3.4.6. C5a-peptidase**

Esta é uma enzima protelítica (endopeptidase) encontrada na superfície de estreptococos do grupo A e também é conhecida como um fator de virulência. Esta peptidase cliva a quimiotaxina 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).

#### **3.4.7. NAD-glicohidrolase**

Alguns fatores de virulência são conectados e possuem suas ações ligadas para auxiliar a bactéria na sobrevivência no hospedeiro. SLO é também uma proteína formadora de poros que funciona como conduíte 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).

#### **3.4.8. Nuclease A e Streptodornase 1**

Nuclease A é uma DNase recém descoberta em *S.pyogenes* que possui um “motif” estrutural de 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 netrófilos (WALKER et al., 2007).

#### **3.4.9. 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).

#### **3.4.10. Cápsula de ácido hialurônico**

É uma molécula de superfície celular expressa por *Streptococcus pyogenes* que possui uma alta massa molecular e consiste de um polímero que alterna ácido glicurônico e resíduos de  $\beta - 1,3$  ligantes de N-acetilglicosamina. Esta cápsula é essencialmente idêntica à molécula de ácido hialurônico expressa abundantemente na superfície celular de células de mamíferos. O mimetismo molecular com as estruturas do hospedeiro permite que microrganismos da espécie *Streptococcus pyogenes* não sejam detectados pelo sistema imune do hospedeiro, tornando a cápsula um fraco fator imunogênico (Cole et al., 2012).

Este fator de virulência é classificado como uma adesina envolvida na colonização inicial em baixas temperaturas típicas das superfícies das mucosas da garganta e da pele, mas que também tem por função a evasão ao sistema imune do hospedeiro. A atividade da cápsula de *S pyogenes* promove a colonização e a iniciação de um novo ciclo de infecção. O operon capsular é composto pelos genes *has A*, *has B* e *has C*, que codificam a sintetase do ácido hialurônico, a UDP-glicose dehidrogenase e a UDP-glicose pirofosforilase, respectivamente. O último gene do operon da cápsula, o gene *has C*, não é necessário para a produção desta molécula devido a existência de um outro gene de UDP-glicose pirofosforilase presente no genoma destes microrganismos. A transcrição do operon da cápsula é controlada por um promotor localizado upstream, o qual é regulado pelo sistema CovRS (Kang et al., 2012).

### **3.5. Resistência aos antimicrobianos**

Mesmo após 50 anos de uso extensivo penicilina permanece o antimicrobiano de escolha pra 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<sub>B</sub>). Este fenótipo pode ser expresso constitutivamente (cMLS<sub>B</sub>) ou pode ser induzível (iMLS<sub>B</sub>). 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).

### 3.5 Perfil Genômico de *S. pyogenes*

Desde a realização do sequenciamento do primeiro genoma completo de *S. pyogenes* publicado por Ferreti e colaboradores em 2001, muitos outros genomas tem sido depositados no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Com isso, o aumento nas informações sobre estes microrganismos tem sido exponencialmente depositadas. O genoma da espécie *S. pyogenes* é único, circular com um tamanho de aproximadamente 1,8 – 1,9Mb. Em média o conteúdo GC é de 38-39%, o que é considerado baixo em relação a outros gram positivos (Amada et al., 2015).

A análise de 23 genomas completos de *S. pyogenes* demonstrou a presença de 1343 genes pertencentes ao genoma core, dos quais, em média 393 destes estavam relacionados a virulência, variando de acordo com o banco de dados utilizado. Além disso, estes microrganismos apresentam vias metabólicas completas como as seguintes: glicolítica, síntese de ácidos graxos, transporte e síntese de nucleotídeos e metabolismo e transporte de carboidratos. No entanto, a ausência de uma via completa do ciclo do ácido carboxílico e do sistema de transporte de elétrons é consistente com o metabolismo homo fermentativo e com o ambiente anaeróbio facultativo que esta espécie está adaptada (Maruyama et al., 2016).

O processo de transferência horizontal gênica é comum entre estes microrganismos e é responsável por proporcionar plasticidade e variabilidade genética. Aproximadamente, 90% do conteúdo genômico de *S. pyogenes* é compartilhado entre os diferentes sorotipos. Genes carregados por fagos também são considerados importantes para a patogênese e para o potencial invasivo desta espécie (Ibrahim et al., 2016a).

Na maioria dos casos os profagos encontrados nesses genomas carregam genes de virulência e acabam por ser transferidos de um isolado para outro. A importância de profagos neste quesito é tamanha que há uma divisão didática na qual os genes de virulência são classificados como carregados por profagos e não carregados por profagos. Dentre os carregados por estes elementos há ainda a classificação entre superantígenos e não superantígenos. Com

isso, é natural que se considere importante para a patogênese de GAS a polilisogenia. Uma importante consequência para isolados de *S. pyogenes* é proposta. A polilisogenia promove variação temporal ou geográfica nestes micro-organismos, impactando diretamente na frequência e severidade das infecções, pois aumenta as taxas de colonização e favorece a adaptação bacteriana (Banks et al., 2002).

Em um recente estudo, no qual foram utilizados dois representantes de GAS, sendo um invasivo e um altamente nefritogênico, foram verificados genes essenciais presentes no core genoma destes dois isolados. Embora sejam ambos recuperados de doenças, em sua maioria os genes essenciais envolvem funções celulares básicas como replicação de DNA, transcrição, proteínas ribossomais, metabolismo central do carbono, biossíntese do peptideoglicano e síntese de ácidos graxos. No entanto, nenhum gene de virulência foi encontrado como essencial, demonstrando a dificuldade de se estabelecer um padrão relacionado aos diferentes tipos de *S. pyogenes* (Le Breton et al., 2015).

Atualmente, a maioria dos estudos envolvendo sequenciamento de genoma completo acaba por utilizar cepas bem descritas com características bem definidas e partir destas buscar relações. Muitas vezes as relações acabam por ser inconclusivas, uma vez que não necessariamente a busca por padrões não necessariamente retorna algo esperado (Fiebig et al., 2015).

#### 4. 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.
- AMADA BSH, AWABATA SK, AKAGAWA IN. Review Molecular and genomic characterization of pathogenic traits of group A *Streptococcus pyogenes* 2015;91:539–59.
- 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.
- BANKS DJ, BERES SB, MUSSER JM. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. *Trends Microbiol* 2002. doi:10.1016/S0966-842X(02)02461-7.
- 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.

FIEBIG A, LOOF TG, BABBAR A, ITZEK A, KOEHORST JJ, SCHAAP PJ, et al. Comparative Genomics of *Streptococcus pyogenes* M1 isolates differing in virulence and propensity to cause systemic infection in mice. *Int J Med Microbiol* 2015;305:532–43.

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.

IBRAHIM J, EISEN JA, JOSPIN G, COIL DA, KHAZEN G, TOKAJIAN S. Genome Analysis of *Streptococcus pyogenes* Associated with Pharyngitis and Skin Infections. *PLoS One* 2016;11. doi:10.1371/journal.pone.0168177.

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 patogenicity of the *Streptococcus* genus. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 32; p. 1361-1376. 2013.

LE BRETON Y, BELEW AT, VALDES KM, ISLAM E, CURRY P, TETTELIN H, et al. Essential Genes in the Core Genome of the Human Pathogen *Streptococcus pyogenes*. *Sci Rep* 2015;5. doi:10.1038/srep09838.

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.

MARUYAMA F, WATANABE T, NAKAGAWA I. *Streptococcus pyogenes* Genomics. *Streptococcus pyogenes Basic Biol. to Clin. Manifestations*, 2016, p. 1–80.

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. 9<sup>th</sup>. v.1. pg. 413-414. 2007.
- SPELLERBERG, B.; BRANDT, C.; **Manual of Clinical Microbiology**. Ed. 10<sup>th</sup>. v.1. pg. 331-332. 2011.
- STEER, A. C. et al. Global *emm* type distribution of group A streptococci: sistematic 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.

## **5. Objetivos**

### **5.1. Objetivo Geral**

Determinar o perfil genético e o perfil de resistência aos antimicrobianos de isolados clínicos de *Streptococcus pyogenes* de pacientes da cidade de Porto Alegre.

### **5.2. Objetivos Específicos**

- Identificar fenotipicamente e genotipicamente os isolados;
- Avaliar a distribuição dos principais tipos de *emm*;
- Analisar a frequência de 24 fatores de virulência;
- Analisar o perfil de genoma completo dos isolados.

## 6. Manuscrito I

Será submetido à revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

**Antimicrobial susceptibility pattern, *emm* type distribution and virulence factors profile of clinical *Streptococcus pyogenes* isolates.**

Gustavo Enck Sambrano, Thiago Galvão da Silva Paim, Neidimar Cezar Corrêa Tolfo, Renata Oliveira Soares, Adriana Medianeira Rossato, Pedro Alves d' Azevedo.

Corresponding author: Gustavo Enck Sambrano. 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.

**Antimicrobial susceptibility pattern, *emm* type distribution and virulence factors profile of clinical *Streptococcus pyogenes* isolates.**

**Authors:** Gustavo Enck Sambrano, Neidimar Cezar Corrêa Tolfo, Thiago Galvão da Silva Paim, Renata de Oliveira Soares, Adriana Medianeira Rossato, Pedro Alves d’Azevedo.

**Corresponding author:** Gustavo Enck Sambrano; Mail Address: Laboratório de Cocos Gram-positivos, 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. E-mail: [gustavo.sambrano@gmail.com](mailto:gustavo.sambrano@gmail.com).

## Abstract

**BACKGROUND:** *Streptococcus pyogenes*, a Group A streptococci (GAS), is an important human pathogen that causes a wide range of infections.

**OBJECTIVES:** to conduct a complete analysis of the resistance and genetic profile of *S. pyogenes* clinical isolates.

**METHODS:** A total of 76 clinical isolates of *S. pyogenes* were included in the study. However, 25 were randomly selected to the *emm* typing and virulence factors Real-time PCR. Antimicrobial susceptibility test was performed accordingly CLSI recommendations for the following antimicrobial agents: penicillin, erythromycin, clindamycin and tetracycline. *emm* typing was done accordingly to CDC protocols. The real time PCR was performed in order to verify the presence or absence of 24 virulence factors genes.

**FINDINGS:** All microorganisms were susceptible to penicillin, and the resistance rates to tetracycline, erythromycin and clindamycin were as follows: 32.89%, 18.42% and 5.26%. Fourteen different *emm* types were detected, being *emm1* (8/26, 30.77%) the most prevalent. Among the virulence factors the most prevalent were SpeG, SLO, C5a-peptidase and SPNA present in 100% of isolates. Phage encoded virulence genes were also found among the strains such as, MF-2, SpeJ and SpeL.

**MAIN CONCLUSIONS:** GAS remains susceptible to penicillin, however resistance to the treatment alternatives can be seen. The *emm* typing, presents M1 as the most frequent among the isolates. The virulence factors analysis demonstrated that chromosomally and phage encoded genes were found, which confers a potential for high virulence microorganisms.

**Keywords:** *Streptococcus pyogenes*, *emm* typing, virulence factors, resistance profile.

## 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). Moreover, this microorganism presents a variety of virulence factors, many of them 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 specially helps bacteria to escape from host immune response by inhibition of phagocytosis in absence of opsonizing antibodies (McMillan et al., 2013).

Serotyping based on M protein has been long used as the gold standard for the epidemiological surveillance of *S. pyogenes* infections. 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).

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 (Bisno et al., 2003). Many virulence factors contribute to the pathogenesis of *S. pyogenes* diseases each one with a specific function and with a determined degree of importance (Yang et al., 2013).

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 (Reglinski and Sriskandan, 2014).

*Streptococcus pyogenes* is also known by its ability to haemolyse red blood cells ( $\beta$ -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). 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*) (Molloy et al., 2011).

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 (Cunningham, 2000).

Treatment of GAS infections is based on beta-lactams because the low rates of non-susceptibility to Penicilin G; erythromycin and clindamycin are usually the options in allergic patients. However, *S. pyogenes* resistance to these antimicrobial agents has been described worldwide (Arêas et al., 2014).

Over the exposure, the aim of this study was to conduct a complete analysis of the resistance and genetic profile of *S. pyogenes* clinical isolates from Porto Alegre Brazil.

## **Material and Methods**

### **Bacterial isolates and species identification**

Seventy six *Streptococcus pyogenes* clinical isolates collected from hospitals in the city of Porto Alegre, South Brazil, were included in the study. Species identification was confirmed by the API 20 Strep system (bioMérieux SA, Marcy L'Etoile, France). In addition, isolates were submitted to conventional PCR of 16S rRNA gene to affirm the phenotypic

results (Lintges et al., 2007). From these 76 isolates, twenty-five were randomly selected for *emm* typing and virulence factors presence/absence analysis.

### **Antimicrobial susceptibility *in vitro* test**

Qualitative antimicrobial susceptibility was investigated on all 76 clinical specimens by the disk diffusion method, as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). The antimicrobial disks used were penicillin (10IU), tetracycline (30µg), clindamycin (2µg) and erythromycin (15µg).

### **DNA extraction**

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

### **PCR reaction for *emm* gene**

The conventional PCR reaction was performed in triplicate for each isolate, using the primers *F*: TATTCGCTTAGAAAATTAA and *R*: GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT, available at [www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.htm) (Centers for Disease Control and Prevention; CDC).

### **Real-time PCR**

Twelve superantigens (*speA1-3,5*, *speA1-4*, *speC*, *speG*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speH*, *speI*, *speM*, *smeZ* and *ssa*), three mitogenic factors (*dnase*, *mf2* and *mf3*), the two portions of serum opacity factors (*sofC* and *sofN*), one streptolysin O (*slo*), one C5a-peptidase (*scpa*), one NAD-glycohydrolase (*nga*), one nuclease A (*spna*), one DNase (*sda1*) and the streptococcal inhibitor of the complement (*sic*) were the virulence genes included in the study (Table 1).

The RT-PCR was performed using a SYBR Green Master Mix. In order to obtain a better reaction efficiency 0.15mM of each dNTP was added to the mix. 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<sup>0</sup>C, 90 s at 72<sup>0</sup>C) with a final extension step (10 min at 72<sup>0</sup>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 used.

However, as no ATCC strain of *S. pyogenes* is known to harbor all genes analysed in this study, the positive controls considered for these experiments were clinical strains that contained the determined gene. To confirm that every reaction used as a positive control was indeed the sequence desired we sequenced the entire fragment and compared it with a public data bank (GenBank). As a negative control, a strain of *S. agalactiae* ATCC® 13813™ was used.

### **Sequencing of *emm* hypervariable region**

PCR products were purified with Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) and were measured to guarantee the correct DNA concentration. The amount of DNA used for this reaction ranged from 20-40 ng/μl. The complete *emm* gene DNA was sequenced in triplicates in both directions (forward and reverse) using primers described by CDC Strep Lab in a concentration of 4 pmol (<https://www.cdc.gov/streplab/protocol-emm-type.html>).

### ***emm* Sequencing Analysis**

Three sequencing results from each isolate were analysed using the software Geneious 9.1.8. The consensus sequence obtained was manually adjusted to ensure a minimum phred score of 20 for each base. The nucleotide sequences were then submitted to comparison with the CDC *emm* database in order to obtain the correct *emm* type for each isolate (<https://www2a.cdc.gov/ncidod/biotech/strepblast.asp>).

### **Analysis of Real-time PCR results**

Each RT-PCR was done in duplicate and a positive amplification had both reactions with similar melting curves compared to it is respectively positive control ( $T_m \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

Besides, an analysis of the quantification plot was also made to ensure that the melting peak represented a true amplification.

## Results

All isolates were  $\beta$ -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 *in vitro* susceptibility test demonstrated that all GAS isolates were susceptible to penicillin while resistance was found to clindamycin, erythromycin and tetracycline (Table 2.). Resistance to tetracycline was the highest among all three antimicrobial agents, with 25/76 representing 32.89% of the strains. In addition, 32/76 (42.10%) isolates were susceptible and 19/76 (25%) had an intermediate profile. Erythromycin had the second high resistance rate with 14/76 (18.42%) of the isolates, followed by clindamycin with only 4/76 which accounts for 5.26% of the isolates resistant to this antimicrobial agent.

Susceptibility to clindamycin was seen in 63/76 (82.9%) isolates and 9/76 (11.84) presented an intermediate profile. Erythromycin susceptibility was found in 56/76 (73.69%) of the strains and an intermediate resistance was present in 6/76 (7.89%) of the isolates.

The conventional PCR for the *emm* gene showed a positive reaction for all 25 isolates. BLASTn results were acceptable regarding query cover (range from 91-100%), E-value (zero) and identity (range from 93-100%).

Fourteen different *emm* types were detected among the 25 clinical isolates. The most frequent was *emm1* 7/26 (28%), followed by *emm12*, *emm27*, *emm57*, *emm60* and *emm68* 2/25 each, (8%). Other *emm* types were found in only 1/25 (4%) strains, namely *emm8*, *emm22*, *emm44*, *emm58*, *emm59*, *emm73*, *emm90* and *emm92*. Ten isolates were obtained from skin lesion, seven from blood, six from oropharynx and the last two were isolated from pleural fluid and sputum (Table 3).

Regarding the 23 virulence factors verified for its presence or absence among the isolates involved in this study, twelve belong to the superantigens class and were distributed as follows: *speA1-3* (40%), *speA-5* (52%), *speC* (44%), *speJ* (76%), *speK* (24%), *speL* (88%), *speH* (56%), *speI* (64%), *speM* (68%), *smeZ* (80%) and *ssa* (28%). The only SAg present in all clinical specimens was *speG* and the only absent in all was the *speA4* allele (Fig1). Among the non-SAGs virulence genes three mitogenic factors were verified and the most frequent was *mf2* (92%), followed by *mf3* (68%) and *dnaseB* (*SpeF*) (56%). The prevalence of the two-serum opacity factor portions were: *sofC* (68%) and *sofN* (48%). The last six virulence factors analysed could not be grouped and are presented individually. Three of them were found in all isolates: streptolysin O (*slo*), C5a-peptidase (*scpa*) and a nuclease A (*spna*). The Dnase (*sda1*) was present in 88% of the isolates and the NAD-glycohydrolase (*nga*) in 96%, the streptococcal inhibitor of the complement (*sic*) was present in 80% (Fig. 2).

The superantigens were similarly distributed among the *emm* types and the sites of infection not allowing any correlation to be found, regarding this matter (Table 4).

## 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 (Osowicki et al., 2018).

Antimicrobial resistance is an important topic for many bacterial pathogens. Although non-complicated infections caused by GAS are usually resolved with penicillin antibiotic, which the non-susceptibility rates are still very low, invasive infections are the major causes of concern among clinicians (Delpech et al., 2017).

The tetracycline resistance rate found here was lower than that observed in a study conducted in Brasilia less than a decade ago, in which the authors reported 61% of resistance (Smeesters et al., 2010). Instead, it was higher than a recent data from Rio de Janeiro (RJ), where the tetracycline rate was 18.7%, while we found 32.89% of the isolates to be resistant to this antimicrobial agent. The same happened to erythromycin rates. However, the difference was smaller, 18.42% in our study and 14.3% in the one from RJ (Arêas et al., 2014).

Gherardi et. al demonstrated resistance rates for tetracycline and clindamycin of 50% and 52.3% respectively in a study conducted in Italy (Gherardi et al., 2015). These findings might suggest that, although penicillin resistance rates are very rare, the microorganism is developing resistance to its alternatives, which could become a problem any time.

Numerous typing schemes have been used to characterise 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 *emm* gene encoding M protein is sequenced (McGregor et al., 2004).

A 2009 study in Australia showed that the most common *emm* type worldwide was M1, representing 18.3% of 38,081 isolates. Others 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, organised 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), being only *emm1* predominantly found in our study.

An European study which included 11 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 variations among

the countries, these *emm* types were the most prevalent 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* were present. Recently, a study from São Paulo, Brazil, demonstrated that the most predominant *emm* types were *emm1*, *emm6*, *emm12*, *emm22*, *emm77* and *emm87* (Amicis et al., 2013). Overall, the *emm1* is considered the most frequent *emm* type over the world (Oehmcke et al., 2010; Amicis et al., 2013) and *emm12* was found in many places as also demonstrated by our study.

*Streptococcus pyogenes* is recognised by its arsenal of virulence factors that targets and impairs the immune system. Many of these are scattered throughout the genome and are not strictly part of pathogenicity island. For the most part, these virulence genes are conserved amongst strains, apart from the ones carried by phages (Ibrahim et al., 2016). In our study, four virulence genes were present in all 25 isolates, a superantigen (*speG*), a streptolysin O (*slo*), C5a-peptidase (*scpa*) and a nuclease A (*spna*). The first three are usually present in within the GAS chromosomes while the last one is prophage encoded. The mitogenic factor (*mf2*) and the superantigens (*speL* and *speJ*) all phage encoded were also present in a high number of isolates. In addition, the streptococcal inhibitor of complement (*sic*), the NAD-glycohydrolase (*nga*), which is directly linked to SLO production and the superantigen SMEZ, are all chromosomally encoded and were also present in a high number of isolates (Banks et al., 2002; Fieber and Kovarik, 2014). These results can be considered evidence that horizontal gene transfer occurs among our isolates and that most of them has a high number of virulence factors, which demonstrates a potential to cause severe diseases.

An important review has brought to light many studies regarding SAGs and its association with invasive and non-invasive diseases and asymptomatic carriage. However, it is still a controversial topic, where associations are shown in some studies but not in others (Commons et al., 2014). In our study, SAGs were distributed along the diverse clinical isolates without showing a pattern that could lead us to believe in associations between them and *emm* types or site of infection (Table 4).

In summary, GAS remains susceptible to penicillin, however resistance to the treatment alternatives can be seen. The *emm* typing, presents M1 as the most frequent among the isolates, which is in agreement with most of the studies in the literature. Besides, the following *emm* types more often found here are too diverse to define a proper pattern. The virulence factors presence and absence demonstrated that chromosomally and phage encoded genes were found, which confers a potential for high virulence microorganisms. No association could be found between virulence factors and *emm* typing or site of infection, confirming the controversial character of this subject.

Even though the number of isolates here is considered low and do not represent the entire population of the South of Brazil, we believe that it was possible to gain insights regarding the isolates circulating in this area.

#### **Conflicts of interest**

None to declare.

#### **Acknowledgements**

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

- Arêas GP, Schuab RB, Neves FP, Barros RR. Antimicrobial susceptibility patterns, emm type distribution and genetic diversity of *Streptococcus pyogenes* recovered in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014;109:935–9. doi:10.1590/0074-0276140231.
- Banks DJ, Beres SB, Musser JM. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. *Trends Microbiol* 2002. doi:10.1016/S0966-842X(02)02461-7.
- Bisno AL, Brito MO, Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis* 2003;3:191–200. doi:10.1016/S1473-3099(03)00576-0.
- Commons RJ, Smeesters PR, Proft T, Fraser JD, Robins-Browne R, Curtis N. Streptococcal superantigens: categorization and clinical associations. *Trends Mol Med* 2014;20:48–62. doi:10.1016/J.MOLMED.2013.10.004.
- Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:470–511. doi:10.1128/CMR.13.3.470-511.2000.
- Delpech G, Sparo M, Baldaccini B, Pourcel G, Lissarrague S, Allende LG. Throat Carriage Rate and Antimicrobial Resistance of *Streptococcus pyogenes* In Rural Children in Argentina. *J Prev Med Public Heal Prev Med Public Heal* 2017;12750. doi:10.3961/jpmph.15.073.
- Fieber C, Kovarik P. Responses of innate immune cells to group A *Streptococcus*. *Front Cell Infect Microbiol* 2014;4:140. doi:10.3389/fcimb.2014.00140.
- Gherardi G, Petrelli D, Di Luca MC, Pimentel de Araujo F, Bernaschi P, Repetto a., et al. Decline in macrolide resistance rates among *Streptococcus pyogenes* causing pharyngitis in children isolated in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015. doi:10.1007/s10096-015-2414-x.
- Ibrahim J, Eisen JA, Jospin G, Coil DA, Khazen G, Tokajian S. Genome Analysis of *Streptococcus pyogenes* Associated with Pharyngitis and Skin Infections. *PLoS One* 2016;11.

doi:10.1371/journal.pone.0168177.

Lintges M, Arlt S, Uciechowski P, Plümäkers B, Reinert RR, Al-Lahham A, et al. 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* 2007;297:471–8. doi:10.1016/j.ijmm.2007.03.015.

Molloy EM, Cotter PD, Hill C, Mitchell DA, Ross RP. Streptolysin S-like virulence factors: The continuing saga. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:670–81. doi:10.1038/nrmicro2624.

Osowicki J, Vekemans J, Kaslow DC, Friede MH, Kim JH, Steer AC. WHO/IVI global stakeholder consultation on group A *Streptococcus* vaccine development: Report from a meeting held on 12–13 December 2016. *Vaccine* 2018. doi:10.1016/J.VACCINE.2018.02.068.

Reglinski M, Sriskandan S. The contribution of group A streptococcal virulence determinants to the pathogenesis of sepsis. *Virulence* 2014;5:127–36. doi:10.4161/viru.26400.

Smeesters PR, Cadar S, Drèze P-A, Campos D, Van Melderen L. Polyclonal dissemination of tetracycline resistance among *Streptococcus pyogenes* paediatric isolates from Brazil. *J Infect Dev Ctries* 2010;4:704–11.

Yang P, Peng X, Zhang D, Wu S, Liu Y, Cui S, et al. Group a *Streptococcus* strains circulating during scarlet fever epidemic, Beijing, China, 2011. *Emerg Infect Dis* 2013;19:909–15. doi:10.3201/eid1906.121020.

| Target           | Primer Sequences  | T <sub>m</sub> ( C ) | References    | Target       | Primer Sequences  | T <sub>m</sub> ( C ) | References |
|------------------|---|----------------------|---------------|--------------|---|----------------------|------------|
| <i>16S rRNA</i>  | F: GTGAGTAACGCGTAGGTAACCTACCTCATAG<br>R: CCCAGGCGGAGTGCTTAATG                   | –                    | Lintges, 2007 | <i>sof_N</i> | F: AGCCTGACACACTTGGTTGGGT<br>R: GCGGCGCTCAAAAATGGTGTGGT     | 82.89                | This study |
| <i>spec</i>      | F: GGTAAATTTTCAACGACACACACATTA<br>R: TGTTGAGATTCTCCCGAAATAAATAGAT               | 74.27                | Lintges, 2007 | <i>sof_C</i> | TCGGCGCCTTCGTCAATTTGCT<br>ACCCAAGCACAGACAGCTCCA             | 78.37                | This study |
| <i>speg</i>      | F: GCTATGGAAGTCAATTAGCTTATGCAGAT<br>R: TTATGCGAACAGCCTCAGAGG                    | 74.87                | Lintges, 2007 | <i>nga</i>   | F: AGCCTTGTGAGAGGTCACTTTTGG<br>R: GGCAACCAGGAACGTTGAGCGA    | 83.21                | This study |
| <i>spej</i>      | F: CAATTAATACGCATACGAAATCATACCAGTA<br>R: ACGAGTAAATATGTACGGAAGACCAAAAATA        | 73.51                | Lintges, 2007 | <i>spna</i>  | F: ACAGCAGGTGTTTTGTTTGGACCT<br>R: ACTGCTTCTCTTGCATTTACAGCCT | 78.04                | This study |
| <i>spek</i>      | F: TATCGCTTGCTCTATACTACTGAGAGT<br>R: CCAAAGTGTAGTATTTTCATCCGTATTA               | 73.27                | Lintges, 2007 | <i>dnase</i> | F: AGTCCAGCCTGCGGGTTTTGA<br>R: ACTGCACTGGCAGCACAACACA       | 63.15                | This study |
| <i>spel</i>      | F: GGACGCAAGTTATTATGGATGCTCA<br>R: TTAATAAGTCAGCACCTTCTTCTC                     | 73.95                | Lintges, 2007 | <i>sda1</i>  | F: ACGGAAATGTTTCGTAACGGCTACC<br>R: GTGCATCCGTGTCAGGCTCGTT   | 78.91                | This study |
| <i>spea1-3,5</i> | F: GGTATTTGCTCAACAAGACCCCGAT<br>R: TGTTGTTGAGTCAAGCGTTTCATTATCT                 | 77.29                | Lintges, 2007 | <i>mf2</i>   | F: GCACCTGTGTTTAGCCAGGCTGT<br>R: TGACCCTGTGGGATGGCACAAC     | 81.24                | This study |
| <i>speh</i>      | F: TCTATCTGCACAAGAGGTTTGTGAATGTCCA<br>R: GCATGCTATTAAGTCTCCATTGCCAAAA           | 78.71                | Lintges, 2007 | <i>mf3</i>   | F: ACGAAGGCGACTGAGACACCAG<br>R: TGGCCACGGTCCATTAACCAAGT     | 82.60                | This study |
| <i>spei</i>      | F: AAGGAAAATAAATGAAGTCCGCCAT<br>R: TCGCTTAAAGTAATACCTCCATATGAATTCTTT            | 75.10                | Lintges, 2007 | <i>spna</i>  | F: ACAGCAGGTGTTTTGTTTGGACCT<br>R: ACTGCTTCTCTTGCATTTACAGCCT | 78.04                | This study |
| <i>spem</i>      | F: GCTTTAAGGAGGAGGAGGTTGATATTTATGCTCTA<br>R: CAAAGTGACTTACTTTACTCATATCAATCGTTTC | 62.13                | Lintges, 2007 | <i>dnase</i> | F: AGTCCAGCCTGCGGGTTTTGA<br>R: ACTGCACTGGCAGCACAACACA       | 63.15                | This study |
| <i>smez</i>      | F: CAATAATTTCTCGTCCTGTGTTTGGAT<br>R: GATAAGGCGTCATTCCACCATAG                    | 78.19                | Lintges, 2007 | <i>sda1</i>  | F: ACGGAAATGTTTCGTAACGGCTACC<br>R: GTGCATCCGTGTCAGGCTCGTT   | 78.91                | This study |
| <i>ssa</i>       | F: AATTATTATCGATTAGTGTGTTTTGCAAGTA<br>R: AGCCTGTCTCGTACGGAGAATTATTGAACTC        | 62.67                | Lintges, 2007 | <i>mf2</i>   | F: GCACCTGTGTTTAGCCAGGCTGT<br>R: TGACCCTGTGGGATGGCACAAC     | 81.24                | This study |
| <i>spea1-4</i>   | F: CAAGAAGTATTTGCTCAACAAGACCCCA<br>R: TTAGATGGTCCATTAGTATATAGTTGCTTGTATC        | 72.28                | Lintges, 2007 | <i>slo</i>   | F: TGTCAGCAATGAAGCTCCGCCA<br>R: TGTGCTCTGCAGCATCTCCTCC      | 78.23                | This study |
| <i>scpa</i>      | F: ACGGGTCTTGCCCCAAAGCTA<br>R: GCTGTCGATCAAGAGCACGGCA                           | 84.20                | This study    | <i>sic</i>   | F: GCGGTTTTTCTGGCACACGAGG<br>R: TGAGTGGCCTCAGTGAATGGCT      | 83.11                | This study |

Table 2. Susceptibility profile of 76 *Streptococcus pyogenes* clinical isolates.

| Antimicrobial agent | Susceptible % (n) | Intermediate % (n) | Resistant % (n) |
|---------------------|-------------------|--------------------|-----------------|
| Penicilin           | 100 (76)          | 0                  | 0               |
| Erithromycin        | 73.69 (56)        | 7.89 (6)           | 18.42 (14)      |
| Clindamycin         | 82.9 (63)         | 11.84 (9)          | 5.26 (4)        |
| Tetracycline        | 42.11 (32)        | 25 (19)            | 32.89 (25)      |

Table 3. Distribution of *emm* types according to clinical specimen in *S. pyogenes* clinical isolates from south Brazil.

| <i>emm</i> type <sup>a</sup> | Clinical specimen |             |            |                     | Total            |
|------------------------------|-------------------|-------------|------------|---------------------|------------------|
|                              | Blood             | Skin lesion | Oropharynx | Others <sup>b</sup> |                  |
| 1                            | 4                 | 1           | –          | 2                   | 7 (28%)          |
| 60                           | –                 | 1           | 1          | –                   | 2 (8%)           |
| 57                           | –                 | 1           | 1          | –                   | 2 (8%)           |
| 27                           | –                 | 2           | –          | –                   | 2 (8%)           |
| 12                           | 1                 | –           | 1          | –                   | 2 (8%)           |
| 68                           | 1                 | 1           | –          | –                   | 2 (8%)           |
| 58                           | 1                 | –           | –          | –                   | 1 (4%)           |
| 22                           | –                 | –           | 1          | –                   | 1 (4%)           |
| 59                           | –                 | 1           | –          | –                   | 1 (4%)           |
| 8                            | –                 | –           | 1          | –                   | 1 (4%)           |
| 73                           | –                 | 1           | –          | –                   | 1 (4%)           |
| 92                           | –                 | –           | 1          | –                   | 1 (4%)           |
| 44                           | –                 | 1           | –          | –                   | 1 (4%)           |
| 90                           | –                 | 1           | –          | –                   | 1 (4%)           |
| <b>Total</b>                 | <b>7</b>          | <b>10</b>   | <b>6</b>   | <b>2</b>            | <b>25 (100%)</b> |

<sup>a</sup> *emm* types ordered beginning by the most prevalents.

<sup>b</sup> others clinical specimens were pleural fluid (n=1) and sputum (n=1)

Table 4. M protein, sites of infection and SAgS distribution among the 25 GAS clinical isolates.

| <i>emm</i> type | Site of infection | SAgs profile  |
|-----------------|-------------------|---|
| 1               | blood             | spea1-3, speC, speG, speJ, speL, speI, SMEZ             |
| 1               | blood             | spea1-3, speC, speG, speH, speM, SMEZ                   |
| 1               | skin lesion       | speG, speJ, speK, speL, speH, speI, speM, SMEZ, ssa     |
| 1               | pleural liquid    | speA-5, speG, speJ, speL, speI, speM, SMEZ, ssa         |
| 1               | blood             | speA -5, speG, speJ, speL, speI, SMEZ                   |
| 1               | sputum            | speA-5, speG, speK, speL, speI, speM, SMEZ, ssa         |
| 1               | blood             | speA-5, speG, speJ, speL, speH, speI, speM, SMEZ, ssa   |
| 60              | skin lesion       | speA1-3, speG, speJ, speK, speL, speH, SMEZ             |
| 60              | oropharynx        | speA1-3, speG, speJ, speL, speI, speM                   |
| 57              | skin lesion       | speA1-3, speC, speG, speL, speH, speI, speM, SMEZ       |
| 57              | oropharynx        | speA1-3, speG, speJ, speL, speI                         |
| 27              | skin lesion       | speA1-3, speG, speJ, speL, speI, speM, SMEZ, ssa        |
| 27              | skin lesion       | speA -5, speG, speJ, speL, speI, speM, SMEZ, ssa        |
| 12              | oropharynx        | speA-5, speC, speG, speL, speH, speM, SMEZ              |
| 12.17           | blood             | speA-5, speC, speG, speJ, speL, speH, speI, speM, SMEZ  |
| 68              | blood             | speA-5, speC, speG, speJ, speH, SMEZ                    |
| 68              | skin lesion       | speA-5, speG, speJ, speK, speI, speM, SMEZ              |
| 58              | blood             | speA1-3, speC, speG, speL, speH, SMEZ                   |
| 22              | oropharynx        | speA1-3, speC, speG, speJ, speL, speH, speM, SMEZ       |
| 59              | skin lesion       | speA-5, speC, speG, speJ, speK, speL, speH              |
| 8               | oropharynx        | speA1-3, speC, speG, speJ, speK, speL, speH, SMEZ       |
| 73              | skin lesion       | speA1-3, speC, speG, speJ, speL, speH, speI, speM, SMEZ |
| 92.0            | oropharynx        | speA1-3, speG, speJ, speL, speH, ssa                    |
| 44              | skin lesion       | speA-5, speG, speL, speI, speM, SMEZ                    |
| 90              | skin lesion       | speA-5, speG, speJ, speL, speI, speM, ssa               |

Figure 1. Frequency of superantigens among the 25 GAS clinical isolates.

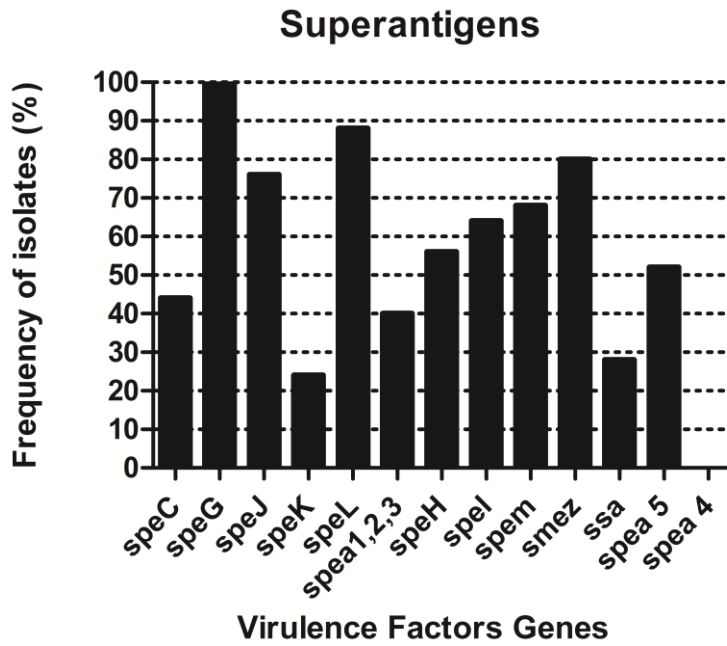
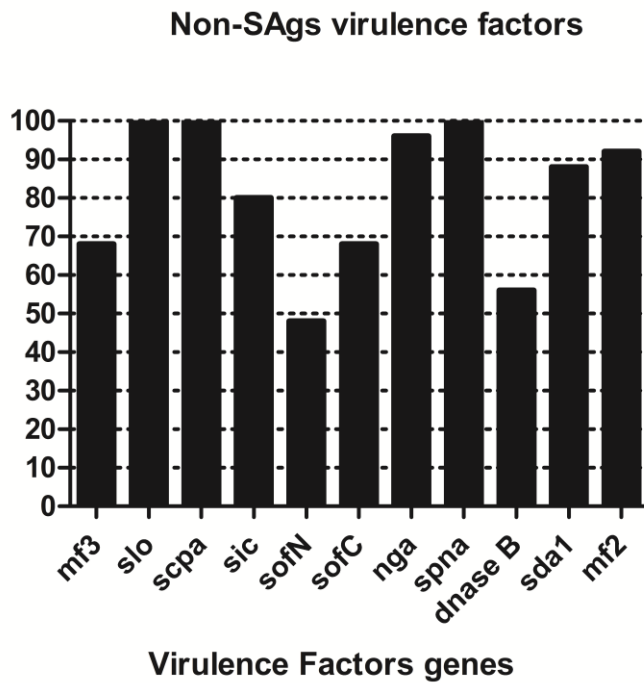


Figure 2. Frequency of Non-superantigens among the 25 GAS clinical isolates.



## 7. Manuscrito II

Será submetido à revista Genome Biology and Evolution.

### **Comparative genomic analysis of four *Streptococcus pyogenes* clinical isolates recovered from different sites of infection.**

Gustavo Enck Sambrano<sup>1,2</sup>, Thiago Galvão da Silva Paim<sup>1</sup>, Camilla Thorn<sup>2</sup>, Renata Oliveira Soares<sup>1</sup>, Pedro Alves d'Azevedo<sup>1</sup>, Florence Abram<sup>2</sup>

1- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

2- National University of Ireland Galway, Galway, Ireland

Corresponding author: Florence Abram. Mail Address: Functional and Environmental Microbiology Lab, National University of Ireland Galway, University Road, Galway, Ireland, H91 TK33, T. +353 91 524411. e-mail: [florence.abram@nuigalway.ie](mailto:florence.abram@nuigalway.ie).

**Abstract**

*Streptococcus pyogenes* (GAS) is an important human pathogen that causes diverse clinical manifestations but can also be found colonising the throat and skin of healthy hosts. Here we selected four clinical isolates of GAS recovered from different sites of infection to conduct a comparative genome analysis. The four isolates have different *emm* types and ST's and were recovered from the following sites of infection: blood (*emm58*/ST176), skin (*emm169.3*/ST 53), oropharynx (*emm8*/ ST 59) and vaginal secretion (*emm1*/ ST 28). Only two isolates (recovered from skin and oropharynx) presented the tetracycline resistance *tet(M)* gene while no other known antibiotic resistance genes were found to be present amongst the four isolates. Important virulence factors including superantigens and DNases were harboured by the four strains. Examination of the CovS coding region revealed the presence of indels in the strain recovered from vaginal secretion, possibly indicative of invasiveness potential. Phages were present in all isolates except in the one recovered from the skin and all phages were found to carry virulence genes, mainly superantigens. CRISPRs were also found in the four genomes. Functional annotation using the COG database showed no difference among the 26 classes. Pan-genome analysis showed that 75% of the genes were in core genes. Core alignment and tree construction placed the vaginal secretion isolate on the same clade that others *emm1* that were recovered from invasive infections. The blood and oropharynx isolates clustered together while the strain recovered from the skin was in branch alone. In conclusion, the analysis of the four strains recovered from four different sites of infection demonstrated a high level of similarity at genome level and a clear role for phage in virulence characteristics propagation.

**Keywords:** *Streptococcus pyogenes*, whole genome sequence, infection sites.

## Introduction

*Streptococcus pyogenes* also referred, as group A *Streptococcus* (GAS) is a human pathogen that can cause a variety of clinical diseases ranging from mild like pharyngitis and impetigo, to severe such as necrotising fasciitis (NF), streptococcal toxic shock syndrome (STSS) and acute rheumatic fever (ARF) (Walker et al., 2014). GAS can also colonise the throat and skin of healthy host without any apparent clinical signs and symptoms. It has been reported that colonisation rates are high in children (2.5 – 32%) when compared to adults (1.5 – 4.9%) (Kulkarni et al., 2016).

GAS is well adapted to human host, since it is equipped with a large set of virulence factors of all classes that help bacteria in many ways, such as (i) antiphagocytic activity (M protein, Hyaluronic acid capsule, C5a-peptidase), (ii) adherence to epithelial cells (Fibronectin-binding proteins, M protein), (iii) spread through deeper tissues (Streptokinase, SpeB- cysteine protease, DNAses) and (iv) systemic toxicity (Streptolysins O and S, Superantigens) (Bisno et al., 2003; Fiedler et al., 2015).

High-throughput sequencing technologies have allowed for the improved analysis of *S. pyogenes* with respect to host interaction and pathogenicity, providing insights into *S. pyogenes* virulence, colonisation, invasiveness, as well as the evolution of well-adapted strains (Eraso et al., 2016). Various studies have analysed whole genome sequences of GAS, searching for specific elements, in order to establish a genetic profile that can be correlated to clinical outcomes or determined sites of infection (Lefébure et al., 2012; Lynskey et al., 2015; Maamary et al., 2012) . The aim of this study was to carry out a comparative genomic analysis of four clinical *S. pyogenes* strains recovered from different sites of infection in order to gain some insights into niche adaptation.

## Methods

### *Streptococcus pyogenes* strains

Four clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* recovered from four different infections sites namely: blood, oropharynx, skin and vaginal secretion were included in the study. They were collected from two hospitals in Porto Alegre city, Rio Grande do Sul, Brazil. 16S rRNA PCR was also carried out to confirm their identification (Lintges et al., 2007).

### DNA extraction

Isolates of *S. pyogenes* were grown on Todd-Hewitt Broth at 37°C under microaerophilic conditions and agitation until an OD<sub>600nm</sub> of 0.6 (mid-exponential phase). The samples were then centrifuged at 3000rpm for five minutes and the supernatants discarded. DNA extraction was based on the protocol from Griffiths *et al.* (2000). The pellets were re-suspended in 500µl of 2% CTAB buffer in 2ml screw-top micro centrifuge tubes containing 0.5 g of glass beads and 0.5 g zirconia/silica beads. Then 0.5µl of Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1) were added and the tubes were vortexed for 2.5 minutes followed by a centrifugation at 16,000 g for 10 minutes at 5°C. The top aqueous layer was removed and 500 µl of Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) was added prior to centrifugation at 16000 g for 5 minutes at 5°C. The top aqueous layer was removed and placed into a new microcentrifuge tube. The DNA was then precipitated by adding two volumes of 30% PEG solution and incubated at 7°C for 2 hours. The samples were centrifuged at 16,000 g for 20 minutes at 5°C and the supernatants discarded followed by the addition of 1ml of ice-cold 70% ethanol. The samples were then centrifuged at 16,000 g and 5°C for 25 minutes and the pellets were air-dried. Finally, the pellets were re-suspended

in 40µl of RNase free sterile water and the DNA was treated with RNase and snap frozen for further analysis.

### Genomic sequencing and analysis

Genomic DNA concentration was measured using Qubit™ 2.0 fluorometric quantitation (Thermo-Fisher, UK). Whole genome sequencing was carried out by Microbes NG (Birmingham, UK) using the Illumina MiSeq platform and the 500-cycles Nextera XT Index kit v2 (Illumina, USA). Quality control analysis of the reads was performed using the FastQC tool (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) and low quality sequences were trimmed using Trimmomatic (Anthony M. Bolger et al., 2014). *De novo* genome assembly was carried out with SPAdes 3.5.0 (Bankevich et al., 2012). Quality control of the assemblies was done using QUAST (Gurevich et al., 2013). The genome annotation was performed using PROKKA v 1.12 (Seemann, 2014) and NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline, followed by a manual curation. The four draft genomes have been deposited in Genbank under the following accession numbers: NBYS000000000, NBYT000000000, NBYU000000000 and NBYV000000000. The Average Nucleotide Identity was performed with all draft genomes in order to confirm they belong to *Streptococcus pyogenes* species (Richter et al., 2016). *In silico emm* typing was carried out with primers described at the CDC website and with the Geneious R9 software, while *in silico* Multilocus Sequence Typing (MLST) was done at the CBS (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark) website (Larsen et al., 2012). The genomes were searched for acquired resistance genes, phages and CRISPRs using the web tools Resfinder (Zankari et al., 2012), PHASTER (Arndt et al., 2016) and the CRISPRFinder (Grissa et al., 2007). The resulting phage sequences were annotated using a specific streptococcal database in order to verify the gene content of these structures. Virulence genes were identified using the Virulence

Factors Database (VFDB)(Chen et al., 2016) with an in-house python script using BLASTP algorithm (parameters: e-value  $\leq 10^{-3}$ , alignment coverage  $\geq 50\%$  and amino acid identity  $\geq 70\%$ ).

The COG database was used to perform a functional annotation of the four genomes (Galperin et al., 2015). The pan-genome analysis was performed using the software roary and included the four isolates of this study and all the genomes available at NCBI Refseq in October 2017. Lastly, the analysis of the core genome content of 53 *S. pyogenes* strains, including the four isolates of this study, based on SNPs variation was done using the suite Parsnp and a tree was built on the iTOL online tool (Treangen et al., 2014), (Letunic and Bork, 2016).

## Results and Discussion

Whole genome sequencing resulted in an average of 279,566 paired-end reads for the four isolates with average sequence coverage of the whole genomes of 56X. The average N50 for the assemblies was 233,169 bp and the assemblies produced 20, 38, 22 and 25 contigs greater or equal 200 bp for the blood, skin, oropharynx and vaginal secretion isolates, respectively. The complete sequencing and assembly metrics for each isolate are shown in Table 1. The average genome size was 1.80 Mbp and the average G+C content was 38.3% both in agreement with *S. pyogenes* characteristics. The number of predicted genes, encoding proteins and RNAs were also found to fall within the general ranges for the species (Table 1; Maruyama et al., 2016.).

All four isolates had an ANI cut off higher than 0.96 when compared to *S. pyogenes* reference strains, confirming they all belong to this species (Richter et al., 2016).

In silico *emm* typing resulted in four different *emm* types distributed across three different *emm* clusters. The isolates recovered from blood, skin, oropharynx and vaginal

secretion were classified as *emm* types 58 (*emm* cluster E3), 169.3 (*emm* cluster E4), 8 (*emm* cluster E4), and 1 (*emm* cluster A-C3). The MLST analysis resulted in different STs for each isolate. The four STs were as follows, 176 (blood isolate), 53 (skin isolate), 59 (oropharynx isolate) and 28 (vaginal secretion isolate).

Antimicrobial susceptibility assays revealed that all isolates were susceptible to all antimicrobials tested with the exception of the skin and oropharynx strains both resistant to tetracycline. The resfinder tool was able to confirm the presence of *tet(M)* genes within these two genomes. Resistance to tetracycline is well described in Brazil and worldwide. However, the resistance rates to that antimicrobial agent vary considerable, ranging from 18.7% to 73% depending on the geographical region of isolation (Arêas et al., 2014).

The VFDB search returned a total of 47, 46, 39 and 48 virulence factors genes for blood, oropharynx, skin and vaginal secretion isolates respectively. Of all the virulence factors present in each strain, 28 were shared by the four clinical *S. pyogenes* in this study. Eight unique virulence factors were found in the blood isolate, 9 in the vaginal secretion isolate, 2 in the skin isolate and 1 in the oropharynx isolate (Fig.1). Amongst the 28 shared virulence factors some are very well described including *emm*, *scpA*, *speB*, *sagA*, *slo* and the *has ABC* operon (Table 2). These genes are chromosomally encoded and virtually present in all isolates of *S. pyogenes*. The first one codes for the M protein, which is considered the major *S. pyogenes* virulence factor as it displays antiphagocytic activity, in addition to help the bacteria to adhere and invade deeper tissue (Terao, 2012).

Some studies aimed to find a relationship between the *emm* type and disease manifestation but most of them failed to do so (ref please). Similar attempts to correlate superantigens, such as SpeA and SpeC found a weak correlation between gene presence and disease (ref please). However these studies only focused on a few genes (e.g. *emm*, *speA* and *speC*) instead of comparing entire genomes. In our study, the four isolates displayed different

*emm* types including the worldwide-disseminated M1 type found in the isolate recovered from the vaginal secretion, which is not a common site of infection. The other three isolates had *emm* types that are very rare in Brazil and globally (Freschi de Barros et al., 2015; Imöhl et al., 2017). The *hasABC* operon, found in all isolates, codes for hyaluronic acid capsule and its expression is directly linked to antiphagocytic and invasive functions. *scpA* encodes a C5a peptidase with antiphagocytic activity, while *sagA* and *slo* encodes streptolysin S and O and both act as toxins. SpeB is a cysteine protease expressed by most *S. pyogenes* isolates that degrades numerous host proteins to promote tissue damage and impair host immune functions. On the contrary, SpeB cleaves and inactivates multiple surface-associated and extracellular *S. pyogenes* virulence determinants (Cole et al., 2011). Approximately 18% of the *S. pyogenes* genome, including this cysteine protease is regulated by the two-component system CovRS. Mutations in the sensor kinase CovS are related to invasiveness and hypervirulence. Indeed, inactivation of this sensor affects the regulator CovR leading to a de-repression and consequently expression of most virulence factors under its control. In addition, naturally mutant strains like M23ND/CovS<sup>-</sup> usually have indels on this region that inactivates the sensor (Bao et al., 2015). Multiple alignment of the CovS regions from our four clinical isolates demonstrated indels varying in size in the vaginal secretion genome when compared to the isolates from blood, skin, oropharynx and the wild type non-mutant JRS4. This could be indicative of the invasive potential of that strain (Garcia et al., 2010). A summary of the most important virulence genes found in each of the strains and the ones shared by more than one strain but not by all is presented in Table 3. It is worth noticing that the only strain with genes coding for pilus, important in host cell attachment, colonisation and pathogenesis, was the one recovered from the vaginal secretion. *S. pyogenes* pili usually consist of three components, a major pilin (FctA) and two minor pilin proteins (Cpa and FctB). The polymerisation of the pilin subunits is mediated by a specific sortase (srtC1),

which catalyses the formation of isopeptide bonds between subunits (Young et al., 2014). All these genes were found to be present in the vaginal secretion strain. In addition, the presence of the streptococcal inhibitor of complement (*sic*) as well as the superantigens (SAGs) *speA* and *speJ* was confirmed only in the vaginal secretion isolate. *sic* and *speA*, are usually found in *emm1* strains while the *speJ* is not associated to any M-type (Ibrahim et al., 2016). Taken together, these results highlight a possible increased virulence potential from the isolate recovered from the atypical site of vaginal secretion.

Results from PHASTER demonstrated the presence of phages in all genomes except in the one recovered from skin. Phages are classified as intact, incomplete and questionable according to the structures found within the sequences (Arndt et al., 2016). There were three incomplete and two intact phages in the blood genome, three incomplete in the oropharynx isolate and three intact in the vaginal secretion genome. Hence, we were able to find six virulence genes on the blood phages, namely *speC*, *speG*, *speM*, *speL*, *mf2* and *slaA* and two on the vaginal secretion phages, *speA* and *sda*. In addition, some other genes known to be carried by phages were found within the four genomes studied but were not detected when using the PHASTER tool (Table 3). Phages are known to be involved in the transfer of virulence and resistance genes (ref please). The presence of phages in our genomes also contribute to genetic variability (Banks et al., 2002). Beres and Musser have demonstrated that genome conservation in *S. pyogenes* can be higher than 85% in gene content and that prophages and integrated conjugative elements (ICEs) are the majors contributors to its variability (Beres and Musser, 2007).

The CRISPR Finder tool divides the results in possible and confirmed CRISPRs based on pre-defined criteria. The analysis of the four clinical isolates identified these structures in all genomes with one confirmed CRISPR in the oropharynx, skin and vaginal secretion strains and possible CRISPRs in the blood and vaginal secretion isolates. An important relationship

was found between CRISPRs and the acquisition of prophages once CRISPRs are considered as protective structures against exogenous DNA (ref please). As the number of spacers is a reliable indicator of CRISPR activity, the activities of the *S. pyogenes* CRISPRs in this study may be considered lower than for other strains. The CRISPR sequence from the oropharynx isolate had 7 spacers in its structure, which is very low yet the highest among our four strains. However, 30 spacers on a CRISPR are considered a structure of low activity (Nozawa et al., 2011).

The functional annotation using the COG database was performed in order to obtain an overall view of the 4 genomes. Overall no difference could be found among the four clinical isolates of this study (Fig. 2). 80% of the genomes could be assigned to a COG category (Fig. 2).

The pan-genome of the four clinical isolates yielded 2,364 genes, including 1,421 core genes. The average number of genes predicted for each of the four genomes was 1,883, which means that approximately 75% of the genes are shared among the four clinical isolates. This demonstrates the importance of prophages and ICEs for the genetic variability (Fig. 3) (Bessen et al., 2014). Next we included an additional 329 *S. pyogenes* strains, which produced a pan-genome with 5808 genes with only 872 within the core group. With this higher number of genomes the percentage of shared genes drops to approximately 46%.

The core alignment of 53 whole genome sequences of closed *S. pyogenes*, including the four clinical strains of this study was used to build a phylogenetic tree (Fig.4). The vaginal secretion strain shared a node with other *emm1*, ST 28, with most of the strains in this cluster recovered from invasive infections, again highlighting the potential of this strain for invasiveness. The isolates from blood and oropharynx clustered together on the same node, even though they possess different M types and ST's. The skin isolate stands alone in a branch with the two closest strains also belonging to different *emm* types and ST's. Taken

together, our results indicate that analysis only based on *emm* types, *emm* clusters and ST's is likely to be unsuitable for uncovering correlations with site of infection or clinical manifestation.

### **Conclusion**

The whole genome analysis of four *S. pyogenes* clinical isolates recovered from different sites of infections has demonstrated that although they present some differences, 75% of their genomes were conserved and that the potential to become an invasive strain might be intrinsic to all members of the species (Tagini et al., 2017).

The differences found among *S. pyogenes* strains are too small to allow us to define patterns, it is more likely to understand that the overall characteristics of these strains such as virulence genes and SAGs profile can lead to any kind of disease manifestation but the real mechanism by which they end up causing determined clinical outcome is still unclear.

## References

- Anthony M. Bolger<sup>1,2</sup> M and BU. Trimmomatic a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;**30**:2114–20.
- Arêas GP, Schuab RB, Neves FP, Barros RR. Antimicrobial susceptibility patterns, emm type distribution and genetic diversity of *Streptococcus pyogenes* recovered in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014;**109**:935–9. doi:10.1590/0074-0276140231.
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 2016;**44**. doi:10.1093/nar/gkw387.
- Banks DJ, Beres SB, Musser JM. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. *Trends Microbiol* 2002. doi:10.1016/S0966-842X(02)02461-7.
- Bao Y-J, Liang Z, Mayfield JA, Lee SW, Ploplis VA, Castellino FJ. CovRS-Regulated Transcriptome Analysis of a Hypervirulent M23 Strain of Group A *Streptococcus pyogenes* Provides New Insights into Virulence Determinants. *J Bacteriol* 2015;**197**:3191–205. doi:10.1128/JB.00511-15.
- Beres SB, Musser JM. Contribution of exogenous genetic elements to the group A *Streptococcus* metagenome. *PLoS One* 2007;**2**. doi:10.1371/journal.pone.0000800.
- Bessen DE, McShan WM, Nguyen S V., Shetty A, Agrawal S, Tettelin H. Molecular epidemiology and genomics of group A *Streptococcus*. *Infect Genet Evol* 2014;**33**:393–418. doi:10.1016/j.meegid.2014.10.011.
- Bisno AL, Brito MO, Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis* 2003;**3**:191–200. doi:10.1016/S1473-3099(03)00576-0.
- Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q, K. O, et al. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. *Nucleic Acids Res* 2016;**44**:D694–7.

doi:10.1093/nar/gkv1239.

Cole JN, Barnett TC, Nizet V, Walker MJ. Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:724–36. doi:10.1038/nrmicro2648.

Eraso JM, Olsen RJ, Beres SB, Kachroo P, Porter AR, Nasser W, et al. Genomic Landscape of Intrahost Variation in Group A Streptococcus: Repeated and Abundant Mutational Inactivation of the *fabT* Gene Encoding a Regulator of Fatty Acid Synthesis. *Infect Immun* 2016;84:3268–81. doi:10.1128/IAI.00608-16.

Fiedler T, Köller T, Kreikemeyer B. Streptococcus pyogenes biofilms-formation, biology, and clinical relevance. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5:15. doi:10.3389/fcimb.2015.00015.

Freschi de Barros S, De Amicis KM, Alencar R, Smeesters PR, Trunkel A, Postól E, et al. Streptococcus pyogenes strains in Sao Paulo, Brazil: molecular characterization as a basis for StreptInCor coverage capacity analysis. *BMC Infect Dis* 2015;15:308. doi:10.1186/s12879-015-1052-3.

Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin E V. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res* 2015;43. doi:10.1093/nar/gku1223.

Garcia AF, Abe LM, Erdem G, Cortez CL, Kurahara D, Yamaga K. An insert in the *covS* gene distinguishes a pharyngeal and a blood isolate of Streptococcus pyogenes found in the same individual. *Microbiology* 2010;156:3085–95. doi:10.1099/mic.0.042614-0.

Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 2007;35:W52-7. doi:10.1093/nar/gkm360.

Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013;29:1072–5. doi:10.1093/bioinformatics/btt086.

Ibrahim J, Eisen JA, Jospin G, Coil DA, Khazen G, Tokajian S. Genome Analysis of

*Streptococcus pyogenes* Associated with Pharyngitis and Skin Infections. *PLoS One* 2016;11:e0168177. doi:10.1371/journal.pone.0168177.

Imöhl M, Fitzner C, Perniciaro S, van der Linden M. Epidemiology and distribution of 10 superantigens among invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Germany from 2009 to 2014. *PLoS One* 2017;12:e0180757. doi:10.1371/journal.pone.0180757.

Kulkarni T, Aikawa C, Nozawa T, Murase K, Maruyama F, Nakagawa I. DNA-based culture-independent analysis detects the presence of group A streptococcus in throat samples from healthy adults in Japan. *BMC Microbiol* 2016;16. doi:10.1186/s12866-016-0858-5.

Larsen M V, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 2012;50:1355–61. doi:10.1128/JCM.06094-11.

Lefébure T, Richards VP, Lang P, Pavinski-Bitar P, Stanhope MJ. Gene repertoire evolution of *Streptococcus pyogenes* inferred from phylogenomic analysis with *Streptococcus canis* and *Streptococcus dysgalactiae*. *PLoS One* 2012;7:e37607. doi:10.1371/journal.pone.0037607.

Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 2016;44:W242-5. doi:10.1093/nar/gkw290.

Lintges M, Arlt S, Uciechowski P, Plümäkers B, Reinert RR, Al-Lahham A, et al. 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* 2007;297:471–8. doi:10.1016/j.ijmm.2007.03.015.

Lynskey NN, Turner CE, Heng LS, Sriskandan S. A truncation in the regulator RocA underlies heightened capsule expression in serotype M3 group A streptococci. *Infect Immun* 2015;83:1732–3. doi:10.1128/IAI.02892-14.

Maamary PG, Ben Zakour NL, Cole JN, Hollands A, Aziz RK, Barnett TC, et al. Tracing the

evolutionary history of the pandemic group A streptococcal M1T1 clone. *FASEB J* 2012;26:4675–84. doi:10.1096/fj.12-212142.

Nozawa T, Furukawa N, Aikawa C, Watanabe T, Haobam B, Kurokawa K, et al. CRISPR inhibition of prophage acquisition in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One* 2011;6:e19543. doi:10.1371/journal.pone.0019543.

Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 2016;32:929–31. doi:10.1093/bioinformatics/btv681.

Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation 2014;30:2068–9. doi:10.1093/bioinformatics/btu153.

Tagini F, Aubert B, Troillet N, Pillonel T, Praz G, Crisinel PA, et al. Importance of whole genome sequencing for the assessment of outbreaks in diagnostic laboratories: analysis of a case series of invasive *Streptococcus pyogenes* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;1–8. doi:10.1007/s10096-017-2905-z.

Terao Y. The virulence factors and pathogenic mechanisms of *Streptococcus pyogenes*. *J Oral Biosci* 2012;54:96–100. doi:10.1016/j.job.2012.02.004.

Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, Phillippy AM. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol* 2014;15:524. doi:10.1186/PREACCEPT-2573980311437212.

Walker MJ, Barnett TC, McArthur JD, Cole JN, Gillen CM, Henningham A, et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group a *Streptococcus*. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:264–301. doi:10.1128/CMR.00101-13.

Young PG, Proft T, Harris PWR, Brimble M a., Baker EN. Structure and activity of *Streptococcus pyogenes* SipA: A signal peptidase-like protein essential for pilus polymerisation. *PLoS One* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0099135.

Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012;67. doi:10.1093/jac/dks261.

Figure 1. Venn diagram with the number of virulence factors of each specie as well as the ones shared by them.

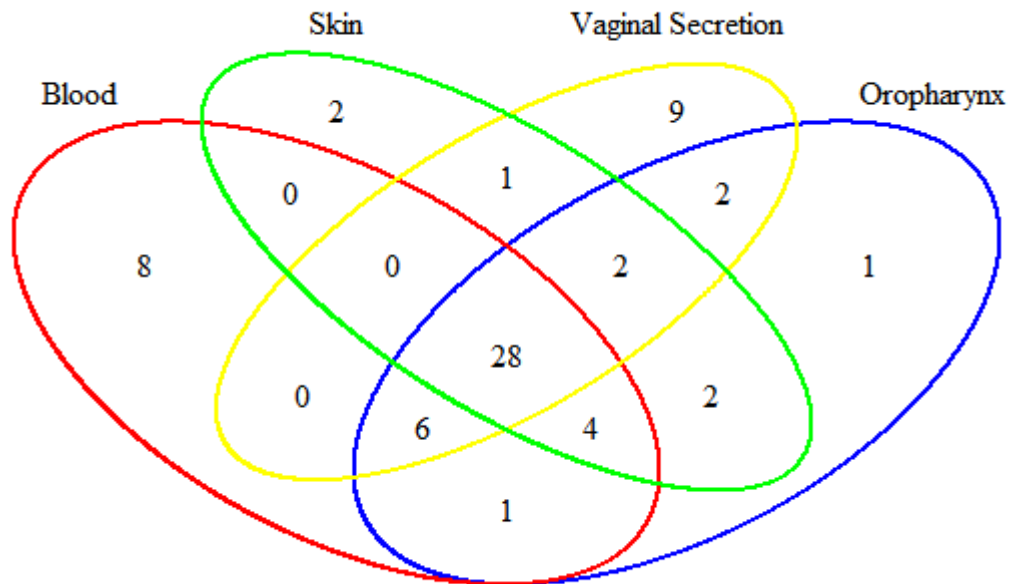


Figure 2. Functional annotation of the four *S. pyogenes* clinical isolates.

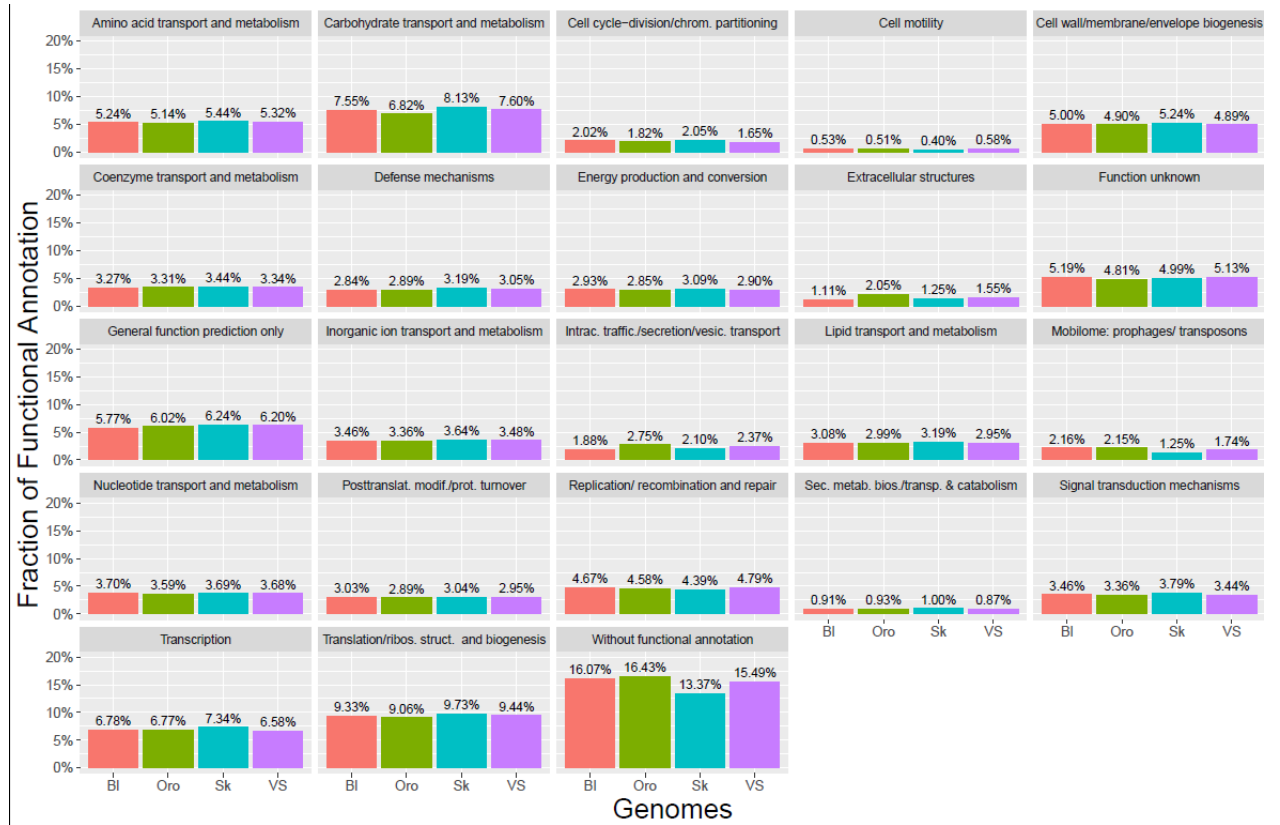


Figure 3. Alignment of the four clinical *S. pyogenes* strains with the pan-genome as reference. The alignment was done using the software Blast Ring Image Generator (BRIG).

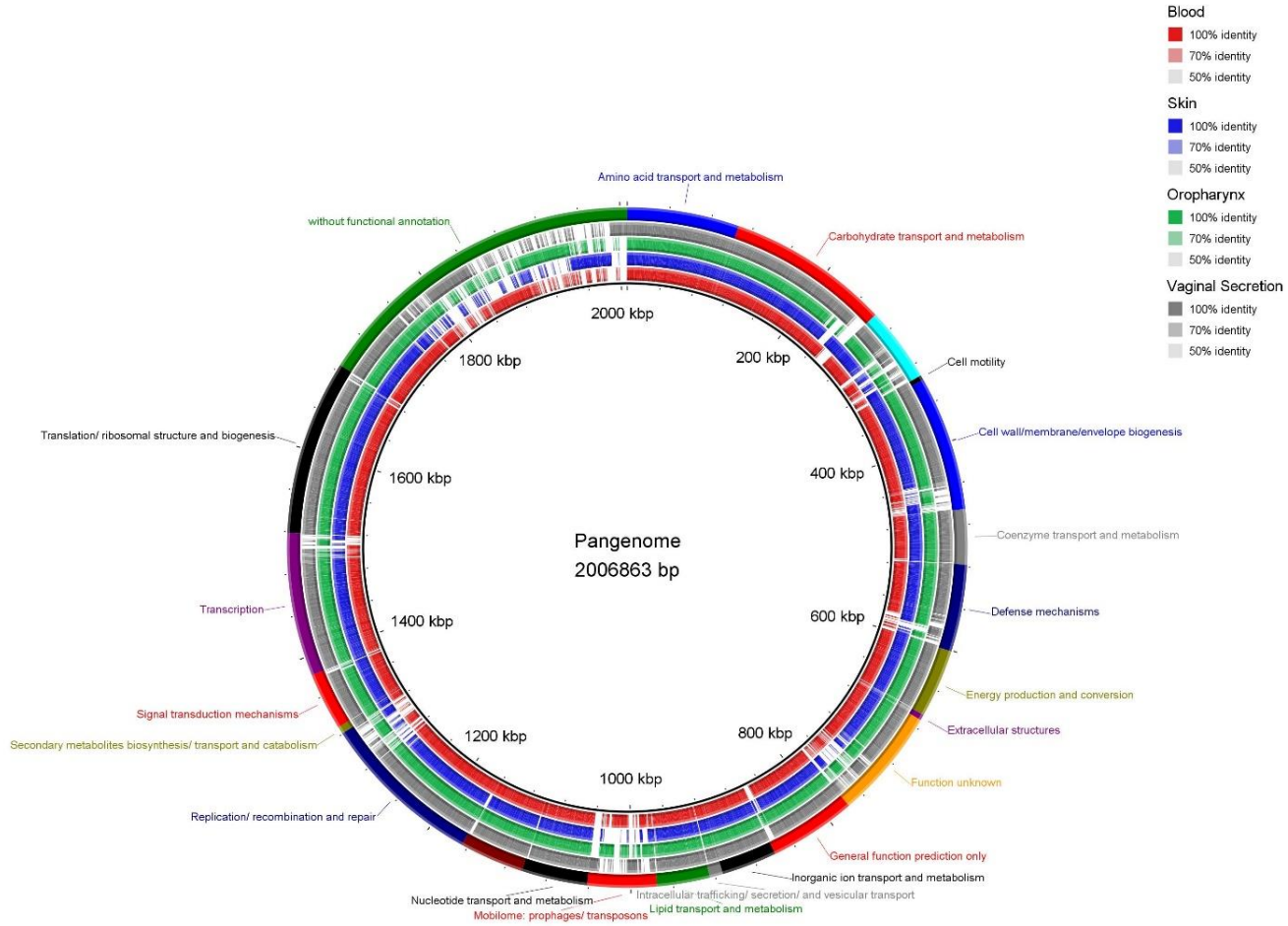


Figure 4. Phylogenetic representation of the sequenced strains and the complete GAS genomes publicly available on NCBI. The phylogenetic tree was made using iTol and is based on the core genome alignment of our 4 isolates (in blue) and the currently 49 closed genomes available on NCBI.

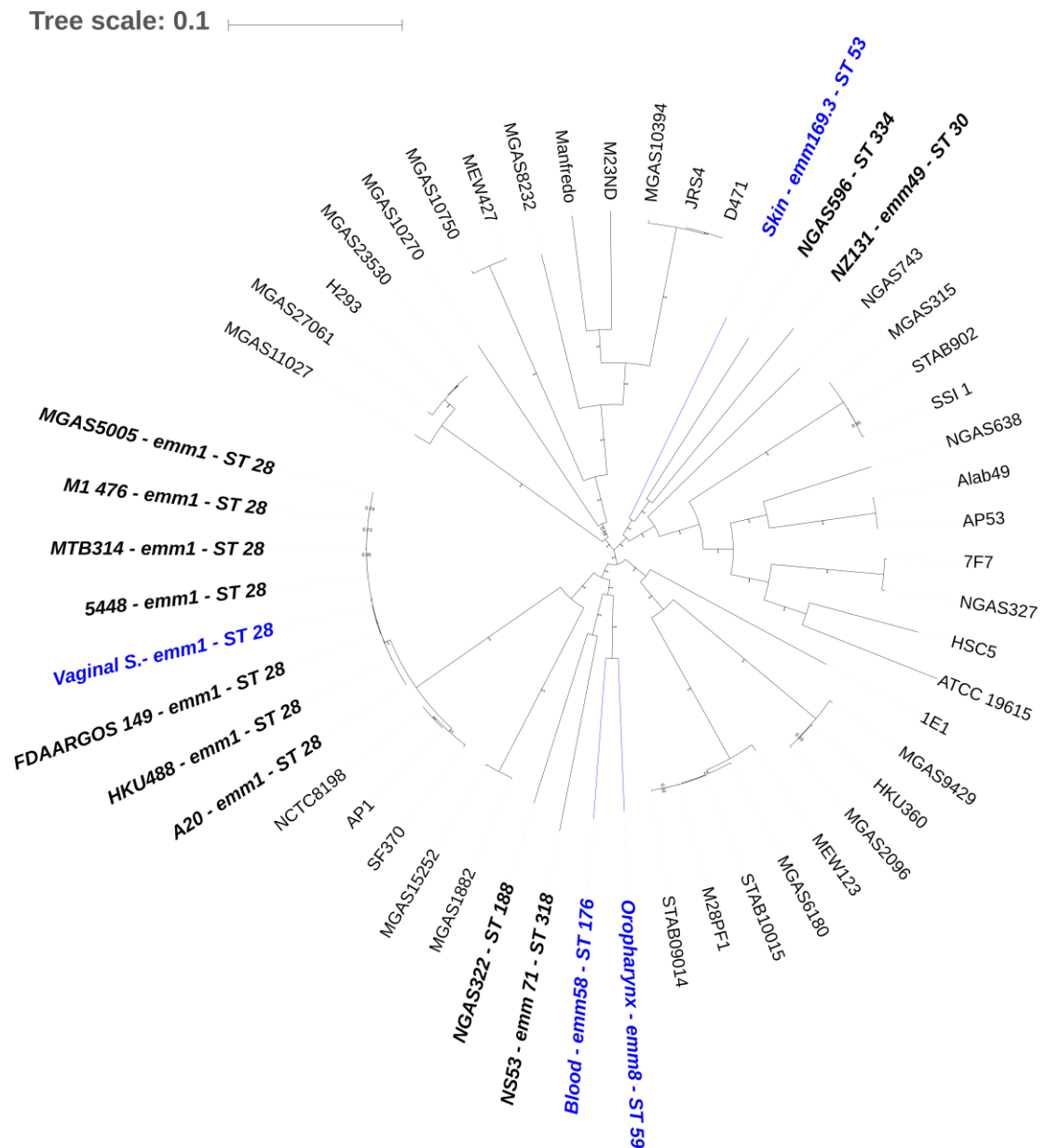


Table 1. Sequencing metrics of the 4 clinical isolates genomes.

| Site of infection | Blood     | Skin      | Oropharynx | Vaginal Secretion |
|-------------------|-----------|-----------|------------|-------------------|
| Total genome size | 1,842,632 | 1,806,404 | 1,861,224  | 1,805,776         |
| Contigs (>200bp)  | 20        | 38        | 22         | 25                |
| Sequence Coverage | 69x       | 48x       | 49x        | 59x               |
| GC content (%)    | 38.28     | 38.34     | 38.34      | 38.39             |
| Number of genes   | 1,892     | 1,844     | 1,933      | 1,863             |
| CDS               | 1,772     | 1,772     | 1,855      | 1,797             |
| tRNA              | 56        | 48        | 45         | 47                |
| rRNA              | 6         | 8         | 8          | 6                 |

Table 2. Important virulence factors shared by the four clinical *S. pyogenes*.

|                                    |             |             |
|------------------------------------|-------------|-------------|
| Important Shared Virulence Factors | <i>hasA</i> | <i>scpA</i> |
|                                    | <i>hasB</i> | <i>scpB</i> |
|                                    | <i>hasC</i> | <i>ska</i>  |
|                                    | <i>sagA</i> | <i>spyA</i> |
|                                    | <i>slo</i>  | <i>spd*</i> |

\* Gene usually carried by phages.

Table 3. Important virulence factors unique to each strain and not shared by all four.

| X                           | Blood                      | Skin                     | Oropharynx                 | Vaginal Secretion          |
|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Important Virulence Factors | <i>speM</i> <sup>1,3</sup> | <i>sclA</i>              | <i>sclA</i>                | <i>sclA</i>                |
|                             | <i>sfbX</i>                | <i>sfbX</i>              | <i>sfbX</i>                | <i>sic</i> <sup>3</sup>    |
|                             | <i>speK</i> <sup>2</sup>   | <i>speK</i> <sup>2</sup> | <i>speK</i> <sup>2</sup>   | <i>speA</i> <sup>1,3</sup> |
|                             | <i>mrp</i>                 | <i>mrp</i>               | <i>mrp</i>                 | <i>sda</i> <sup>1,3</sup>  |
|                             | <i>sof</i>                 | <i>sof</i>               | <i>sof</i>                 | <i>speJ</i> <sup>3</sup>   |
|                             | <i>smeZ</i>                | <i>fbpA</i> <sup>3</sup> | <i>smeZ</i>                | <i>smeZ</i>                |
|                             | <i>fbp54</i>               | -                        | <i>fbp54</i>               | <i>fbp54</i>               |
|                             | <i>speG</i> <sup>1</sup>   | -                        | <i>speG</i>                | <i>speG</i>                |
|                             | <i>prtF1</i> <sup>3</sup>  | -                        | <i>mf3</i> <sup>2</sup>    | <i>mf3</i> <sup>2</sup>    |
|                             | <i>slaA</i> <sup>1</sup>   | -                        | <i>speH</i> <sup>2,3</sup> | <i>FctA</i> <sup>3</sup>   |
|                             | <i>mf2</i> <sup>1</sup>    | -                        | <i>slaA</i> <sup>2</sup>   | <i>FctB</i> <sup>3</sup>   |
|                             | <i>speC</i> <sup>1,3</sup> | -                        | -                          | <i>cpa</i> <sup>3</sup>    |
|                             | <i>scl1</i> <sup>3</sup>   | -                        | -                          | <i>lepA</i> <sup>3</sup>   |
| <i>speL</i> <sup>1,3</sup>  | -                          | -                        | <i>srtC1</i> <sup>3</sup>  |                            |

<sup>1</sup> Genes carried by phages found in the genomes studied.

<sup>2</sup> Genes usually carried by phages.

<sup>3</sup> Unique genes.

## 8. Conclusões

No presente estudo foram avaliados os perfis genético e de susceptibilidade de isolados clínicos de *Streptococcus pyogenes* na cidade de Porto Alegre. Diante da limitação de um número pequeno de isolados envolvidos nas análises moleculares, pode-se tirar algumas conclusões a respeito destes micro-organismos.

Primeiramente, as taxas de resistência aos antimicrobianos variam bastante de acordo com a região onde o estudo é realizado. Muitas vezes devido ao uso incorreto e/ ou superestimado de determinadas classes de antimicrobianos, a resistência acaba por desenvolvida ao longo dos anos. Neste estudo, foram encontradas taxas de resistência altas à tetraciclina principalmente, seguida por eritromicina e clindamicina, sendo a última bastante baixa. Estreptococos do grupo A permanecem em sua maioria suscetíveis à penicilina, antimicrobiano usado há muitas décadas e que ainda possui uma grande importância em infecções causadas por estes microorganismos. Em nosso estudo todos os 76 isolados envolvidos foram suscetíveis à esse antimicrobiano corroborando a literatura que informa a não-susceptibilidade à penicilina como um fenômeno deveras raro.

O perfil molecular dos isolados envolvidos no estudo pode ser avaliado de duas maneiras, uma mais superficial, onde verificou-se a o tipo de proteína M e a presença ou ausência de 24 importantes fatores de virulência e uma mais profunda onde analisou-se o genoma completo de 4 isolados clínicos que foram recuperados de diferentes locais de infecção.

Em um primeiro momento, a análise do tipo de proteína M demonstrou que o tipo M1 é o mais prevalente, sendo seguido por outros 5 tipos diferentes dessa proteína. Estes dados corroboram a literatura mundial que refere o clone M1 como sendo o mais encontrado ao redor do mundo e por vezes o mais presente em episódios de surtos. Mais da metade (57%)

destes isolados foi recuperado de sangue, portanto uma infecção considerada invasiva, porém nenhuma associação pode ser feita, pois ao mesmo tempo 28% destes isolados foram encontrados em sítios não-invasivos. Da mesma maneira, a análise do perfil de virulência destes isolados demonstrou que nenhuma associação pode ser feita com presença de fatores de virulência e doença em invasiva ou tipo de proteína M, uma vez que os genes que codificam fatores de virulência estão distribuídos de maneira muito semelhante ao longo de todos os isolados.

Além disso, alguns genes de virulência foram encontrados em 100% dos isolados como por exemplo, *speG*, *slo*, *C5a-peptidase* e *spna*, seguidos de perto pelos genes *mf-2* (92%), *nga* (96%), *speL*(88%), *sic* e *smeZ* (80%). Alguns desses genes são encontrados no cromossomo de isolados de *S. pyogenes* como por exemplo, *speG*, *slo*, *C5a-peptidase* e *smeZ*. Os outros são normalmente carregados por fagos, casos dos genes *spna*, *speL* e *mf2*, que por meio de mecanismos de transferência horizontal de genes conseguem transmitir estes para outros isolados.

Por fim uma análise mais completa do perfil molecular destes isolados foi realizada com o sequenciamento do genoma completo dos mesmos. Foram utilizados quatro isolados recuperados de infecções em diferentes locais, sendo eles sangue, pele, orofaringe e secreção vaginal. Todos tiveram proteínas M diferentes, bem como o perfil de ST também diferente. A busca por genes de resistência retornou o gene *tet(M)*, que codifica resistência a tetraciclina nos isolados de orofaringe e pele e nenhum outro gene foi encontrado nos demais isolados. A análise e fatores de virulência retornou um número alto dos mesmos por isolado, sendo o que menos possuía genes que codificam fatores de virulência foi o isolado de pele com 39 no total, enquanto que os outros possuíam 46, 47 e 49, sendo eles orofaringe, sangue e secreção vaginal, respectivamente. Pró-fagos foram encontrados em todos os genomas exceto do isolado de pele, embora tenham sido encontrados genes considerados carregados por fagos em todos os

genomas. Inclusive a presença destas estruturas virais são as principais responsáveis pela variabilidade genética entre micro-organismos desta espécie, uma vez que estes possuem um genoma altamente conservado, verificado tanto pela análise baseada na anotação funcional destes genomas quanto pela análise do pan-genoma na qual aproximadamente 75% dos genes eram compartilhados pelos 4 isolados. Além disso, o isolado não invasivo, recuperado de uma secreção vaginal demonstrou um possível potencial para causar infecção invasiva uma vez que mutações com inserções e deleções de nucleotídeos foram encontradas em uma região considerada importante neste quesito, a porção de sensor do regulador transcricional CovRS. Outra evidência deste potencial foi que na análise do genoma core de 53 isolados de GAS, este foi altamente relacionado com outros micro-organismos conhecidamente recuperados de infecções invasivas.

Por fim, diante do exposto, pode se verificar que muito ainda se tem para entender sobre os mecanismos relacionados à patogênese destes isolados e que os avanços no conhecimento com o advento de tecnologias como as de sequenciamento de genoma completo possuem uma importância bastante grande nesta área.

## 9. Anexos

Link para as instruções aos autores – Manuscrito I

<http://memorias.ioc.fiocruz.br/instructions-to-authors>

Link para instruções aos autores – Manuscrito II

[https://academic.oup.com/gbe/pages/General\\_Instructions](https://academic.oup.com/gbe/pages/General_Instructions)

**Parecer Consubstanciado CEP - UFCSPA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Título da Pesquisa:** Avaliação do perfil genético e de resistência de isolados clínicos de Streptococcus pyogenes da cidade de Porto Alegre.**Pesquisador:** Pedro Alves d'Azevedo**Área Temática:****Versão:** 1**CAAE:** 43295215.5.0000.5345**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CULTURA

MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 1.027.789**Data da Relatoria:** 16/04/2015**Recomendações:**

Recomendo pela aprovação do projeto.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto bem delineado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

De acordo com o parecer do Relator.

PORTO ALEGRE, 17 de Abril de 2015

---

**Assinado por:****Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima**

**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:** Avaliação do perfil genético e de resistência de isolados clínicos de Streptococcus pyogenes de pacientes da cidade de Porto Alegre

**Pesquisador:** Pedro Alves d'Azevedo

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 37573614.6.0000.5335

**Instituição Proponente:** Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 943.744

**Data da Relatoria:** 03/02/2015

**Apresentação do Projeto:**

Descrito Anteriormente no Parecer Consubstanciado do CEP.

**Objetivo da Pesquisa:**

Descrito Anteriormente no Parecer Consubstanciado do CEP.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Adequados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Adequados.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos solicitados foram apresentados.

**Recomendações:****Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências foram atendidas.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

PORTO ALEGRE, 03 de Fevereiro de 2015

---

**Assinado por:**

**Claudio Teloken**

**(Coordenador)**