

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

Paulo Guilherme Markus Lopes

**Desenvolvimento de ensaios de PCR em
tempo real para identificação de quatro
subespécies do complexo *Streptococcus
bovis/Streptococcus equinus* a partir de
swab retal**

Porto Alegre

2013

Paulo Guilherme Markus Lopes



Porto Alegre

2013

L864d Lopes, Paulo Guilherme Markus

Desenvolvimento de ensaios de PCR em tempo real para identificação de quatro subespécies do complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* a partir de swab retal / Paulo Guilherme Markus Lopes. -- 2013.

113 f. : il., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013.

Orientador: Prof. Pedro d'Azevedo

Co-orientador: Prof. Vlademir Cantarelli

1. Complexo *Streptococcus bovis* /*Streptococcus equinus*. 2. PCR em tempo real.
3. Neoplasias colorretais. 4. Gastroenteropatias. I. Título.

CDD 616.92

CDU 616.981.2

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Paulo Guilherme Markus Lopes. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço eletrônico: paulol@ufcspa.edu.br

AGRADECIMENTOS

A Deus, a família, aos amigos, porque representam a essência de tudo que realmente importa e agrega valor inestimável às nossas vidas.

Ao orientador, prof. Pedro d'Azevedo, pela oportunidade e apoio.

Ao co-orientador, prof. Vlademir Cantarelli, pelas eficientes e proveitosas orientações e ideias no desenvolvimento dos ensaios.

A minha colega e amiga Grasiela Agnes, pelo auxílio constante na execução das análises e LONGAS discussões sobre os resultados.

Ao prof. Angelo Mattos, pela autorização e a todos auxiliares de enfermagem, enfermeiros e médicos do Serviço de Endoscopia do Hospital Santa Clara pela pronta disponibilidade em auxiliar nas coletas de amostras clínicas, especialmente a médica Ane Costabeber pela ajuda nas avaliações dos prontuários clínicos.

A prof^a. Claudia Rhoden e a todos os outros amigos do Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica, local onde estou há quase cinco anos e considero como minha "família" na UFCSPA.

A prof^a. Helena Barros, por ser uma grande incentivadora para meu ingresso no curso de doutorado do PPG de Ciências da Saúde, e a todos os amigos e colegas da farmacologia, especialmente o Maurício Nin pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao prof. Cícero Dias e aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia, pelo apoio, amizade e a descontraída parceria de todos.

A prof^a Lucia Teixeira e ao INCQS/Fiocruz, pela doação de cepas utilizadas como referência neste estudo.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro autorizado para o estudo.

DEDICATÓRIA

A minha família,

Pelo amor, o respeito e amizade que nos une.

Pelo apoio constante e incondicional em perseverar.

Pelos valiosos ensinamentos, de que a vida deve ser pautada pela fé, firmeza de caráter, amizade, honestidade e solidariedade.

Por ser meu esteio e minha referência para valores fundamentais, os quais me amparam e me fortalecem nos meandros desta efêmera existência.

“Não tenho medo da morte, tenho medo da desonra”

José Alencar Gomes da Silva

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
I. INTRODUÇÃO	13
I.1 Complexo <i>Streptococcus bovis</i> / <i>Streptococcus equinus</i>	13
I.1.1 <i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	16
I.1.2 <i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	17
I.1.3 <i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	18
I.1.4 <i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>coli</i>	19
I.2 Câncer colorretal e outras patologias gastrintestinais associadas ao complexo <i>Streptococcus bovis</i> / <i>Streptococcus equinus</i>	20
I.3 Endocardite infecciosa associada ao complexo <i>Streptococcus bovis</i> / <i>Streptococcus equinus</i>	28
I.4 Outras condições clínicas associadas à infecção pelo complexo <i>Streptococcus bovis</i> / <i>Streptococcus equinus</i>	32
I.5 Técnicas moleculares utilizadas na identificação e quantificação do complexo <i>Streptococcus bovis</i> / <i>Streptococcus equinus</i>	34
II. JUSTIFICATIVA	39
III. OBJETIVOS	40
III.1 Objetivo Geral.....	40
III.2 Objetivos Específicos.....	40
IV. ARTIGO 1 - Development of a TaqMan [®] -MGB real-time PCR assay for detection and quantification of <i>Streptococcus gallolyticus</i> sp. by targeting the <i>recN</i> gene	41
V. ARTIGO 2 - Novel TaqMan [®] -MGB real-time PCR assays for the identification of <i>Streptococcus bovis</i> / <i>Streptococcus equinus</i> complex from rectal swab specimens based on the <i>recN</i> and <i>gyrB</i> genes	53

VI. DISCUSSÃO GERAL.....	75
VII. CONCLUSÕES.....	82
VIII. PERSPECTIVAS	83
IX. REFERÊNCIAS	84
X. ANEXOS.....	93
ANEXO A. Apresentações de trabalhos em Congressos Internacionais	
ANEXO B. Regras para submissão: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz	
ANEXO C. Regras para submissão: <i>Journal of Clinical Microbiology</i>	
ANEXO D. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - UFCSPA	
ANEXO E. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de uma reação de PCR em tempo real com sonda de hidrólise TaqMan®	36
Figura 2 – Alignment of the <i>recN</i> partial gene DNA sequence retrieved from GenBank database.....	49
Figura 3 – Quantification of <i>S. gallolyticus</i> sp. in swab specimens.....	50
Figura 4 – Alignment of partial sequences of the <i>recN</i> and <i>gyrB</i> genes retrieved from GenBank database.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características fenotípicas de <i>S. bovis</i> biotipo I, <i>S. bovis</i> biotipo II/1 e <i>S. bovis</i> biotipo II/2.....	14
Tabela 2 - Reference strains and clinical isolates used as controls for real-time PCR assays development targeting the <i>recN</i> and <i>gyrB</i> genes.....	70
Tabela 3 - Primers and probes sets.....	71
Tabela 4 - Clinical characteristics described in SBEC-colonized individuals subjected to a colonoscopy and <i>S. gallolyticus</i> sp. bacterial load.....	72
Tabela 5 - Clinical characteristics described in <i>S. infantarius</i> sp.-colonized individuals subjected to a colonoscopy.....	73

RESUMO

O complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* (*SBEC*) abrange espécies patogênicas relacionadas em diferentes níveis com infecções em humanos. Este complexo de genoespécies tem sido associado a desordens hepatobiliares e mais notavelmente em adenomas de cólon e câncer colorretal (CCR). Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver ensaios de PCR em tempo real (*qPCR*), utilizando o sistema TaqMan[®]-MGB e baseado nos genes *recN* e *gyrB*, para detecção de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. infantarius* subsp. *coli* e *S. infantarius* subsp. *infantarius*, e quantificação de *S. gallolyticus* sp. a partir de amostras de *swab* retal de voluntários sob risco para doenças gastrintestinais. Estes ensaios foram testados em cinco isolados clínicos e 14 cepas referência de *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp. e *Escherichia coli*. Os cinco isolados clínicos e quatro cepas referência foram corretamente identificadas, nenhum falso-positivo foi observado entre as cepas de *Streptococcus* sp. filogeneticamente relacionadas, igualmente para as outras espécies testadas. O ensaio quantitativo pode detectar valores acima de 30 cópias genômicas bacterianas. Foram incluídos no estudo 54 (H=19, média etária 64,6, entre 46-76 e M=35, média etária 57,9, entre 44-80, P=0,015) voluntários ambulatoriais e não colostomizados submetidos à colonoscopia. A prevalência geral das subespécies do *SBEC* esteve em 35,2%: *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (11,1%), *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (13%), *S. infantarius* subsp. *coli* (20,4%) e *S. infantarius* subsp. *infantarius* (11,1%). Nosso estudo demonstrou associações entre doença hemorroidária (P=0,047) e litíase biliar (P=0,023) com colonização por ao menos uma subespécie do *SBEC*. Litíase biliar também esteve relacionada com colonização por *S. infantarius* subsp. *coli* (P=0,021) e doença hepática crônica com colonização *S. infantarius* subsp. *infantarius* (P=0,002). Estes ensaios de *qPCR* estabelecem condições para detecção molecular das subespécies do *SBEC* bem como quantificar *S. gallolyticus* sp. a partir de amostras coletadas por *swab* retal e podem ser utilizados para triagem e vigilância em pacientes submetidos à colonoscopia.

Palavras-chave: complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*, PCR em tempo real, câncer colorretal, doenças gastrintestinais

ABSTRACT

Streptococcus bovis/*Streptococcus equinus* complex (SBEC) comprises pathogenic species related to different degrees with human infections. This genospecies complex has been associated with hepatobiliary disorders and most notably in colonic adenomas and colorectal cancer (CRC). Therefore, our aim was to develop a useful TaqMan[®]-MGB real-time PCR (qPCR) assays based on *recN* and *gyrB* genes to detect *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. infantarius* subsp. *coli* and *S. infantarius* subsp. *infantarius* and quantify *S. gallolyticus* sp. from rectal swab specimens in individuals at risk for gastrointestinal disorders. These assays were tested in five clinical isolates and 14 reference strains of *streptococci*, *enterococci* and *Escherichia coli*. Five clinical isolates and four reference strains were correctly identified and no false-positive amplification reactions were observed in closely Streptococci species, *Enterococcus* sp. and *Escherichia coli*. The quantitative assay was able to detect > 30 copy number (CN). Rectal swab specimens from 54 outpatient and no colostomized subjects (M=19, mean age 64.6, range 46-76 and F=35, mean age 57.9, range 44-80, P=0.015) who underwent a routine colonoscopy were included in this cross-sectional study. The overall prevalence of any SBEC subspecies was 35.2%: *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* were detected in 11.1% and in 13% of subjects, respectively; *S. infantarius* subsp. *coli* and *S. infantarius* subsp. *infantarius* had positive results in 20.4% and 11.1% of subjects, respectively. Our study showed associations between hemorrhoidal disease (P=0.047) and biliary lithiasis (P=0.023) with SBEC subspecies colonization. Biliary lithiasis was also related with *S. infantarius* subsp. *coli*-colonized (P=0.021) and chronic liver disease with *S. infantarius* subsp. *infantarius*-colonized (P=0.002) subjects. To conclude, qPCR assays provide a reliable molecular method to detect SBEC subspecies and quantify *S. gallolyticus* sp. from rectal swab specimens. Together, these might be useful tool for bacteria screening and colonization-surveillance in individuals subjected to a routine colonoscopy.

Keywords: *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex, real-time PCR, colorectal cancer, gastrointestinal diseases

I. INTRODUÇÃO

I.1 Complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*

Streptococcus bovis está descrita no grupo dos cocos gram positivos, anaeróbios facultativos e pertencentes ao grupo D de Lancefield. É constituinte da microbiota normal do intestino humano e pode ser isolada em 5-16% das amostras fecais de adultos saudáveis (NOBLE, 1978; FARROW et al., 1983). Pode atuar como agente etiológico em infecções ou estar relacionada com diferentes condições clínicas tais como bacteremia, endocardite infecciosa (EI) (DUVAL et al., 2001; HERRERO et al., 2002), câncer colorretal (CCR) (GUPTA et al., 2010; BOLEIJ et al., 2011b; GARCIA-PAIS et al., 2012), doença hepática (GONZLEZ-QUINTELA et al., 2001; TRIPODI et al., 2004), sepse neonatal (GAVIN et al., 2003), meningite neonatal (ONOHAMA et al., 2009) e meningite no adulto (STURT et al., 2010). A relação entre *S. bovis* e CCR é notadamente reconhecida e evidenciada embora ainda existam muitas lacunas para uma elucidação conclusiva (BURNETT-HARTMAN et al., 2008).

Nos últimos anos, o aperfeiçoamento das técnicas utilizadas para detecção de patógenos e para avaliar as variações da resposta imune do hospedeiro tem propiciado um número crescente de estudos que avaliam as relações de interação entre *S. bovis* e o hospedeiro humano (BIARC et al., 2004; TJALSMA et al., 2006; ABDULAMIR et al., 2010; BOLEIJ et al., 2010; ABDULAMIR et al., 2011; GARZA-GONZALEZ et al., 2012). A microbiota intestinal tem sido implicada na etiologia da carcinogênese colorretal, embora nenhum estudo tenha evidenciado de forma definitiva quais bactérias ou quais mecanismos estariam envolvidos na promoção tumoral (COLLINS et al., 2011). Recentemente, um estudo investigou a disbiose encontrada na mucosa intestinal, entre tecidos tumorais e não tumorais de pacientes com CCR. Os autores puderam evidenciar uma notável variação entre a colonização microbiana associada ao tumor em relação aos tecidos da mucosa adjacente (MARCHESI et al., 2011).

Os critérios fenotípicos baseados em provas bioquímicas ainda são amplamente empregados para identificação bacteriana. Diversas provas bioquímicas

podem ser realizadas na identificação das diferentes espécies que compõem o gênero *Streptococcus* tais como produção ácida a partir da fermentação de manitol e presença da β -glicuronidase (Tabela 1) (CORREDOIRA et al., 2005). Classicamente a identificação fenotípica de *S. bovis* é definida por biotipos da seguinte forma: biotipo I (fermentação do manitol positiva), biotipo II/1 (fermentação de manitol negativa; β -glicuronidase negativa) e o biotipo II/2 (fermentação do manitol negativa; β -glicuronidase positiva) (SCHLEGEL et al., 2004).

Tabela 1: Características fenotípicas de *S. bovis* biotipo I, *S. bovis* biotipo II/1 e *S. bovis* biotipo II/2

Característica	Reação obtida		
	<i>S. bovis</i> biotipo I	<i>S. bovis</i> biotipo II/1	<i>S. bovis</i> biotipo II/2
Grupo D de Lancefield	+	+	+
Bile esculina	+	v	+
Arginina di-hidrolase	-	-	-
Acetoína (Voges-Proskauer)	+	+	+
Hidrólise da ureia	-	-	-
Acidificação de:			
Manitol	+	-	-
Lactose	+	+	+
Rafinose	+	+	v
Sorbitol	-	-	-
Amido	+	v	v
Trealose	+	v	+
Glicogênio	+	v	-
Produção de:			
β -Galactosidase	-	v	+
α -Galactosidase	v	+	v
β -Glicuronidase	-	-	+

No início da década de 1980, consolidava-se a hipótese de que a espécie denominada *S. bovis* na verdade era um grupo de genoespécies (FARROW et al., 1983). Durante a década de 1990, *S. bovis* biotipo I foi reclassificada como pertencendo à espécie *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* e o biotipo II/2 como *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. Da mesma maneira que *S. bovis* biotipo II/1 deveria ser classificado como *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* e *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* (SCHLEGEL et al., 2000; SCHLEGEL et al., 2003).

Estudos anteriores envolvendo análises genômicas que incluíram hibridização de sondas DNA-DNA, eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE*), amplificação e sequenciamento dos genes *sodA* e 16S rRNA deram suporte para descrição de novas espécies e subespécies. Isto tem contribuído sobremaneira para a dinâmica taxonômica relacionada com as espécies e subespécies descritas no complexo *S. bovis/S. equinus* (*S.bovis/S.equinus complex – SBEC*) (POYART et al., 2002; SCHLEGEL et al., 2003; BECK et al., 2008).

Recentemente, a técnica de espectroscopia de massas denominada *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization / Time Of Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS)* e o sequenciamento do gene *sodA* puderam discriminar todas as espécies e subespécies relacionadas ao *SBEC* (HINSE et al., 2011).

Considerando aspectos clínicos e epidemiológicos são quatro as subespécies do *SBEC* que apresentam maior relevância: *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* e *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* (LAZAROVITCH et al., 2012).

A simples classificação em *S. bovis* nos estudos citados neste trabalho deve ser considerada como a ausência de uma correta identificação, por métodos fenotípicos ou moleculares, em biotipos ou subespécies.

I.1.1 *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Uma característica fenotípica importante relacionada ao *S. bovis* biotipo I está na sua capacidade em degradar complexos formados por tanino e proteína através da produção de uma enzima denominada tanase. Verificou-se que este biotipo era capaz de promover a hidrólise de ácido gálico, o que culminou numa proposta para sua reclassificação como uma nova espécie denominada *Streptococcus gallolyticus* sp. nov. (OSAWA *et al.*, 1995). Posteriormente, a espécie *S. gallolyticus* foi dividida em três subespécies e *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* foi relacionada com *S. bovis* biotipo I. Esta subespécie expressa atividade da enzima tanase, que produz descarboxilação do ácido gálico a pirogalol. A maioria dos isolados é capaz de fermentar manitol, trealose, inulina, amido e glicogênio. Pode ser isolada em fezes de marsupiais, mamíferos (incluindo ruminantes) e estar associada à mastite bovina. Em humanos, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* pode ser isolada em amostras de sangue e fezes (SCHLEGEL *et al.*, 2003).

Considerando a rotina de diagnósticos em microbiologia clínica identifica-se fenotipicamente a espécie *S. gallolyticus* e sugere-se a subespécie *gallolyticus* através de métodos comerciais como API 20 Strep e VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) (GOMEZ-GARCES *et al.*, 2012; LAZAROVITCH *et al.*, 2012). Técnicas moleculares, especialmente o sequenciamento do gene 16S rRNA, são mandatórias para a confirmação da subespécie *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bem como das demais subespécies do grupo *S. bovis* (BECK *et al.*, 2008).

As associações entre CCR e EI com infecção por *S. bovis* foi efetivamente relatada há mais de três décadas (KLEIN *et al.*, 1977). A maior parte dos estudos sugerem *S. bovis* biotipo I (*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*) como a mais prevalente subespécie do SBEC isolada entre os casos de bacteremia/EI em pacientes com CCR ou pólipos adenomatosos (BOLEIJ *et al.*, 2009; ABDULAMIR *et al.*, 2010; BOLEIJ *et al.*, 2010; BOLEIJ *et al.*, 2011b; CORREDOIRA-SANCHEZ *et al.*, 2012; GARZA-GONZALEZ *et al.*, 2012)

I.1.2 *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*

Consequente a proposição de uma nova espécie, todos os isolados humanos de *S. bovis* biotipo I e biotipo II/2 foram sugeridos como pertencendo à espécie *S. gallolyticus* (FACKLAM, 2002). Então, um novo estudo sugeriu que *S. bovis* biotipo II/2 não pertenceria à espécie *S. gallolyticus* e os autores propuseram uma nova espécie denominada *Streptococcus pasteurianus* (POYART et al., 2002). No ano seguinte, outro estudo envolvendo um número maior de isolados e que utilizou hibridização de DNA-DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA pode descrever uma análise filogenética mais acurada. Conforme estes autores, a espécie anteriormente descrita, *S. pasteurianus*, deveria ser considerada como uma subespécie de *S. gallolyticus* e propuseram a reclassificação para *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. Esta subespécie produz β -glicosidase, β -glicuronidase, β -manosidase, β -galactosidase e β -D-glicopiranosidase. Não possui capacidade fermentativa na presença de inulina, manitol e glicogênio e, embora não produza tanase, algumas cepas apresentam atividade na descarboxilação do ácido gálico. Pode ser isolada em amostras de sangue de pacientes com bacteremia/EI e alguns isolados podem ser provenientes de amostras de urina e infecções supurativas (SCHLEGEL et al., 2003).

Assim como para *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, a identificação de *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* pode ser sugerida através de técnicas fenotípicas e confirmada por métodos moleculares (LAZAROVITCH et al., 2012).

Alguns relatos de caso tem descrito *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* como agente etiológico de meningite em neonatos (CHEUNG et al., 2000; GAVIN et al., 2003; ONOYAMA et al., 2009; FLORET et al., 2010; KLATTE et al., 2012). Recentemente, um estudo retrospectivo evidenciou que entre os pacientes com bacteremia causada por *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* a maioria apresentava patologias hepatobiliares. O mesmo estudo apresenta esta subespécie como a mais prevalente entre os isolados analisados, 24 (54,5%) isolamentos de *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, 15 (34,1%) de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* e 5 (11,3%) de *S. infantarius* sp. (GOMEZ-GARCES et al., 2012).

I.1.3 *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*

BOUVET *et al.* (1997) analisaram perfis na hibridização de sondas DNA-DNA e provas bioquímicas (hidrólise de esculina negativa) e sugeriram que cepas associadas a *S. bovis* biotipo II/1 corresponderiam a uma espécie denominada *Streptococcus infantarius*. Um estudo posterior confirmou através de análise fenotípica e genotípica (ribotipagem, hibridização DNA-DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA) a sugestão da espécie *S. infantarius* e ainda delineou duas subespécies para esta espécie: *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* e *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*. As cepas de *S. infantarius* subsp. *infantarius* não hidrolisam esculina e são β -glicosidase e metil- β -D-glicopiranosidase negativas. São capazes de produzir ácido na presença de glicogênio, amido e rafinose. Podem ser isoladas em amostras de sangue e fezes humanas assim como de laticínios (SCHLEGEL *et al.*, 2000).

A identificação fenotípica desta subespécie pode ser sugerida através de provas bioquímicas (CORREDOIRA *et al.*, 2008b) e confirmada por métodos moleculares (ABDELGADIR *et al.*, 2008). Esta subespécie representa a menor prevalência de isolamentos a partir de infecções humanas entre as quatro subespécies do SBEC consideradas patogênicas em humanos (BECK *et al.*, 2008; GOMEZ-GARCES *et al.*, 2012; LAZAROVITCH *et al.*, 2012).

S. infantarius subsp. *infantarius* parece desempenhar um papel importante nos processos de fermentação, principalmente de derivados lácteos produzidos e consumidos no continente africano, podendo ser encontrada em concentrações superiores a 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC/mL) nestes alimentos, quando já estão prontos para o consumo. Portanto, os autores sugerem que a ingestão de tais concentrações de células bacterianas viáveis poderia representar um potencial risco para a saúde humana e isto deveria ser investigado (ABDELGADIR *et al.*, 2008; JANS *et al.*, 2012).

I.1.4 *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*

SCHLEGEL *et al.* (2000) descreveram *S. infantarius* subsp. *coli* como outra subespécie que estaria associada à identificação clássica definida por *S. bovis* biotipo II/1. Conforme descrição dos autores esta subespécie produz β -glicosidase, hidrolisa esculina e não produz ácido na presença de glicogênio, amido e melibiose. Pode ser isolada em amostras de sangue, fezes e urina humanas.

Dois anos mais tarde, outro estudo propôs a reclassificação *S. infantarius* subsp. *coli* para uma nova espécie denominada *Streptococcus lutetiensis*. Os autores consideraram principalmente o sequenciamento do gene *sodA* para análise filogenética e referiram as mesmas características fenotípicas anteriormente descritas (POYART *et al.*, 2002). SCHLEGEL *et al.* (2003) contestaram a nova reclassificação afirmando que a descrição anterior de *S. infantarius* subsp. *coli* incluía as cepas propostas como *S. lutetiensis*. Logo, os autores propuseram que fosse mantida a classificação de *S. infantarius* subsp. *coli*.

Assim como para as demais subespécies referidas anteriormente, a identificação fenotípica pode ser sugerida através de provas bioquímicas e a confirmação obtida através de métodos moleculares (BECK *et al.*, 2008).

S. infantarius subsp. *coli* tem sido relatada como a subespécie mais prevalente em infecções humanas quando consideramos a denominação clássica de *S. bovis* biotipo II/1 (ROMERO *et al.*, 2011).

CORREDOIRA *et al.* (2005) referiram que em 50% das bacteremias causadas por *S. bovis* biotipo II os pacientes apresentavam patologias hepatobiliares. Esta identificação não permite inferir sobre qual das subespécies (*S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. infantarius* subsp. *coli* ou *S. infantarius* subsp. *infantarius*) poderia estar associada de forma significativa.

Recentemente, um estudo descreveu *S. infantarius* subsp. *coli* como um importante agente etiológico em bacteremia/EI de lontras marinhas na costa do Alasca. Os autores referem que esta bactéria foi responsável por aproximadamente 30% das mortes entre 613 carcaças coletadas e necropsiadas no período 2004 a 2010 (COUNIHAN-EDGAR *et al.*, 2012).

I.2 Câncer colorretal e outras patologias gastrintestinais associadas ao complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*

A incidência de CCR varia amplamente entre os países e regiões. Nos países desenvolvidos este tipo de câncer representa um sério problema de saúde pública, sendo descrito como o segundo tipo de câncer mais comum em homens e mulheres nos Estados Unidos e Inglaterra (HEWITSON *et al.*, 2008).

Notoriamente, apenas 5-10% de todos os casos de câncer são causados exclusivamente por alterações genéticas e 90-95% devido a fatores relacionados ao estilo de vida (tabagismo, tipo de dieta, alcoolismo, sedentarismo, obesidade e exposição ao sol), infecções e poluentes ambientais. Estes fatores permitem efetivas intervenções quando considerados os aspectos preventivos desta enfermidade. O tipo de dieta é um aspecto muito relevante para a prevenção do CCR, visto que um consumo diário de 160g de carne vermelha e/ou processada estaria relacionado a um risco aumentado em 35% para CCR quando comparado com um consumo menor do que 20g ao dia (GONZALEZ & RIBOLI, 2010).

No Brasil, os tumores de cólon e reto estão entre as cinco localizações anatômicas mais importantes em termos de mortalidade, para ambos os sexos. As maiores taxas de mortalidade para CCR foram observadas nas regiões sul e sudeste, variando entre 8,0 e 10,7/100.000 habitantes. Porto Alegre (11,9/100 mil), São Paulo (10,8/100 mil) e Rio de Janeiro (9,6/100 mil) apresentaram as taxas de maior magnitude no período estudado. Na região sul, Porto Alegre e Florianópolis apresentaram uma tendência crescente de mortalidade por essa neoplasia, com o mesmo comportamento observado nas cidades de São Paulo e Vitória, na região sudeste (DAS NEVES *et al.*, 2005).

Recentemente, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) divulgou a estimativa de incidência do câncer no Brasil para o ano de 2012. De acordo com a estimativa são previstos 30.140 novos casos de CCR, 14.180 casos em homens e 15.960 em mulheres. Este tipo de câncer é o segundo mais frequente em homens na região sudeste (22/100 mil) e o terceiro na região sul (18/100 mil); em mulheres, é o segundo nas regiões sudeste (23/100 mil) e sul (20/100 mil). As capitais da região sudeste apresentam estimativa de 33,85/100 mil novos casos masculinos e

35,86/100 mil novos casos femininos para CCR. Na região sul, as capitais apresentam estimativa de 28,11/100 mil novos casos entre homens e 30,55/100 mil novos casos entre mulheres (INCA, 2011).

O trato gastrintestinal humano contém cerca de 10^{14} bactérias e 10^3 espécies que são essenciais na digestão dos alimentos e homeostase do epitélio intestinal. A relação entre bactérias da microbiota intestinal com o seu hospedeiro pode alternar desde situações comensais até patogênicas dependendo de certas variações fisiológicas envolvidas na dinâmica do processo (HOOPER & GORDON, 2001). Notadamente, o papel da microbiota em desencadear e influenciar na cronicidade do processo inflamatório intestinal e na história natural da Doença de Crohn está estabelecido (LI *et al.*, 2012). Um amplo e crescente número de evidências sustenta a relação entre agentes infecciosos e o câncer sugerindo que certas bactérias associadas à mucosa intestinal desempenham papel importante na patogênese do CCR (COLLINS *et al.*, 2011; MARCHESI *et al.*, 2011).

Infecções bacterianas têm sido associadas ao desenvolvimento de câncer através de dois mecanismos principais: indução de inflamação crônica e produção de metabólitos carcinogênicos (PARSONNET *et al.*, 1991). A grande diversidade da microbiota intestinal reflete uma ampla e variada capacidade metabólica, particularmente em relação à biotransformação de xenobióticos que resultam na síntese e ativação de carcinógenos com inúmeras implicações sobre a saúde do hospedeiro. Tais atividades metabólicas incluem numerosas reações enzimáticas para degradação de resíduos dietéticos não digeridos (ROWLAND, 2009).

A melhor evidencia disponível sobre a relação causal entre infecção bacteriana e câncer está na detecção de *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica, caracterizando o aumento do risco para neoplasias malignas de estômago (PARSONNET *et al.*, 1991). Há quase duas décadas *H. pylori* é reconhecido como um carcinógeno de classe I para adenocarcinoma gástrico pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*) (WHO, 1994). Os mecanismos pelos quais a bactéria contribui para o desenvolvimento do câncer são complexos e envolvem consequências da resposta inflamatória crônica assim como efeitos diretos da interação bactéria/hospedeiro sobre os mecanismos de reparo do DNA na célula eucariótica, produzindo quebras

de DNA e instabilidade genética (VOGELMANN & AMIEVA, 2007; TOLLER *et al.*, 2011).

Apesar de MC and MASON (1951) sugerirem ainda na década de 50 a associação entre CCR e a presença de EI por *S. bovis*, somente 20 anos mais tarde que esta relação foi definitivamente reconhecida (KEUSCH, 1974). Posteriormente, esta associação ficou evidenciada através do isolamento deste agente em hemocultura. A colonização intestinal por *S. bovis* foi relacionada positivamente com CCR (56%) quando comparado com indivíduos saudáveis (11%) (KLEIN *et al.*, 1977).

Recentemente, um estudo verificou uma associação positiva da colonização intestinal por *S. bovis* entre pacientes com diferentes tipos de neoplasias malignas do trato gastrointestinal (estômago, pâncreas, fígado, cólon e reto) e pacientes com doenças gastrointestinais não malignas (Doença de Crohn e doenças hepatobiliares) quando comparados com voluntários saudáveis (SHANAN *et al.*, 2011). Entretanto, os resultados de POTTER *et al.* (1998) não evidenciaram relevância estatística para esta associação, visto que foram encontrados apenas 11% dos pacientes com CCR e colonizados por *S. bovis* enquanto o grupo controle apresentou 13% dos voluntários colonizados. Contudo, parece relevante observar que as possíveis relações com a composição da microbiota intestinal, lesões da mucosa e a disseminação hematogênica de *S. bovis* não devem ser consideradas como uma ocorrência isolada sem qualquer significado (ALAZMI *et al.*, 2006).

Frequentemente, o diagnóstico de bacteremias por *S. bovis* tem sido associado com CCR e outras patologias gastrointestinais, com estudos demonstrando que 25 a 80% dos pacientes com bacteremia por *S. bovis* apresentam adenomas ou adenocarcinomas colorretais (BIARC *et al.*, 2004). Basicamente, duas hipóteses conceituais são propostas para explicar a relação entre colonização/infecção por *S. bovis* e o CCR (ABDULAMIR *et al.*, 2011).

A primeira hipótese investiga sobre uma ação direta da bactéria no epitélio do cólon promovendo desta forma alterações nas células do hospedeiro. ABDULAMIR *et al.* (2010) relataram aumento de citocinas pró-inflamatórias IL-1 e COX-2 bem como da quimiocina angiogênica IL-8 em amostras de tecidos do cólon comprovadamente colonizados por *S. bovis*. Estas citocinas e quimiocinas

proporcionariam condições para transformação de tecidos normais ou tecidos neoplásicos pré-malignos (pólipos e epitélio adenomatoso) em tecidos neoplásicos malignos. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* reconhecidamente produz tanase através da expressão de dois genes: SGGB_0917 (extracelular) e SGGB_1624 (citoplasmática). A expressão do gene que codifica para produção de tanase extracelular está no grupo de 10% dos genes mais expressos pela bactéria (LIN, I. H. *et al.*, 2011). A colonização intestinal por bactérias produtoras da enzima tanase, especialmente *Staphylococcus lugdunensis*, tem sido relacionada com CCR em humanos (NOGUCHI *et al.*, 2007). A produção de tanase resulta em compostos polifenólicos que podem formar complexos bastante estáveis com proteínas e outras macromoléculas orgânicas (RUSNIOK *et al.*, 2010).

A segunda hipótese sugere que *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* tem sua aderência facilitada ao epitélio adenomatoso em decorrência da interação entre polissacarídeos capsulares e proteínas de superfície bacteriana (*Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules – MSCRAMM*) com as proteínas da matriz extracelular (*Extracellular Matrix – ECM*) de células pré-malignas ou malignas (SILLANPAA *et al.*, 2009). As células do tecido adenomatoso expressam maiores quantidades de colágeno tipo IV, favorecendo a adesão e formação de biofilme por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nestes locais. Esta eficiente colonização favoreceria a translocação celular e por consequência o acesso à circulação sistêmica, consolidando desta forma um processo de bacteremia (BOLEIJ *et al.*, 2011a). Recentemente, BOLEIJ *et al.* (2012a) demonstraram que *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* teve seu crescimento favorecido em cultura de células de adenocarcinoma (HT-29, SW480, HCT116 e Caco-2) quando este foi comparado com outras espécies bacterianas.

ELLMERICH *et al.* (2000) desenvolveram um modelo animal para determinar os efeitos de *S. bovis* e seus antígenos extraídos da parede celular bacteriana sobre mucosa intestinal de ratos que apresentavam alterações neoplásicas pré-malignas produzidas pela administração de azoximetano. Concluíram que a presença do *S. bovis* e as proteínas da parede celular bacteriana podem atuar como promotores da carcinogênese na mucosa intestinal em modelo animal quimicamente induzido.

Uma revisão de 23 estudos envolvendo 202 pacientes com bacteremia por *S. bovis* evidenciou que em 98 (48,5%) dos pacientes pôde ser detectada alguma disfunção gastrointestinal: 19,8% com CCR; 16,8% com pólipos adenomatosos e 12% com disfunções não especificadas (BEEBE & KONEMAN, 1995). Outros autores relataram que entre 21 pacientes com bacteremia por *S. bovis*, submetidos à endoscopia digestiva alta (EDA) e colonoscopia, 45% pacientes apresentavam algum tipo de lesão, como úlceras gástricas, câncer gástrico, úlceras duodenais, CCR, pólipos adenomatosos de cólon, lesões inflamatórias na mucosa intestinal, diverticulose, angiodisplasia e cirrose hepática (KUPFERWASSER *et al.*, 1998).

Um estudo tipo caso-controle investigou a associação entre colonização por *S. bovis* e CCR através da análise de 166 amostras fecais de adultos. Os autores relatam que 24,7% das amostras foram positivas e que 46,3% dos pacientes colonizados foram identificados com pólipos colônicos ou CCR (AL-JASHAMY *et al.*, 2010). Outros pesquisadores também realizaram um estudo tipo caso-controle para avaliar a associação entre bacteremia por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* com CCR. Foram incluídos 109 casos de bacteremia, 98 pacientes foram avaliados por colonoscopia que resultou em 57 pacientes com adenomas de cólon (39 com displasia de alto grau) e 12 com CCR invasivo. Os autores demonstraram uma significativa associação entre CCR e EI por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* quando comparado ao grupo controle de pacientes sintomáticos, com risco para CRC e sem bacteremia por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (CORREDOIRA-SANCHEZ *et al.*, 2012).

Um relato de caso referiu diagnóstico de CCR avançado em paciente que foi submetido à cirurgia, cinco anos antes, para substituição de válvula aórtica em decorrência de EI severa por *S. bovis*. Este paciente foi submetido à colonoscopia, que revelou lesão maligna no cólon sigmóide confirmado por exame histopatológico como adenocarcinoma. Esta situação evidencia que a translocação de *S. bovis* através da mucosa do cólon é possível muito antes de qualquer sintomatologia para doença intestinal (FERRARI *et al.*, 2008).

Com o objetivo de investigar a contribuição da disfunção hepática em bacteremias do tipo portal e sistêmica, 92 pacientes com EI por *S. bovis* foram avaliados. Destes um total de 47% e 93% foram submetidos à avaliação colônica e

hepática, respectivamente, com 51% dos pacientes apresentando anormalidades na mucosa do cólon e 56% disfunções hepatobiliares (ZARKIN *et al.*, 1990).

Uma análise retrospectiva de 46 pacientes com hemoculturas positivas para *S. bovis* evidenciou que 41% pacientes apresentavam doenças gastrintestinais como doença hepática crônica, CCR, diverticulose, gastrenterite e hiperbilirrubinemia neonatal (ALAZMI *et al.*, 2006).

Um estudo investigou o perfil da resposta humoral de pacientes com CCR e pólipos intestinais contra *S. bovis* utilizando método de imunocaptura e espectroscopia de massas. Os autores evidenciaram perfis antigênicos distintos em 11 dos 12 pacientes com câncer quando comparados com oito doadores de sangue assintomáticos definidos como grupo controle (TJALSMA *et al.*, 2006).

ABDULAMIR *et al.* (2009) puderam evidenciar que pacientes com adenocarcinoma e adenomas colorretal apresentavam níveis mais elevados de anticorpos IgG contra *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* quando comparados com um grupo controle de voluntários saudáveis. Os níveis expressos de IL-8 em amostras de tecidos normal e tumoral também foram mais elevados nos indivíduos com sorologia positiva.

Outros pesquisadores desenvolveram um ensaio imunológico quantitativo para determinar os níveis de IgG sérica produzida contra uma proteína ribossomal de *S. bovis* denominada Rpl7/L12. Um total de 321 amostras séricas foi incluído na análise que determinou níveis de IgG anti-Rpl7/L12 significativamente mais altos em pacientes com pólipos colônicos e CCR em estágios iniciais quando comparados com voluntários saudáveis (BOLEIJ *et al.*, 2010). Posteriormente, estes pesquisadores aperfeiçoaram o ensaio imunológico que foi desenvolvido com quatro proteínas específicas da parede celular de *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* e puderam obter entre 16% a 43% de sensibilidade para detecção de CCR em estágio inicial, dependendo do grupo amostral analisado (BOLEIJ *et al.*, 2012b). GARZA-GONZALEZ *et al.* (2012) também verificaram a resposta humoral contra antígenos de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* em indivíduos submetidos à colonoscopia. Amostras séricas de 133 indivíduos com pólipos adenomatosos e de 53 indivíduos com exame normal foram avaliadas quando puderam confirmar a presença de duas proteínas no soro dos pacientes adenomatosos (22 kDa e 30 kDa)

e sugerir uma associação positiva entre indivíduos colonizados por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* e presença de adenomas do cólon.

FERNANDEZ-RUIZ *et al.* (2010) realizaram uma análise retrospectiva com 59 casos de bacteremia por *S. bovis* e analisaram diferentes critérios clínicos. Estes autores puderam verificar que entre os pacientes 33,9% apresentavam doença hepática crônica (23,7% teriam o trato biliar como origem da bacteremia), 27,1% EI e nove casos com neoplasias malignas, sendo seis CCR.

Um estudo retrospectivo avaliou 24 casos de bacteremia inicialmente identificada por *S. bovis*, analisou prontuários clínicos e identificou os isolados em nível de subespécie. Estes autores não puderam verificar uma associação significativa entre as quatro subespécies do complexo *S. bovis* identificadas com as diversas condições clínicas analisadas (LAZAROVITCH *et al.*, 2012). No entanto, GOMEZ-GARCES *et al.* (2012) também realizaram análise retrospectiva em 44 episódios de bacteremia identificadas previamente como *S. bovis* e que foram identificadas em nível de subespécie com prontuários clínicos revisados. Neste estudo os pesquisadores evidenciam associação significativa entre *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* com EI e patologias do cólon e *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* com alterações hepatobiliares.

Em uma coorte histórica foram avaliados 42 pacientes com bacteremia por *S. bovis* provenientes de diferentes hospitais. Os autores relataram que 28,6% dos pacientes apresentavam diagnóstico prévio para neoplasias malignas (colorretal e pancreática). A maior parte dos casos de CCR (75%) e pólipos colônicos (77,8%) foram diagnosticados após a internação pela bacteremia (MCKENNA *et al.*, 2011).

Numa revisão sistemática e metanálise realizada em 2011 os autores triaram 191 estudos, dos quais 52 relatos de caso e 31 séries de caso foram incluídos na revisão e 11 séries de caso foram selecionadas para a metanálise. Neste estudo ficou evidenciado que 60% dos pacientes com infecção por *S. bovis* apresentavam concomitantemente adenomas e CCR, o que é muito superior à prevalência reportada para a população geral assintomática. Outra inferência importante desta metanálise foi que a infecção por *S. bovis* biotipo I estaria relacionada com um risco relativo aumentado em mais de sete vezes para CCR e mais de 16 vezes para EI quando comparado com infecção por *S. bovis* biotipo II. Além disso, pôde ser

evidenciado que pacientes com EI por *S. bovis* teriam um risco relativo aumentado em quase quatro vezes para CCR em relação àqueles com infecção por este agente em outros sítios (BOLEIJ *et al.*, 2011b).

Recentemente, DEL CAMPO-MORENO (2012) atentou para o fato de que a maioria dos serviços e laboratórios de microbiologia clínica emitem laudos empregando a nomenclatura clássica de *S. bovis*, mesmo que os achados científicos mais recentes demonstrem a importância clínica em fornecer nos laudos uma correta identificação em nível de subespécie. O autor considerou que a ausência de técnicas moleculares, rápidas e acuradas, para uso na rotina dos laboratórios é um fator limitante para identificação de subespécies do *SBEC*, e que esta identificação poderia ser relevante para prevenção do CCR e outras patologias hepatobiliares.

I.3 Endocardite infecciosa associada ao complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*

EI é definida como um processo infeccioso localizado na superfície epitelial do endocárdio que pode envolver uma ou mais válvulas cardíacas. A EI é uma patologia importante com uma incidência variando entre 30 a 100 episódios por milhão de pacientes ao ano. A mortalidade ainda é alta, visto que mais de um terço dos pacientes morre no primeiro ano de diagnóstico (THUNY *et al.*, 2012). *Diabetes mellitus*, câncer do trato geniturinário e gastrintestinal são consideradas as principais comorbidades predisponentes para EI (DURANTE-MANGONI *et al.*, 2008).

Micro-organismos pertencentes ao gênero *Streptococcus* provenientes da microbiota oral são reconhecidos como os patógenos mais frequentes na EI. Entretanto, a incidência dos casos de EI causados por *Streptococcus* do grupo D tem aumentado significativamente, em até seis vezes no período de uma década, na Itália, Espanha e principalmente na França. Este aumento na frequência dos casos de EI causadas por *S. bovis* no sul/sudoeste da Europa tem sido investigado em relação a três possíveis causas: aumento dos casos de CCR, aumento nos percentuais de colonização intestinal ou algum fator ambiental e/ou nutricional ainda desconhecido (HOEN *et al.*, 2005). EI causadas por bactérias provenientes do trato gastrintestinal respondem por até 13% dos casos descritos (DAJANI *et al.*, 1991). Bacteremias causadas por *Streptococcus salivarius* e *S. bovis* biotipos I e II foram comparadas quanto ao significado clínico destes isolamentos, ficou demonstrado que a relevância clínica era significativa em 32% dos casos com *S. salivarius* e 97% com *S. bovis* (CORREDOIRA *et al.*, 2005).

O primeiro relato associando *S. bovis* e EI ocorreu há mais de 60 anos (MC & MASON, 1951). A partir do final da década de 70, houve aumento gradual do número de estudos que relataram casos de EI com isolamento de *S. bovis* como agente etiológico (KUPFERWASSER *et al.*, 1998). Logo, a associação entre bacteremia e EI causadas por este agente frequentemente estão relacionadas com patologias do trato gastrintestinal (WAISBERG *et al.*, 2002; ALAZMI *et al.*, 2006; VASKA & FAOAGALI, 2009).

Um estudo avaliou a capacidade de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aderir e invadir células endoteliais em modelo de cultura de células e analisou a presença de genes de virulência (*fimB*, *gtf* e *pilB*). Os pesquisadores descreveram que a maioria dos isolados testados foi capaz de aderir às proteínas da *ECM* das células endoteliais e invadi-las assim como todas as cepas apresentaram ao menos um dos genes de virulência investigados (VOLLMER *et al.*, 2010).

Um estudo envolvendo 177 pacientes com EI, no período de 13 anos, constatou que 12,4% dos casos envolviam infecção por *S. bovis*. Sobretudo observaram que estes pacientes apresentavam idade avançada (média de 67 anos), necessidade de intervenção cirúrgica (73%) e alta taxa de mortalidade (45%) (KUPFERWASSER *et al.*, 1998).

DUVAL *et al.* (2001) determinaram as características de EI por *S. bovis* em 20 pacientes e puderam verificar que apresentavam idade avançada, válvulas cardíacas presumidamente sem anormalidades, altas taxas de complicações neurológicas e baixa mortalidade nos anos iniciais de diagnóstico. Outro estudo analisou características clínicas e epidemiológicas em 199 casos de EI e relatou que 15,1% tinham infecção por *S. bovis*. Os autores demonstraram que os pacientes tinham idade mais avançada, altas taxas de envolvimento bivalvular, embolismo e discite quando comparados com os casos de EI causada por outros agentes. Revelaram que a maioria dos casos teve isolamento de *S. bovis* biotipo I e que isto pôde ser associado significativamente com doença hepática e adenoma de cólon (TRIPODI *et al.*, 2004).

Nos Estados Unidos, um estudo reavaliou 14 isolados de *S. bovis* em pacientes com EI e pôde identificar 11 isolados como *S. bovis* biotipo I (HERRERO *et al.*, 2002). Um estudo conduzido na Itália investigou características epidemiológicas de 25 isolados identificados como *S. bovis* e provenientes de bacteremias e EI com 72% destes obtidos nos últimos quatro anos do período analisado (1990 – 2003). Os autores identificaram que 20 isolados eram *S. bovis* biotipo I, predominantemente envolvidos com EI, e cinco eram *S. bovis* biotipo II, principalmente isolados de bacteremias sem diagnóstico para EI. Os resultados do estudo excluem a possibilidade da seleção de um clone epidêmico e sugerem uma seleção esporádica oriunda da microbiota intestinal (TRIPODI *et al.*, 2005).

Em 1999, pesquisadores franceses conduziram um estudo transversal prospectivo em diversas regiões do país e identificaram que 25% de 559 casos de EI eram causados pelo grupo *S. bovis*, provavelmente a mais alta prevalência já relatada. Verificaram uma maior frequência de casos nas regiões mistas (rural e urbana) do que aquelas estritamente urbanas e sugeriram que a alta prevalência encontrada na França poderia estar relacionada com hábitos alimentares como consumo de carne e leite crus, que poderia contribuir para um aumento de colonização intestinal pelo grupo *S. bovis* (GIANNITSIOTI et al., 2007).

Na Espanha, um abrangente estudo investigou 55 casos consecutivos de EI causada por *S. bovis* entre os períodos de 1988-1996 e 1997-2005. Os autores referem que 24% de todos os casos diagnosticados para EI foram acometidos por *S. bovis* (94,5% *S. bovis* biotipo I) caracterizado como principal agente etiológico de EI. No segundo período da pesquisa (1997-2005) houve um aumento de 358% no isolamento desta bactéria com associação ao diagnóstico de CCR em mais de 50 % dos casos. As bacteremias causadas por *S. bovis* estiveram relacionadas com EI em 51% dos casos enquanto aquelas causadas por *Streptococcus* do grupo viridans esta relação foi de apenas 13% (CORREDOIRA et al., 2008a). Anteriormente, um estudo envolvendo 45 pacientes com bacteremia causada por *S. bovis* pôde evidenciar que 27% apresentavam diagnóstico de EI (GOLD et al., 2004).

Uma ampla coorte multicêntrica envolvendo 2759 casos de EI, em diferentes países, avaliou o impacto da idade avançada sobre fatores epidemiológicos, etiológicos, terapêuticos e dos desfechos clínicos. A análise da prevalência de EI causada por *S. bovis* nos diferentes grupos etários demonstra significativo aumento em função da idade com uma prevalência geral de 5,9% (DURANTE-MANGONI et al., 2008).

Pesquisadores neozelandeses analisaram 12 casos de EI causada por *S. bovis* no período de 1997 a 2010. Surpreendentemente, constataram que apenas um dos isolados foi *S. bovis* biotipo I e que a maioria dos pacientes (58%) era proveniente de zonas rurais. Os autores referem que bacteremias por *S. bovis* estaria apresentando maiores frequências na Nova Zelândia e que as variações dos biotipos de *S. bovis* podem estar relacionadas a aspectos regionais, nacionais ou internacionais, e temporais o que sustentaria a relevância de investigações epidemiológicas em diferentes locais (COFFEY et al., 2012).

Uma investigação sobre o perfil microbiológico, clínico e epidemiológico em 390 casos EI na Argentina inferiu sobre um aumento na incidência de infecções por *Staphylococcus sp.* e demonstrou uma prevalência de 5,2% para EI causadas por *S. bovis* (FERREIROS *et al.*, 2006). No Brasil, na cidade de Ribeirão Preto no estado de São Paulo, um estudo epidemiológico sobre EI realizou hemocultura em 148 casos e o isolamento descrito como *Streptococcus* do grupo *D/Enterococcus sp.* foi verificado em apenas 4,7% das hemoculturas positivas (RUIZ JUNIOR *et al.*, 2000).

BECK *et al.* (2008) analisaram sistematicamente hemoculturas positivas para *S. bovis* através de métodos fenotípicos e genotípicos para identificação em nível de subespécie do SBEC. Os autores puderam identificar as espécies *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* e *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* em pacientes com EI (28%), CCR (7%), alterações no parênquima hepático (37%) e vesícula biliar (28%). A espécie *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* não pôde ser identificada entre as amostras avaliadas.

I.4 Outras condições clínicas associadas à infecção pelo complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*

Infecções do sistema nervoso central (SNC), tais como meningites, abscessos e empiema subdural causadas por *S. bovis* são descritas mais raramente na literatura. Na maioria dos casos relatados estas infecções acometeram pacientes com alguma comorbidade, tais como EI, lesões no cólon ou reto e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus – HIV*) (COHEN *et al.*, 1997; GRANT *et al.*, 2000; VILARRASA *et al.*, 2002).

S. gallolyticus subsp. *pasteurianus* (*S. bovis* biotipo II/2) tem sido reportado como agente etiológico de meningites em adultos e neonatos (STURT *et al.*, 2010). Previamente, foram relatados dois casos de meningite em adultos causada por *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*: um dos casos apresentava sangramento por úlcera hemorroidária (SMITH *et al.*, 2010) e outro com histórico de câncer de próstata tratado com irradiação pélvica (STURT *et al.*, 2010).

Os casos de meningite e sepse neonatal são relatados com maior frequência que os casos de meningite em adultos, possivelmente pela contaminação no canal do parto em gestantes colonizadas (GAVIN *et al.*, 2003; ONOYAMA *et al.*, 2009; NAGAMATSU *et al.*, 2012). Uma série de quatro casos de meningite em neonatos causada por *S. bovis* ocorridos entre 2008 e 2010 reportou três casos masculinos e um feminino. A subespécie *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* foi identificada, através de sequenciamento do gene 16S rRNA, como agente etiológico em todos os casos (KLATTE *et al.*, 2012). Recentemente, um estudo realizado no Vietnã identificou *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* como o terceiro patógeno mais comumente isolado (8,2%) em amostras de urina de 49 pacientes (94% eram mulheres) com diagnóstico para infecção do trato urinário (ITU) (POULSEN *et al.*, 2012).

VILAICHONE *et al.* (2002) descreveram casos de peritonite bacteriana espontânea causada por *S. bovis* em sete pacientes com cirrose hepática. Estes autores revisaram mais oito casos de peritonite espontânea causada por *S. bovis* e referiram que os pacientes apresentavam cirrose hepática em todos os casos (exceção de um caso com hepatite alcoólica) sintomas como febre, distensão

abdominal e icterícia assim como apresentaram frequências iguais para homens e mulheres de idade avançada. Outros autores sugerem que pacientes com abscessos hepáticos e esplênicos comprovadamente causados por *S. bovis* deveriam ser submetidos à colonoscopia (JOLUBE, 2010).

Um caso comprovado de endoftalmite e provável pneumonia causada por *S. bovis* foi descrito como prováveis consequências da disseminação hematogênica da bactéria proveniente de mucosa intestinal lesada por tumor identificado como CCR (BLEIBEL *et al.*, 2007).

APSINGI *et al.* (2007) relatam isolamento de *S. bovis* em líquido sinovial e sangue de paciente submetido a uma artroscopia de joelho há 40 meses e que apresentava diagnóstico para CCR.

Um raro relato de caso descreve bacteremia assintomática causada por *S. bovis* em doadora de plaquetas, posteriormente foi encaminhada para colonoscopia e obteve diagnóstico para CCR (HAIMOWITZ *et al.*, 2005).

Bacteremia episódica e recorrente causada por *S. bovis* em pacientes infectados pelo vírus *HIV* deve ser considerada mesmo que estes não apresentem lesões de cólon. Um estudo relatou três casos de bacteremia causada por *S. bovis* em que os pacientes não apresentavam qualquer lesão gastrointestinal significativa. Nestes casos a severa imunodeficiência associada com doenças hepatobiliares pode representar um importante risco para desenvolvimento de bacteremia por *S. bovis* (MANFREDI *et al.*, 1999).

Um relato de caso descreve uma paciente infectada pelo vírus *HIV* que apresentou bacteremia e meningite por *S. bovis* em decorrência de colite por *Strongyloides stercoralis*. A ocorrência de bacteremia em infestações por *S. stercoralis* é bem documentada e pode resultar simplesmente da ulceração na mucosa intestinal que atuaria como porta de entrada para as bactérias entéricas (DE SILVA *et al.*, 2005).

Recentemente, pesquisadores americanos analisaram 320 casos de CCR entre mais de 470 mil pessoas infectadas pelo vírus *HIV* e investigaram a relação de risco com infecções intestinais oportunistas, sem considerar disbiose na microbiota intestinal (SHEBL *et al.*, 2012).

I.5 Técnicas moleculares utilizadas na identificação e quantificação do complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*

A composição da microbiota intestinal em humanos e sua interação com o hospedeiro evidenciam relação direta com o processo saúde-doença e apresentam muitos desafios aos microbiologistas. Originalmente, a exploração de micro-organismos componentes deste ecossistema era exclusivamente baseada em técnicas de cultivo, o que normalmente conduzia para resultados contraditórios e pouco reprodutíveis. Atualmente, o advento de técnicas moleculares tem revolucionado nossa capacidade de investigar esta relação, onde a *microbial culturomics* surge como denominação de um novo conceito propondo inicialmente o uso de diversas condições de cultivo para isolamento dos micro-organismos, seguido da utilização de *MALDI-TOF* para identificação com posteriores análises por sequenciamento genômico e metagenômica (LAGIER *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction - PCR*) foi certamente um enorme avanço científico que abriu inúmeras perspectivas para análise de genes, diagnóstico de doenças genéticas e detecção de agentes infecciosos. Uma inovação da técnica de *PCR*, denominada de *PCR em tempo real (real time PCR ou quantitative PCR- qPCR)*, vem sendo cada vez mais utilizada nos laboratórios clínicos e de pesquisa pelo seu importante diferencial em gerar resultados quantitativos. A *qPCR* requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para excitação da fluorescência e coleção da emissão desta, com aquisição de dados continuamente durante a reação. As plataformas são disponibilizadas por diferentes fabricantes e diferem em algumas características como, por exemplo, capacidade de amostras e métodos de excitação (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

Todas as plataformas de *qPCR* monitoram a fluorescência da amostra durante a ciclagem térmica e variam em relação ao volume/formato de reação, velocidade de ciclagem, rendimento e número de canais para aquisição de fluorescência. As opções com múltiplos canais de emissão e aquisição de fluorescência possibilita o uso de mais de uma sonda na mesma reação, permitindo uma configuração no formato *multiplex* (WITTEWER & KUSUKAWA, 2011).

Notadamente, a *qPCR* tem modificado as formas de diagnóstico de diferentes patógenos em microbiologia clínica. A combinação de uma excelente sensibilidade e especificidade, baixo risco de contaminação, facilidade de execução e rapidez, tem evidenciado a *qPCR* como uma alternativa aos métodos usuais que envolvem cultivo e/ou reações imunológicas para diagnóstico de diversas doenças infecciosas (ESPY *et al.*, 2006).

Apesar do desenvolvimento de tecnologias alternativas para amplificação de DNA, a reação de *PCR* continua sendo a metodologia mais empregada para pesquisa de patógenos tanto em laboratórios clínicos como de pesquisa. A detecção por *qPCR* utiliza sondas do tipo intercalantes (ex. SYBR[®] Green I), de hidrólise (ex. TaqMan[®]) e hibridização (ex. LightCycler Red 640[®]) as quais identificam as sequências de DNA alvo em tempo real durante a reação em placas seladas que não necessitam de processamentos pós-PCR (SIBLEY *et al.*, 2012).

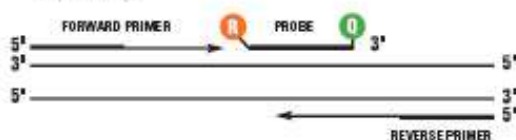
A sonda de hidrólise do tipo TaqMan[®] (oligonucleotídeo marcado e utilizado na hibridização com a sequência alvo de DNA) apresenta um fluoróforo denominados *reporter* e um *quencher* (molécula que absorve a emissão de luz pelo fluoróforo) em extremidades opostas. Durante a reação de *qPCR* a sonda TaqMan[®] hibridiza com a sequência de fita simples do DNA complementar alvo para amplificação e após, durante a polimerização, é degradada, separando o *quencher* do *reporter*. A separação entre o fluoróforo e o *quencher* resulta em aumento da intensidade de fluorescência emitida e isto identifica a presença da sequência alvo na amostra analisada (Figura 1) (ESPY *et al.*, 2006). As sondas tipo TaqMan[®] associadas ao *quencher* MGB (*Minor Groove Binder*) são as melhores opções tanto para ensaios quantitativos como para ensaios de presença/ausência que exijam alto grau de especificidade. Podem ser marcadas com diferentes fluoróforos, como 6-carboxifluoresceína (FAM), VIC[®] entre outros, e permitem desenvolvimento de ensaios em *multiplex* (BUH GASPARIC *et al.*, 2010).

qPCR é referida como *PCR* quantitativa, pois permite a detecção e quantificação simultaneamente dos produtos gerados a cada ciclo de amplificação o que pode ser um requisito importante para muitas aplicações diagnósticas (PARK *et al.*, 2010). O uso de *qPCR* para quantificação bacteriana pode auxiliar na definição e distinção entre pacientes colonizados e pacientes com infecção ativa, sintomáticos

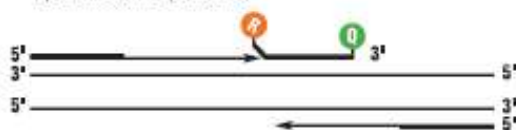
ou assintomáticos (OLSON *et al.*, 2010). A quantificação por *qPCR* exige que os resultados obtidos na amplificação de amostras sejam comparados a padrões ou controles. Padrões com concentrações conhecidas de DNA alvo são indispensáveis para a quantificação absoluta e análise do número de cópias da amostra. Este papel pode ser desempenhado por oligonucleotídeos sintéticos, produtos de *PCR* purificados, plasmídeos ou DNA genômico (WITTWER & KUSUKAWA, 2011).

TAQMAN® PROBE-BASED ASSAY CHEMISTRY

1. **Polymerization:** A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan® probe, respectively.



2. **Strand displacement:** When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. **Cleavage:** During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. **Polymerization completed:** Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.

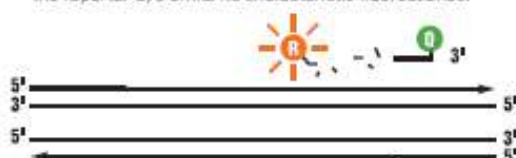


Figura 1. Representação esquemática de uma reação de PCR em tempo real com sonda de hidrólise TaqMan® -Life Technologies Corporation

Em 2004, um estudo divulgou o desenvolvimento de um ensaio de *PCR*, baseado no gene *sodA* como alvo, para identificação de *S. gallolyticus*. Os autores puderam identificar corretamente 23 isolados de *S. gallolyticus* e demonstraram a especificidade do ensaio com quatro isolados de *S. bovis* biotipo II/1, um isolado de

S. salivarius e um isolado de *S. equinus*, que não tiveram reações de amplificação detectadas (SASAKI *et al.*, 2004).

Um estudo investigou a colonização por *S. gallolyticus* em tecidos tumorais e não tumorais de 52 pacientes com CCR e sem história prévia de bacteremia e 39 com CCR e com história prévia de bacteremia. Os pesquisadores utilizaram o ensaio de *PCR* e *qPCR* baseado no gene *sodA* e puderam detectar e quantificar a presença de *S. gallolyticus* em 48,7% dos tecidos tumorais de pacientes com história de bacteremia para este agente, 32,7% dos tecidos tumorais de pacientes sem história de bacteremia e apenas 4% nos voluntários do grupo controle (ABDULAMIR *et al.*, 2010).

Pesquisadores suíços propuseram um novo método *multiplex*, utilizando *PCR* baseado no gene 16S rRNA e polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP*), para identificação de *S. infantarius* e *S. gallolyticus* provenientes de produtos lácteos. Os autores relataram a técnica como de fácil exequibilidade e acessibilidade para laboratórios que não dispõem de plataformas para sequenciamento (JANS *et al.*, 2012). Anteriormente, outros pesquisadores puderam identificar as subespécies do SBEC através de *PCR/RFLP* baseado no gene *groESL* (CHEN *et al.*, 2008) .

Outro estudo utilizou eletroforese em gel com gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE*), clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA para caracterizar a diversidade microbiana encontrada em cereais fermentados naturalmente, alimentos tradicionais no oeste africano. Os resultados demonstraram uma positividade para *S. infantarius* subsp *coli* de 17,6% em 136 clones obtidos a partir do *kunu-zaki*, bebida produzida pela fermentação natural de painço ou sorgo (OGUNTOYINBO *et al.*, 2011).

GLAZUNOVA *et al.* (2010) realizaram o sequenciamento parcial do gene *recN* (1249 pb) para identificação de espécies do gênero *Streptococcus* e determinação filogenética. Os resultados evidenciaram que o gene *recN* apresenta uma média de similaridade entre as espécies de 66,6% e o gene *gyrB* de 73,2%, percentuais inferiores encontrados para os genes *sodA* (74,8%), *groEL* (78,1%), *rpoB* (84,6%) e 16S rRNA (94,1%). As árvores filogenéticas construídas neste estudo revelaram seis grupos que definiu um grupo como *S. equinus* identificando as seguintes espécies:

S. alactolyticus, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, *S. infantarius* subsp. *infantarius*, *S. infantarius* subsp. *coli* e *S. equinus*. Os achados deste estudo destacam os genes *recN* e *gyrB* como os melhores alvos moleculares entre os genes analisados para identificação de espécies do gênero *Streptococcus* e conseqüentemente do *SBEC*.

A técnica de *qPCR* tem sido utilizada no diagnóstico e vigilância epidemiológica de infecções bacterianas intestinais através de amostras obtidas a partir de swab retal com ou sem cultivo de enriquecimento prévio (WANG *et al.*, 2010; LIN, L. H. *et al.*, 2011).

Até o momento, o único estudo que referiu a utilização de *qPCR* para a identificação e quantificação de *S. gallolyticus* foi ABDULAMIR *et al.* (2010) que utilizou sonda intercalante SYBR® Green I.

TJALSMA and BOLEIJ (2012) enfatizaram que *S. bovis* não deve ser considerada como uma única espécie e que a denominação das subespécies do complexo *S. bovis* deveriam seguir a classificação proposta por SCHLEGEL *et al.* (2003) na prática clínica e nas publicações científicas. Estes autores referem que são necessárias técnicas moleculares para esta subclassificação e isto seria crucial para aperfeiçoamento dos protocolos para triagem de neoplasias malignas de cólon e reto em estágios iniciais.

Logo, consideramos neste estudo a importância em desenvolver novos ensaios moleculares para identificação das subespécies patogênicas do *SBEC*, utilizando uma metodologia que já está consolidada como ferramenta para diagnósticos em microbiologia clínica. A investigação da colonização intestinal em humanos a partir de métodos moleculares pode auxiliar na acurácia quando comparados aos métodos de cultivo e identificação fenotípica, aumentando sobremaneira a sensibilidade e especificidade, conseqüentemente com resultados mais fidedignos de prevalência para cada uma das subespécies analisadas.

II. JUSTIFICATIVA

Portanto, algumas evidências clínicas e laboratoriais sugerem que:

a) bacteremias causadas pelas subespécies do complexo *S. bovis/S. equinus* são descritas com relevante frequência na literatura;

b) a significativa associação de pacientes com CCR e isolamento de *S. bovis* (principalmente a subespécie *S. gallolyticus* subsp *gallolyticus*) em hemoculturas conduz para investigações epidemiológicas acerca da colonização intestinal por este agente;

c) a prevalência da colonização intestinal pelas subespécies do complexo *S. bovis/S. equinus* não é conhecida em populações com risco para doenças do cólon e outras doenças gastrintestinais;

d) até o momento não foram descritos ensaios de *qPCR* para detecção das quatro subespécies do complexo *S. bovis/S. equinus* consideradas como clinicamente relevantes;

e) até o momento não foi descrito ensaio de *qPCR* baseado no sistema TaqMan-MGB para quantificação da espécie *S. gallolyticus* sp.;

f) a quase totalidade dos estudos baseia suas investigações da colonização intestinal pelo complexo *S. bovis/S. equinus* em métodos de cultivo bacteriano referindo *S. bovis* como uma única espécie e cujos resultados são provavelmente subestimados e/ou incorretamente identificados.

Considerando as condições supracitadas, o presente estudo tem por objetivo desenvolver ensaios de *qPCR* para detecção das quatro subespécies do complexo *S. bovis/S. equinus* consideradas como clinicamente relevantes e quantificação de *S. gallolyticus* sp., bem como investigar a colonização intestinal por este complexo em voluntários com risco para doenças do cólon e outras doenças gastrintestinais.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo Geral

Desenvolver ensaios de *qPCR* para identificação de quatro subespécies do complexo *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* e investigar a prevalência de colonização intestinal em voluntários submetidos à colonoscopia.

III.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um ensaio de *qPCR* do tipo TaqMan-MGB[®] para detecção e quantificação de *Streptococcus gallolyticus* sp. baseado em sequencia parcial do gene *recN*;
- Desenvolver dois ensaios de *qPCR* do tipo TaqMan-MGB[®] para detecção de *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* e *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* baseado em sequencia parcial do gene *recN*;
- Desenvolver dois ensaios de *qPCR* do tipo TaqMan-MGB[®] para detecção de *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* e *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* baseado em sequencia parcial do gene *gyrB*;
- Investigar a colonização intestinal destas subespécies através da coleta de *swab* retal em voluntários, sob risco ou com doenças do cólon e/ou outras doenças gastrintestinais, submetidos à colonoscopia;
- Analisar os resultados da colonoscopia bem como revisar os prontuários clínicos dos voluntários e relacionar as informações clínicas com os resultados de detecção e quantificação destas bactérias pela metodologia molecular desenvolvida neste estudo.

IV. ARTIGO 1 - Development of a TaqMan[®]-MGB real-time PCR assay for detection and quantification of *Streptococcus gallolyticus* sp. by targeting the *recN* gene

Este artigo será submetido ao periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz no formato de "Technical Note".

- Technical Note -

Development of a TaqMan[®]-MGB real-time PCR assay for detection and quantification of *Streptococcus gallolyticus* sp. by targeting the *recN* gene

Paulo Guilherme Markus Lopes¹, Vlademir Vicente Cantarelli², Grasiela Agnes¹, Pedro Alves d'Azevedo¹

¹ Health Sciences Postgraduate Program, Health Sciences Federal University of Porto Alegre - UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil

² FEEVALE University, Novo Hamburgo, RS, Brazil

Here, we present a specific TaqMan-MGB real-time PCR (qPCR) assay targeting the *recN* gene for the detection and quantification of *Streptococcus gallolyticus*. This assay was developed to investigate *S. gallolyticus* sp. colonization in risk colorectal cancer population, and was tested in clinical isolates and reference strains.

Keywords: *Streptococcus gallolyticus*, TaqMan-MGB real-time PCR, *recN* gene

Streptococcus bovis can be recovered from 5-16% of faecal specimens in normal adults (Noble 1978). Commonly, *S. bovis* has been divided into three biotypes: biotype I (mannitol fermentation positive), biotype II/1 (mannitol negative and β -glucuronidase negative), and biotype II/2 (mannitol negative and β -glucuronidase positive) (Beck et al. 2008). In order to define the taxonomy of the *S. bovis* group, researchers proposed to rename these biotypes as *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*S. bovis* biotype I), *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (*S. bovis* biotype II/1), *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* (*S. bovis* biotype II/1), and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (*S. bovis* biotype II/2) (Schlegel et al. 2003; Schlegel et al. 2000).

Bacteremia involving the *S. bovis* group was related to colorectal cancer (CRC) for the first time more than 30 years ago (Klein et al. 1977). These bacteria have acquired more importance since 25 to 80% of patients with *S. bovis* group bacteremia have colorectal tumors (Abdulmir et al. 2011). Results have demonstrated that *S. gallolyticus*, rather than *S. infantarius*, is associated with both endocarditis and colonic lesions (Boleij et al. 2011). The putative faecal carriage of *S. bovis* group specimens have been investigated in patients with polyps, adenoma, CRC and healthy controls, and reported contradictory results (Burns et al. 1985; Dubrow et al. 1991; Potter et al. 1998)

In order to detect and quantify *S. gallolyticus* in both tumorous and non-tumorous tissues of patients with CRC through a molecular method, 39 CRC patients with history of *S. gallolyticus* bacteremia were investigated. Interestingly, a positive detection was found in 48.1% of the tumorous tissues and only in 4% of the non-tumorous (Abdulmir et al. 2010). Recently, the partial *recN* gene sequence was

utilized to investigate the taxonomy and phylogeny of the genus *Streptococcus* and evidenced that *recN* is the best target gene to discriminate streptococci representative species. Interspecies nucleotide sequences were more variable for *recN* gene than other evaluated genes (*i.e.* 16S rRNA, *groEL*, *gyrB*, *rpoB* and *sodA*). In the same way, in the *S. bovis* group the genetic variability is larger in *recN* than it is in any other gene evaluated (Glazunova et al. 2010). Therefore, our aim was to utilize *recN* as target to develop a qPCR assay to detect and quantify *S. gallolyticus* from swab specimens.

A total of eighteen bacterial strains, including ten Streptococci reference strains (*Streptococcus gallolyticus* ATCC 9809, *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* IMPG RS-51, *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* IMPG RS-52, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 and *Streptococcus pneumoniae* ATCC 33400) two Enterococci reference strains (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Enterococcus faecium* ATCC 6569) and five *S. bovis* group clinical isolates (*Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* HMV 317831, *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* HUSM 2011, *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* HMD 6075, *Streptococcus* subsp. *gallolyticus* HMD 6925, *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* HMD 305) were evaluated in this study. Considering that human intestinal microbiota is a complex ecosystem containing hundreds of microbial species these bacteria were included to evaluate specificity of the reaction using a couple of closer ones.

The *recN* gene nucleotide sequence of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (GenBank EU917270.1) was analyzed using BLASTN to evaluate the differences

among *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. infantarius* subsp. *coli* and *S. infantarius* subsp. *infantarius* genes. Subsequently, primers and fluorescent dye-labeled TaqMan[®] MGB probe were designed using the Primer Express[®] v3.0 software (Applied Biosystems, Foster City, USA).

The bacterial DNA was extracted throughout boiling method extraction and stored at - 20°C (Olson et al. 2010). Rectal swab specimens were obtained from five subjects at Santa Clara Hospital endoscopy service. Santa Clara Hospital is a general hospital in Porto Alegre, Brazil. Rectal swab specimens were collected in accordance with ethical guidelines established by the Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (Declaration of Helsinki, 1964). All subjects signed the written informed consent and the study protocol was approved by our local Institutional Ethical Committee. Each swab (ESwab-COPAN, Brescia, Italy) was suspended in 1 mL of modified Liquid Amies medium, and stored at - 80°C. DNA extraction was performed with BioPur[®] Mini Spin Extraction Kit (Biometrix, Curitiba, Brazil). They underwent colonoscopy and presented colonic polyps

All five clinical isolates and two reference strains were correctly identified in *S. gallolyticus* sp. using this qPCR assay. No false-positive results were observed when the qPCR assay was evaluated neither against closely related *Streptococcus* species nor against *Enterococcus* sp. In addition, negative result for *S. infantarius* subsp. *coli*, which is closely related to *S. gallolyticus* sp., ensured the adequate specificity of this assay (Fig. 1).

The qPCR reactions were performed with 5 µL of extracted DNA, 500 nM of each primer, 200 nM of probe and 10 µL of 2 x TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA). DNA was amplified using the StepOnePlus[™]

Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Standard curves and the lower limit of detection was defined by plotting the cycle threshold values (C_T) of the qPCR performed on serial dilutions (3×10^5 , 6×10^3 , 1.2×10^3 , 2.4×10^2 copies) of the 62 base pairs (bp) synthesized *recN* amplicon (IDT, Coralville, USA), against the log input copy number (CN) (Fig 2).

The lower limit of *S. gallolyticus* sp. detection was defined in 2.4×10^2 CN. Serial 4-fold dilutions determined a standard curve correlation and efficiency of 98% and 101.4%, respectively. β -globin gene was defined as internal control for human DNA extracted from rectal samples and showed a mean C_T of 26.97 for the positive *recN* samples and 25.58 for the negative ones. Five adult subjects underwent colonoscopy and presented tubular adenomatous polyps, two were positive for *S. gallolyticus* sp. with bacterial load 2×10^3 and 57.7×10^3 CN, respectively (Fig 2). These rectal swab specimens were tested to prove collection and DNA extraction efficiency.

Several conventional PCR-based methods have been developed to differentiate species of the *S. bovis* group and to discriminate both *S. gallolyticus* and *S. infantarius* species (Chen et al. 2008; Jans et al. 2012; Papadelli et al. 2003; Poyart et al. 1998; Sasaki et al. 2004). Nevertheless, none of these methods have investigated *S. bovis* group colonization in humans. Instead, most colonization studies have focused on *S. bovis* group culture techniques from stool samples collection, which could yield underestimated and/or misidentified results. The use of molecular techniques in order to sub-classify the *S. bovis* group bacteria is required to fully understand the clinical value of *S. gallolyticus* sp. infection as an early signaling of colonic malignancy (Tjalsma & Boleij 2012). In conclusion, this qPCR assay provides a reliable molecular method to detect and quantify *S. gallolyticus* sp. from swab specimens. This assay

might be a useful tool for bacteria screening and colonization-surveillance in individuals at colonic pathologies risk. Importantly, this novel *S. gallolyticus*-related diagnostic tool could unravel the association between *S. gallolyticus* sp. colonization and CRC or different colonic pathologies.

Acknowledgment

We acknowledge the National Institute of Quality Health Control (INCQS/Fiocruz) and Dr. Lucia Martins Teixeira (UFRJ) for reference strains donation. This work was supported by a grant from the National Council of Scientific and Technology Development (CNPq), Brazil.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

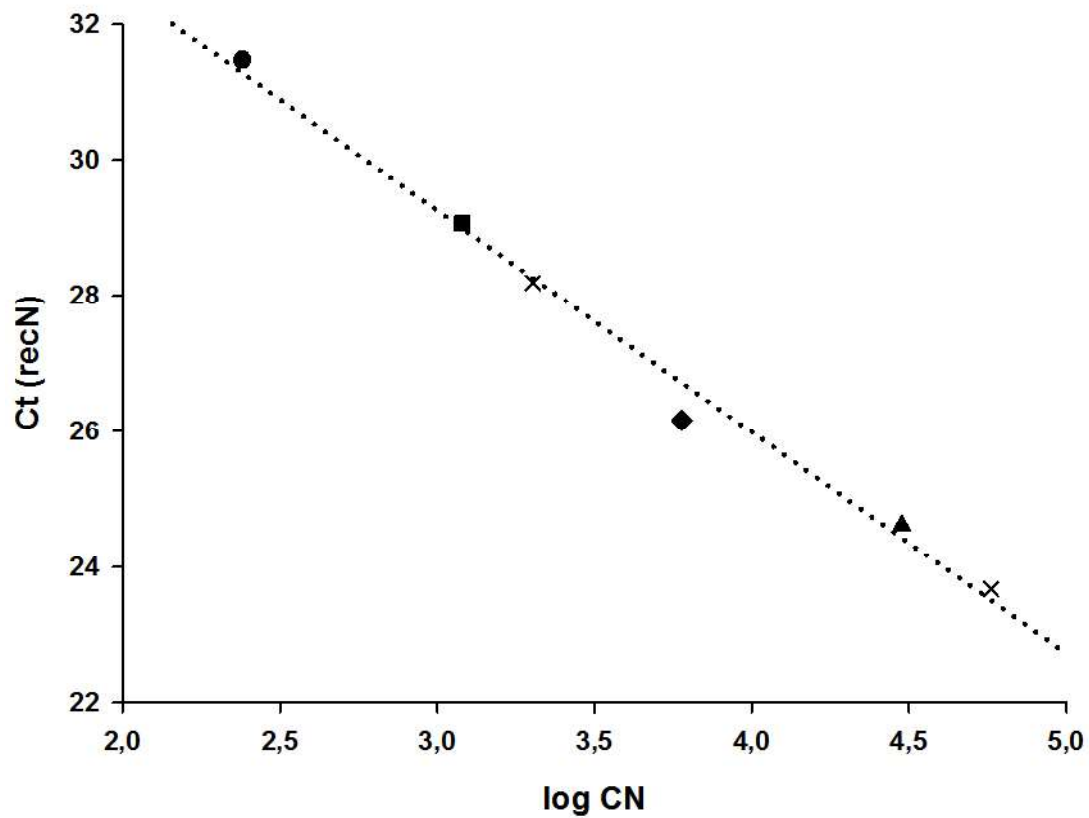


Fig 2. Quantification of *S. gallolyticus* sp. in swab specimens. Standard curve was obtained by qPCR from amplification of synthesized *recN* on serial dilution, such as follows: 2.4×10^2 (●) 1.2×10^3 (■) 6×10^3 (◆) 3×10^5 (▲) CN (copy number). The bacterial load observed in clinical samples corresponded 2×10^3 and 57.7×10^3 CN (x).

Slope: -3.289

Y-intercept: 39.064

R^2 : 0.98

References

- Abdulmir AS, Hafidh RR, Abu Bakar F 2011. The association of *Streptococcus bovis/galloyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 30, 11.
- Abdulmir AS, Hafidh RR, Bakar FA 2010. Molecular detection, quantification, and isolation of *Streptococcus galloyticus* bacteria colonizing colorectal tumors: inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8. *Molecular cancer*, 9, 249.
- Beck M, Frodl R, Funke G 2008. Comprehensive study of strains previously designated *Streptococcus bovis* consecutively isolated from human blood cultures and emended description of *Streptococcus galloyticus* and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*. *Journal of clinical microbiology*, 46, 2966-2972.
- Boleij A, van Gelder MM, Swinkels DW, Tjalsma H 2011. Clinical Importance of *Streptococcus galloyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 53, 870-878.
- Burns CA, McCaughey R, Lauter CB 1985. The association of *Streptococcus bovis* fecal carriage and colon neoplasia: possible relationship with polyps and their premalignant potential. *The American journal of gastroenterology*, 80, 42-46.
- Chen HJ, Tsai JC, Chang TC, Hung WC, Tseng SP, Hsueh PR, Teng LJ 2008. PCR-RFLP assay for species and subspecies differentiation of the *Streptococcus bovis* group based on *groESL* sequences. *Journal of medical microbiology*, 57, 432-438.
- Dubrow R, Edberg S, Wikfors E, Callan D, Troncale F, Vender R, Brand M, Yapp R 1991. Fecal carriage of *Streptococcus bovis* and colorectal adenomas. *Gastroenterology*, 101, 721-725.
- Glazunova OO, Raoult D, Roux V 2010. Partial *recN* gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60, 2140-2148.
- Jans C, Lacroix C, Meile L 2012. A novel multiplex PCR/RFLP assay for the identification of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex members from dairy microbial communities based on the 16S rRNA gene. *FEMS microbiology letters*, 326, 144-150.
- Klein RS, Recco RA, Catalano MT, Edberg SC, Casey JI, Steigbigel NH 1977. Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *The New England journal of medicine*, 297, 800-802.
- Noble CJ 1978. Carriage of group D streptococci in the human bowel. *Journal of clinical pathology*, 31, 1182-1186.
- Olson AB, Sibley CD, Schmidt L, Wilcox MA, Surette MG, Corbett CR 2010. Development of real-time PCR assays for detection of the *Streptococcus milleri* group from cystic fibrosis clinical specimens by targeting the *cpn60* and 16S rRNA genes. *Journal of clinical microbiology*, 48, 1150-1160.
- Papadelli M, Manolopoulou E, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E 2003. Rapid detection and identification of *Streptococcus macedonicus* by species-specific PCR and DNA hybridisation. *International journal of food microbiology*, 81, 231-239.
- Potter MA, Cunliffe NA, Smith M, Miles RS, Flapan AD, Dunlop MG 1998. A prospective controlled study of the association of *Streptococcus bovis* with colorectal carcinoma. *Journal of clinical pathology*, 51, 473-474.
- Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *Journal of clinical microbiology*, 36, 41-47.
- Sasaki E, Osawa R, Nishitani Y, Whiley RA 2004. Development of a diagnostic PCR assay targeting the Mn-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) for identification of *Streptococcus galloyticus*. *Journal of clinical microbiology*, 42, 1360-1362.
- Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PA, Bouvet A 2003. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of

Streptococcus gallolyticus subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53, 631-645.

Schlegel L, Grimont F, Collins MD, Regnault B, Grimont PA, Bouvet A 2000. *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50 Pt 4, 1425-1434.

Tjalsma H, Boleij A 2012. Subtyping of *Streptococcus bovis* group bacteria is needed to fully understand the clinical value of *Streptococcus gallolyticus* (*S. bovis* biotype I) infection as early sign of colonic malignancy. *International journal of clinical practice*, 66, 326.

V. ARTIGO 2 - Novel TaqMan[®]-MGB real-time PCR assays for the identification of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex from rectal swab specimens based on the *recN* and *gyrB* genes

Este artigo será submetido ao periódico *Journal of Clinical Microbiology* no formato de "Full-length Paper".

Novel TaqMan-MGB real-time PCR assays for the identification of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex from rectal swab specimens based on the *recN* and *gyrB* genes

Paulo Guilherme Markus Lopes¹, Vlademir Vicente Cantarelli², Grasiela Agnes¹, Maurício Schüller Nin¹, Ane Micheli Costabeber¹, Pedro Alves d'Azevedo¹

¹ Health Sciences Federal University of Porto Alegre - UFCSPA, Porto Alegre, Brazil

² FEEVALE University, Novo Hamburgo, Brazil

The *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBEC) comprises pathogenic species related with different degrees with human infections. This genospecies complex has been associated with hepatobiliary disorders and most notably in colonic adenomas and colorectal cancer (CRC). Therefore, our aim was to develop a useful TaqMan[®]-MGB real-time PCR assays based on *recN* and *gyrB* genes to detect four SBEC subspecies and quantify *S. gallolyticus* sp. from rectal swab specimens. Five clinical isolates and four reference strains were correctly identified and no false-positive amplification reactions were observed in closely streptococci species, *Enterococcus* sp. and *Escherichia coli*. The quantitative assay can detect > 30 copy number (CN). Fifty-four subjects who underwent a routine colonoscopy were included in this cross-sectional study. The overall prevalence of any SBEC subspecies was 35.2%: *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (11.1%), *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (13%), *S. infantarius* subsp. *coli* (20.4%) and *S. infantarius* subsp. *infantarius* (11.1%). Our study showed associations between hemorrhoidal disease (P=0.047) and biliary lithiasis (P=0.023) with SBEC subspecies colonization. Biliary lithiasis was related with *S. infantarius* subsp. *coli*-colonized (P=0.021) and chronic liver disease with *S. infantarius* subsp. *infantarius*-colonized (P=0.002) subjects. To conclude, these real-time PCR assays provide a reliable molecular method to detect SBEC subspecies and quantify *S. gallolyticus* sp. from rectal swab specimens

Keywords: *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex, real-time PCR, colorectal cancer, gastrointestinal diseases

Introduction

Streptococcus bovis, a non-enterococcal group D streptococcus and normal inhabitant of the intestinal tract, may be isolated in 5-16% of faecal specimens in normal adults (1). Traditionally, *S. bovis* has been divided into three biotypes: biotype I (mannitol fermentation positive), biotype II/1 (mannitol negative and β -glucuronidase negative), and biotype II/2 (mannitol negative and β -glucuronidase positive) (2). In an attempt to define the taxonomy of the *S. bovis*/*S. equinus* complex (SBEC), researchers have proposed to rename these biotypes into *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*S. bovis* biotype I), *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (*S. bovis* biotype II/1), *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* (*S. bovis* biotype II/1), and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (*S. bovis* biotype II/2) (3, 4). The term *S. bovis* will still be used in this article when referenced authors have not described species/subspecies or biotypes related.

S. bovis bacteremia has been related to colorectal cancer (CRC) for more than 30 years (5). This species complex deserves more attention since 25 to 80% of patients with *S. bovis* bacteremia have CRC, and association of colonic neoplasia and *S. bovis* endocarditis (IE) has been shown to be 18 to 62% (6). Additionally, chronic liver and biliary tract disorders have been reported as predisposing conditions in *S. bovis* bacteremia (7). Results have suggested that *S. gallolyticus* sp. is more frequently related to both endocarditis and colonic lesions than *S. infantarius* sp. (8, 9). Nevertheless, *S. infantarius* sp. is associated with noncolonic cancer, such as pancreas and biliary tract, generally appearing as cholangitis (10). Authors have claimed that different *S. bovis* subspecies should be named according to the classification proposed by Schlegel et al (4) both in clinical practice and scientific

publications, which implies the use of molecular techniques for the sub-classification of SBEC (11).

The putative faecal carriage of *S. bovis* was investigated in patients with polyps, adenoma, CRC and healthy controls, and demonstrated contradictory results (12-14). However, it should be emphasized that all these studies used faecal culturing to detect *S. bovis*. In this way, discrepancies could be caused by differences in specimen collection, processing and culturing techniques (15).

Molecular methods targeting the *sodA* gene were used for the detection and quantification of *S. gallolyticus* in tumorous and non-tumorous tissues of patients with CRC. In 39 CRC patients lacking history of *S. gallolyticus* bacteremia, bacterial DNA was detected in 32.7% of tumor biopsies, and in 23% of non-tumor samples from the same patients. Interestingly, a positive detection was found in only 4% of the control tissues. Recently, the use of partial *recN* gene sequence was explored in order to investigate the taxonomy and phylogeny in the genus *Streptococcus*. Previous results obtained for other genes (16S rRNA, *groEL*, *gyrB*, *rpoB* and *sodA*) were compared to *recN*, which evidenced it as the best tool to identify streptococci representative species. The mean DNA sequence interspecies and intra-subspecies similarity of *recN* (66.6%) and *gyrB* (73.2%) were found to be less similar than other gene sequences (16).

Therefore, our aim was to use *recN* and *gyrB* genes as targets to develop a useful real-time PCR assays to detect *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. infantarius* subsp. *coli* and *S. infantarius* subsp. *infantarius* from rectal swab specimens in individuals that underwent colonoscopy. The first assay is based on *recN*, which detects and quantifies *S. gallolyticus*. The second assay

specifically detects *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* also based on *recN*. The third and fourth assays specifically detect *S. infantarius* subsp. *coli* and *S. infantarius* subsp. *infantarius* based on *gyrB*, respectively. These assays could provide a novel culture-independent method for the detection of four clinical important subspecies in the SBEC.

Materials and methods

A total of nineteen bacterial strains were evaluated in this study, and are listed in Table 1. They were obtained from the National Institute of Quality Health Control (INCQS-Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil), Paulo de Góes Microbiology Institute (IMPG-UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil), and from three general hospitals (Rio Grande do Sul, Brazil). All five clinical isolates were identified using the technique of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) by VITEK MS (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) (Table 1). Stock cultures of all strains were stored at - 80 °C in skim milk (Difco, Le Pont de Claix, France) supplemented with glycerol. Streptococci were grown anaerobically at 35° for 24 h on blood agar (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) and *Enterococcus sp.* and *Escherichia coli.* were grown aerobically on brain-heart infusion (BHI) agar (Difco, Le Pont de Claix, France) at 35° for 24h.

Growth culture strains were resuspended in 500 µL of ultra-purified water and lysed by boiling for 15 min. Cells were pelleted, and the supernatant was separated and stored at - 20°C (17).

Rectal swab specimens were collected in accordance with ethical guidelines established by the Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects

(Declaration of Helsinki, 1964) and stored at - 80°C. All subjects signed the written informed consent and the study protocol was approved by our local Institutional Ethical Committee.

In a period ranging from June to September 2011, 54 rectal swab specimens were obtained from subjects who underwent colonoscopy at Santa Clara Hospital endoscopy service. Santa Clara Hospital is a general hospital in Porto Alegre, Brazil. This cross-sectional study considered outpatient and no colostomized subjects as inclusion criteria. Clinical records were reviewed for data regarding demographics, medical co-morbidities, clinical presentation and surgical interventions. Each swab (ESwab-COPAN, Brescia, Italy) was suspended in 1 mL of modified Liquid Amies medium, and stored at - 80°C. DNA isolation was performed with BioPur[®] Mini Spin Extraction Kit (Biometrix, Curitiba, Brazil).

The *recN* partial gene nucleotide sequence of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (GenBank accession no. EU917270.1), *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (GenBank accession no. EU917274.1) and *gyrB* partial gene nucleotide sequence of *S. infantarius* subsp. *coli* (GenBank accession no. EU003729.1) and *S. infantarius* subsp. *infantarius* (GenBank accession no. EU003767.1) was analyzed using BLAST[®] N algorithm to compare the sequences to a database. Afterwards primers and fluorescent dye-labeled TaqMan[®] MGB probes were designed using the Primer Express[®] v3.0 software (Applied Biosystems, Foster City, USA) (Figure 1). The sequences of primers, probes and products size are listed in Table 2. A TaqMan[®]-TAMRA real-time PCR assay based on β -globin gene (Applied Biosystems, Foster City, USA), was used for internal control. The housekeeping genes occur in all human nucleated cells types; therefore, β -globin gene illustrated the DNA extracted amount and controlled amplification inhibitions (18).

Quantitative real-time PCR assay was performed with F-*recN* SG, R-*recN* SG and Pf-*recN*/SG primers and probe (Table 2). Standard curves and the lower limit of detection was determined by plotting the cycle threshold values (C_T) of the qPCR performed on serial dilutions (3×10^5 , 6×10^3 , 1.2×10^3 , 2.4×10^2 , 48 copies) of synthesized oligonucleotide (IDT, Coralville, USA) against the log input CN. Absolute quantification reactions were performed with 5 μ L of extracted DNA, 500 nM of each primer, 200 nM of probe and 10 μ L 2 x TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Presence/absence reactions for *recN* and *gyrB* genes were performed with 4 μ L of extracted DNA and 10 μ L of Master Mix, 500 to 800 nM of each primer and 200 nM of probes. DNA was amplified using the StepOnePlus[™] Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA).

All reactions conditions included an initial denaturation of 95°C for 10 min, followed by amplifications using 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1 min. The positive specimens were determined as amplification yielded positive result and as C_T deviation for the replicate group did not exceed the flag setting (> 0.5) and C_T cut-off at 35.

The chi-square analysis and Student *t* test were used for statistical evaluation. Both tests were two-sided and the threshold for statistical significance was determined at a *P* value < 0.05 .

Results

Five clinical isolates and four reference strains (Table 1) were correctly identified using the primers and probe sets designed in these real-time PCR assays. No false-positive amplification reactions were observed when the real-time PCR assays were evaluated against various closely related Streptococci species, *Enterococcus* sp. and *Escherichia coli* (Table 2). We ensured adequate specificity by the correct design of primers and probes (Figure 1).

The quantitative real-time PCR lower limit detection was defined in 1.48 log₁₀CN. Serial 5-fold dilutions determined a standard curve correlation, efficiency and slope of 0.98, 97.4%, - 3.3, respectively. Internal control showed a mean C_T of 26.22 (± 1.83). This assay was able to detect twelve positive specimens and determined bacterial load range in 1.48 to > 6 log₁₀CN (Table 3).

Fifty-four subjects were enrolled (M=19, mean age 64.6, range 46-76 and F=35, mean age 57.9, range 44-80, P=0.015). The overall prevalence of any SBEC subspecies was 35.2% (M=3, F=16). Ten subjects had a single positive SBEC subspecies result whereas the other nine subjects had more than one subspecies colonization. Seven subjects had two subspecies while two subjects had at least three concomitant colonization. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* were detected in 11.1% (M=1, F=5) and in 13% (M=1, F=6) subjects, respectively. Twelve out of 54 subjects were *S. gallolyticus* sp.-colonized. From the other remaining two SBEC subspecies, *S. infantarius* subsp. *coli* was detected in 20.4% (M=2, F=9), and *S. infantarius* subsp. *infantarius* had 11.1% (M=1, F=5) positive results. Fifteen out of 54 subjects were *S. infantarius* sp.-colonized (Table 3, 4).

Our study identified five subjects with hemorrhoidal disease and four (80%) of them was SBEC-colonized ($P=0.047$). Three subjects *S. infantarius* subsp. *coli*-colonized out of five had hemorrhoidal disease ($P=0.052$). Biliary lithiasis was described in ten subjects and seven (70%) had SBEC positive colonization result ($P=0.023$). We found that seven *S. infantarius* sp.-colonized subjects out of 15 cases had biliary lithiasis ($P=0.003$) and five out of 11 subjects exclusively *S. infantarius* subsp. *coli*-colonized had the above-mentioned clinical condition ($P=0.021$). Chronic liver disease was defined in seven subjects and four were *S. infantarius* subsp. *infantarius*-colonized ($P=0.002$). Diarrhea/constipation was found in nine subjects and six were SBEC-colonized ($P=0.053$). Ulcerative colitis was seen in three subject's medical history and two were SBEC-colonized ($P=0.280$).

One subject had a diagnosis of HIV infection and was *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* and *S. infantarius* subsp. *coli* carrier (subject I; Table 3). She presented enlarged right lymph-node but evaluation for acid-fast bacilli and fungi were negatives.

Colonoscopic evaluations did not evidence significant associations between colonized and non-colonized subjects. A total of 48.15% (26) subjects presented colonic polyps: two had tubulovillous adenoma, 15 had tubular adenoma and nine hyperplastic polyp and 15.4% (4) were *S. gallolyticus* sp.-colonized (Table 3). Three of these individuals had tubular adenomatous colonic polyps, located in the rectum, and hyperplastic colonic polyp in sigmoid, and one had inflammatory colonic polyps in sigmoid and transverse location. Moreover, 11.5% (3) *S. infantarius* sp.-colonized subjects out of 26 had colonic polyps (Table 4), in which one had tubular adenoma (transverse colon) and hyperplastic polyp (sigmoid colon), and the other two subjects had hyperplastic polyps (transverse colon and rectum). We did not find any tubulovillous or villous

adenomas in the SBEC-colonized subjects. Twenty-one (38.8%) subjects had diverticulosis and only nine (16.6%) were SBEC-colonized.

Interestingly, one subject had a diagnosis of CRC eleven years ago and surgical resection was done. He underwent colonoscopy four times after surgical resection. The colonoscopies diagnostic timescale was as follow: (2001) colonic polyp, (2003) chronic inflammatory mucosa, (2006) hyperplastic mucosa, and (2007) hyperplastic polyp. This is the only subject who was *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* concomitant colonization (subject D; Table 3).

Discussion

In the present study, four TaqMan[®]-MGB real-time PCR assays have been designed to specifically detect subspecies of the SBEC based on sequence analysis of the *recN* and *gyrB* genes. To our knowledge, these are the first applicable real time PCR assays to detect all clinically significant SBEC subspecies. Recently, a novel multiplex PCR/RFLP assay based on 16S rRNA proposed SBEC species identification from dairy microbial communities. However, this assay was not able to discriminate at subspecies level (19). Previously, authors developed a PCR/RFPL assay based on *groESL* for the identification of SEBC subspecies evaluated in reference strains and clinical isolates. The combination of excellent sensitivity and specificity, low contamination risk, ease of performance and speed has made real time PCR an appealing alternative in the clinical microbiology laboratory (18).

Our lower limit of detection for *recN* quantitative assay was > 30 CN, which seems more sensitive than previous results considering that the authors' assay was based on

sodA gene and SYBR[®] Green I probe (20). Together, quantitative and presence/absence assays could be useful for SBEC subspecies identification and *S. gallolyticus* sp. quantification in different clinical samples such as blood, liquor and colonic tissues.

We identified that 35.2% out of 54 subjects were colonized with SBEC subspecies, actually *S. bovis* colonization. This result is higher than a previously published study in which the carriage rate of *S. bovis* was 24.7% among patients with inflammatory bowel disease, chronic gastrointestinal diseases and healthy individuals (21). Recently, a study reported a correlative relationship between *S. bovis* colonization and nonmalignant gastrointestinal diseases such as liver cirrhosis (28%) and obstructive jaundice (33%) (22). The prevalence of gastrointestinal disorders reported by other authors among patients with *S. bovis* bacteremias and/or endocarditis was 51%, 41%, and 51.7% (7, 21, 23).

Almost half of SBEC-colonized subjects had two or three subspecies concomitant colonization. The clinical features in these subjects suggest that *S. infantarius* subsp. *infantarius* co-colonization is associated with chronic liver disease. Strikingly, a previous study has shown that bacteremia caused by *S. bovis* biotype II had a hepatobiliary origin in 50% of the patients, nevertheless subtyping was not performed (24). Liver disease and/or dysfunction were associated with *S. bovis* endocarditis (50%) and bacteremia (53%) in 92 patients (23). Biliary lithiasis was associated with any SBEC subspecies, *S. infantarius* sp. and exclusively *S. infantarius* subsp. *coli* colonization. Authors reported that bacteremia due to *S. bovis* biotype II was more likely to be of biliary origin (25). Recent studies have evidenced that biliary tract pathologies were more frequent among patients with *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* and *S. infantarius* subsp. *coli* bacteremias (26, 27). A variety of liver and

gall bladder problems may result in a compromised hepatic reticuloendothelial system and other host-defense mechanisms. Moreover, alterations in hepatic secretion of bile salts and/or secretory immunoglobulin likewise portal hypertension may promote the translocation of bacteria from the intestinal lumen into the portal venous system (23).

Ulcerated hemorrhoid could provide a pathway for *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* hematogenous dissemination and meningitis (28). Previously, a case-control study established that 29.3% of patients, in which stool specimens showed positive *S. bovis* isolations, had ulcerative colitis (21). Our study identified two SBEC-colonized subjects (10.5%) with ulcerative colitis out of 19.

The relationship between *S. bovis* carriage and adenomas was previously investigated, and 11% with adenomatous polyps were fecal carriers (13). These authors failed to evidence a significant difference between *S. bovis* colonization and tubular, tubulovillous and villous adenomas. Recently, a case-control study reported that non-advanced adenoma was not associated with *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bacteremia (29). Similarly, we did not find this association between subspecies colonization and adenoma or colonic polyps. Conversely, other study enrolling a greater number of patients with premalignant and malignant colonic lesions demonstrated a statistically significant increase in the fecal carrier rate for *S. bovis* in tubulovillous, villous and CRC group over the benign polyps (12).

Our study reports a detailed medical history for one subject. Notably, prior knowledge has suggested that *S. bovis* may contribute to cancer development, particularly in chronic inflammation where normal cells can come under the influence of bacterial components, which interfere with regulatory systems cell proliferation and induce dysfunction of several metabolic and signaling pathways (30). We found only one

subject SBEC-colonized with HIV infection. Meanwhile, some case reports have described *S. bovis* bacteremia occurring in patients with advanced HIV infection, characterized by an absence of gastrointestinal disorders (31) and meningitis (32). Mortality in patients with AIDS and *S. bovis* bacteremia has been reported such as 71% (7).

Some conventional PCR-based methods have been developed to differentiate species or subspecies of SBEC (19, 33-36). Nonetheless, none of these methods were used to investigate SBEC subspecies colonization in humans collecting swab rectal specimens. All studies have used distinct culture techniques after collection and processing stool specimens. The use of molecular techniques for the sub-classification of *S. bovis/S. equinus* complex bacteria is required in order to fully understand the clinical value of SBEC subspecies infections/colonization as an early signaling of colonic malignancy or others gastrointestinal diseases (11, 37).

In summary, these real-time PCR assays provide a reliable molecular method to detect SBEC subspecies and quantify *S. gallolyticus* sp. from rectal swab specimens. These assays might be useful tool for bacteria screening and colonization-surveillance in individuals subjected to a routine colonoscopy.

Acknowledgment

We acknowledge the National Institute of Quality Health Control (INCQS/Fiocruz) and Dr. Lucia Martins Teixeira (UFRJ) for reference strains donation. This work was supported by a grant from the National Council of Scientific and Technology Development (CNPq), Brazil.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. **Noble CJ.** 1978. Carriage of group D streptococci in the human bowel. *Journal of clinical pathology* **31**:1182-1186.
2. **Beck M, Frodl R, Funke G.** 2008. Comprehensive study of strains previously designated *Streptococcus bovis* consecutively isolated from human blood cultures and emended description of *Streptococcus gallolyticus* and *Streptococcus infantarius* subsp. coli. *Journal of clinical microbiology* **46**:2966-2972.
3. **Schlegel L, Grimont F, Collins MD, Regnault B, Grimont PA, Bouvet A.** 2000. *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. coli subsp. nov., isolated from humans and food. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **50 Pt 4**:1425-1434.
4. **Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PA, Bouvet A.** 2003. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **53**:631-645.
5. **Klein RS, Recco RA, Catalano MT, Edberg SC, Casey JI, Steigbigel NH.** 1977. Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *The New England journal of medicine* **297**:800-802.
6. **Abdulmir AS, Hafidh RR, Abu Bakar F.** 2011. The association of *Streptococcus bovis/gallolyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **30**:11.
7. **Alazmi W, Bustamante M, O'Loughlin C, Gonzalez J, Raskin JB.** 2006. The association of *Streptococcus bovis* bacteremia and gastrointestinal diseases: a retrospective analysis. *Digestive diseases and sciences* **51**:732-736.
8. **Garza-Gonzalez E, Rios M, Bosques-Padilla FJ, Fritz F, Ilseung C, Gonzalez GM, Perez-Perez GI.** 2012. Immune response against *Streptococcus gallolyticus* in patients with adenomatous polyps in colon. *International journal of cancer. Journal international du cancer.*
9. **Boleij A, van Gelder MM, Swinkels DW, Tjalsma H.** 2011. Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **53**:870-878.
10. **Corredoira J, Alonso MP, Coira A, Varela J.** 2008. Association between *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis* II/1) bacteremia and noncolonic cancer. *Journal of clinical microbiology* **46**:1570.
11. **Tjalsma H, Boleij A.** 2012. Subtyping of *Streptococcus bovis* group bacteria is needed to fully understand the clinical value of *Streptococcus gallolyticus* (*S. bovis* biotype I) infection as early sign of colonic malignancy. *International journal of clinical practice* **66**:326.
12. **Burns CA, McCaughey R, Lauter CB.** 1985. The association of *Streptococcus bovis* fecal carriage and colon neoplasia: possible relationship with polyps and their premalignant potential. *The American journal of gastroenterology* **80**:42-46.
13. **Dubrow R, Edberg S, Wikfors E, Callan D, Troncale F, Vender R, Brand M, Yapp R.** 1991. Fecal carriage of *Streptococcus bovis* and colorectal adenomas. *Gastroenterology* **101**:721-725.
14. **Potter MA, Cunliffe NA, Smith M, Miles RS, Flapan AD, Dunlop MG.** 1998. A prospective controlled study of the association of *Streptococcus bovis* with colorectal carcinoma. *Journal of clinical pathology* **51**:473-474.

15. **Boleij A, Tjalsma H.** 2012. Gut bacteria in health and disease: a survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society.
16. **Glazunova OO, Raoult D, Roux V.** 2010. Partial *recN* gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. International journal of systematic and evolutionary microbiology **60**:2140-2148.
17. **Olson AB, Sibley CD, Schmidt L, Wilcox MA, Surette MG, Corbett CR.** 2010. Development of real-time PCR assays for detection of the *Streptococcus milleri* group from cystic fibrosis clinical specimens by targeting the *cpn60* and 16S rRNA genes. Journal of clinical microbiology **48**:1150-1160.
18. **Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, 3rd, Smith TF.** 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clinical microbiology reviews **19**:165-256.
19. **Jans C, Lacroix C, Meile L.** 2012. A novel multiplex PCR/RFLP assay for the identification of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex members from dairy microbial communities based on the 16S rRNA gene. FEMS microbiology letters **326**:144-150.
20. **Abdulmir AS, Hafidh RR, Bakar FA.** 2010. Molecular detection, quantification, and isolation of *Streptococcus gallolyticus* bacteria colonizing colorectal tumors: inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8. Molecular cancer **9**:249.
21. **Al-Jashamy K, Murad A, Zeehaida M, Rohaini M, Hasnan J.** 2010. Prevalence of colorectal cancer associated with *Streptococcus bovis* among inflammatory bowel and chronic gastrointestinal tract disease patients. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP **11**:1765-1768.
22. **Shanan S, Gumaa SA, Sandstrom G, Abd H.** 2011. Significant association of *Streptococcus bovis* with malignant gastrointestinal diseases. International journal of microbiology **2011**:792019.
23. **Zarkin BA, Lillemoe KD, Cameron JL, Effron PN, Magnuson TH, Pitt HA.** 1990. The triad of *Streptococcus bovis* bacteremia, colonic pathology, and liver disease. Annals of surgery **211**:786-791; discussion 791-782.
24. **Corredoira JC, Alonso MP, Garcia JF, Casariego E, Coira A, Rodriguez A, Pita J, Louzao C, Pombo B, Lopez MJ, Varela J.** 2005. Clinical characteristics and significance of *Streptococcus salivarius* bacteremia and *Streptococcus bovis* bacteremia: a prospective 16-year study. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology **24**:250-255.
25. **Fernandez-Ruiz M, Villar-Silva J, Llenas-Garcia J, Caurcel-Diaz L, Vila-Santos J, Sanz-Sanz F, Chaves F, Guerra-Vales JM.** 2010. *Streptococcus bovis* bacteraemia revisited: clinical and microbiological correlates in a contemporary series of 59 patients. The Journal of infection **61**:307-313.
26. **Gomez-Garces JL, Gil Y, Burillo A, Wilhelmi I, Palomo M.** 2012. [Diseases associated with bloodstream infections caused by the new species included in the old *Streptococcus bovis* group]. Enferm Infecc Microbiol Clin **30**:175-179.
27. **Lazarovitch T, Shango M, Levine M, Brusovansky R, Akins R, Hayakawa K, Lephart PR, Sobel JD, Kaye KS, Marchaim D.** 2012. The relationship between the new taxonomy of *Streptococcus bovis* and its clonality to colon cancer, endocarditis, and biliary disease. Infection
28. **Smith AH, Sra HK, Bawa S, Stevens R.** 2010. *Streptococcus bovis* meningitis and hemorrhoids. Journal of clinical microbiology **48**:2654-2655.
29. **Corredoira-Sanchez J, Garcia-Garrote F, Rabunal R, Lopez-Roses L, Garcia-Pais MJ, Castro E, Gonzalez-Soler R, Coira A, Pita J, Lopez-Alvarez MJ, Alonso MP, Varela J.** 2012. Association between bacteremia due to *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* I) and colorectal neoplasia: a case-control study. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **55**:491-496.
30. **Biarç J, Nguyen IS, Pini A, Gosse F, Richert S, Thierse D, Van Dorselaer A, Leize-Wagner E, Raul F, Klein JP, Scholler-Guinard M.** 2004. Carcinogenic properties of proteins with pro-

- inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S.bovis*). *Carcinogenesis* **25**:1477-1484.
31. **Manfredi R, Nanetti A, Ferri M, Calza L, Tadolini M, Chiodo F.** 1999. *Streptococcus bovis* bacteremia in patients infected with the human immunodeficiency virus: case reports and literature review. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology **18**:148-150.
 32. **de Silva T, Raychaudhuri M, Poulton M.** 2005. HIV infection associated with *Strongyloides stercoralis* colitis resulting in *Streptococcus bovis* bacteraemia and meningitis. *Sexually transmitted infections* **81**:276-277.
 33. **Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P.** 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *Journal of clinical microbiology* **36**:41-47.
 34. **Papadelli M, Manolopoulou E, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E.** 2003. Rapid detection and identification of *Streptococcus macedonicus* by species-specific PCR and DNA hybridisation. *International journal of food microbiology* **81**:231-239.
 35. **Sasaki E, Osawa R, Nishitani Y, Whiley RA.** 2004. Development of a diagnostic PCR assay targeting the Mn-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) for identification of *Streptococcus gallolyticus*. *Journal of clinical microbiology* **42**:1360-1362.
 36. **Chen HJ, Tsai JC, Chang TC, Hung WC, Tseng SP, Hsueh PR, Teng LJ.** 2008. PCR-RFLP assay for species and subspecies differentiation of the *Streptococcus bovis* group based on *groESL* sequences. *Journal of medical microbiology* **57**:432-438.
 37. **Del Campo-Moreno R.** 2012. [Is it necessary to identify the isolates of the *Streptococcus bovis* group correctly at subspecies level?]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **30**:173-174.

TABLE 1. Reference strains and clinical isolates used as controls for real-time PCR assays development targeting the *recN* and *gyrB* genes

Group	Species	Strain*	qPCR result
Streptococci	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	ATCC 9809	<i>recN</i> SGG (+)
	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	IMPG RS-51	<i>recN</i> SGG (+)
	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>coli</i>	IMPG RS-52	<i>gyrB</i> SCI (+)
	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	IMPG RS-54	<i>gyrB</i> SII (+)
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813	no amplification
	<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 7073	no amplification
	<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	no amplification
	<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 10557	no amplification
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	ATCC 903	no amplification
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	no amplification
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 33400	no amplification
Other bacteria	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	no amplification
	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 6569	no amplification
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	no amplification
Clinical isolates	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HMV 317831	<i>recN</i> SGG (+)
	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	HUSM 2011	<i>recN</i> SGP (+)
	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	HMD 6075	<i>recN</i> SGP (+)
	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HMD 6925	<i>recN</i> SGG (+)
	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HMD 305	<i>recN</i> SGG (+)

*Source of reference strains: INCQS, National Institute of Quality Health Control – Fiocruz; and IMPG, Culture Collection of Paulo de Góes Microbiology Institute - UFRJ

TABLE 2. Primers and probes sets

Name	Target	Sequence (5' --> 3')	Label	Amplicon size (bp)
F-recN SG	recN	158-CGCCGTGACATTCTGCAA-175 ^a	None	62 bp
R-recN SG	recN	222-AGATTCACCATTTGTCCGTTGA-201	None	
Pf-recN SG	recN	181-TGGTCGTTCTATCGGTC-197	FAM	
F-recN SGG/P	recN	1055-GATTTTCAAGTCCAATTCACCAAAG-1080 ^b	None	98 bp
R-recN SGG/P	recN	1135-GGTTYGTTGAAATGTAAAATTCAACAG-1107	None	
Pf-recN/SGG	recN	1085-TTCAATCGTGATGGCAA-1102	FAM	
Pv-recN/SGP	recN	1086-TCAACCGTGATGGAAA-1102	VIC	
F-gyrB SIC	gyrB	194-CGTATTCAGGAACCTTGCTTTCTTG-217 ^c	None	65 bp
R-gyrB SIC	gyrB	258-CCTTCACGTTTGTGTCAGTGATTGA-236	None	
Pf-gyrB/SIC	gyrB	219-ACCGCGTTTGCAT-234	FAM	
F-gyrB SII	gyrB	86-TTGAAAGTTATTGGTGATACAGATCGT-112 ^d	None	69 bp
R-gyrB SII	gyrB	154-AAAGATTTACCGTCTGGAGTGA-132	None	
Pv-gyrB/SII	gyrB	115-CGGTACAACCGTTCAC-130	VIC	

^a Sequence numbers based on NCBI accession no. EU917270.1 for *S. gallolyticus recN* partial gene sequence.

^b Sequence numbers based on NCBI accession no. EU917270.1 and EU917274.1 for *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus recN* partial gene sequence.

^c Sequence numbers based on NCBI accession no. EU003729.1 for *S. infantarius* subsp. *coli gyrB* partial gene sequence

^d Sequence numbers based on NCBI accession no. EU003767.1 for *S. infantarius* subsp. *infantarius gyrB* partial gene sequence

TABLE 3. Clinical characteristics* described in SBEC-colonized individuals subjected to a colonoscopy and *S. gallolyticus* sp. bacterial load

Subject	Age	Gender	Colonoscopy results	Medical history	Bacterial load/5 μ L (log ₁₀ CN)
A ^{1,4}	44	F	ADCP, HCP and DIV	UC	1.48
B ²	45	F	ADCP, DIV	HCP, HEM, DC and CG	3.30
C ²	59	F	ADCP	ADCP [#] and CG	4.64
D ^{1,2,4}	76	M	Not performed	ADCR ^a , CP, HCP, DC and BL	2.26
E ¹	57	F	DIV	ADCR ^b	1.83
F ¹	58	F	CP	DC	2.31
G ^{1,4}	50	F	DIV	CLD [§]	2.01
H ^{2,3}	62	F	DIV	UC and DC	4.76
I ^{2,3}	68	F	No alterations	BL	4.51
J ^{1,3,4}	46	F	No alterations	CLD and HEM	4.97
L ^{2,4}	64	F	HCP	CLD [§] , BL, PHG and CG	4.29
M ^{2,3}	80	F	Not performed	ADCR ^a	> 6

* ADCP, tubular adenomatous colonic polyp; HCP, hyperplastic colonic polyp; CP, colonic polyp; DIV, diverticulosis; UC, ulcerative colitis; CG, chronic gastritis; ADCR, adenocarcinoma; CLD, chronic liver disease; BL, biliary lithiasis; PHG, portal hypertensive gastropathy; HEM, hemorrhoidal disease; DC, diarrhea/constipation

tubulovillous adenoma

^a colorectal carcinoma

^b breast carcinoma

§ alcohol-induced

¹ *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*- colonized

² *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*-colonized

³ *S. infantarius* subsp. *coli*-colonized

⁴ *S. infantarius* subsp. *infantarius*-colonized

TABLE 4. Clinical characteristics* described in *S. infantarius* sp.-colonized individuals subjected to a colonoscopy

Subject	Age	Gender	Colonoscopy results	Medical history
N ¹	74	M	ADCP and DIV	ADCR ^a , HEM and BL
O ¹	57	M	HCP	AA and DC
P ¹	57	F	No alterations	DEM and CG
Q ¹	65	F	HCP and DIV	ADCR ^b , CG and BL
R ^{1,2}	60	F	No alterations	ADCP and DC
S ¹	52	F	DIV	BL
T ¹	49	F	DIV	BL

* ADCP, tubular adenomatous colonic polyp; HCP, hyperplastic colonic polyp; DIV, diverticulosis; CG, chronic gastritis; ADCR, adenocarcinoma; BL, biliary lithiasis; HEM, hemorrhoidal disease; DC, diarrhea/constipation; AA, alcohol addiction

^a lung carcinoma

^b cervical carcinoma

¹ *S. infantarius* subsp. *coli*-colonized

² *S. infantarius* subsp. *infantarius*-colonized

```

F-recN      : -----CGCCGTGACATTCTGCAA----- :
R-recN      : -----TCAACGGACAAATGGTGAATCT----- :
Pf-recN/SG  : -----TGGTCGTTCTATCGGTC----- :
SGG         : -----CGCCGTGACATTCTGCAA-TGGTCGTTCTATCGGTC-TCAACGGACAAATGGTGAATCT----- :
SGP         : -----CGCCGTGACATTCTGCAA-TGGTCGTTCTATCGGTC-TCAACGGACAAATGGTGAATCT----- :
SIC         : -----T-A-T-C-G-T-A-T-T-T-C----- :
SII         : -----T-A-T-G-T-A-T-T-T-C----- :

F-recNSGG/P : -----GATTTTCAAGTCCAATTCACCAAAG----- :
R-recNSGG/P : -----CTGTTGAATTTTACATTTCAACRAACC----- :
Pf-recN/SGG : -----TTCAATCGTGATGGCAA----- :
SGG         : -----GATTTTCAAGTCCAATTCACCAAAG-TCAATCGTGATGGCAA-CTGTTGAATTTTACATTTCAACRAACC----- :
Pv-recN/SGP : -----TCAACCGTGATGGAAA----- :
SGP         : -----GATTTTCAAGTCCAATTCACCAAAG-TCAACCGTGATGGAAA-CTGTTGAATTTTACATTTCAACRAACC----- :
SIC         : -----G-T-G-T-A-A-A-T-T----- :
SII         : -----G-T-G-T-G-A-A-C-T----- :

F-gyrBSIC   : -----CGTATTCAGGAAGTTGCTTTCTTG----- :
R-gyrBSIC   : -----TCAATCACTGACAAACGTGAAGG----- :
Pf-gyrB/SIC : -----ACCGCGGTTTGCCTAT----- :
SGG         : -----C-A-T-A-C-T-T-T-C-T-T----- :
SGP         : -----A-T-A-C-T-T-T-C-A-T-T----- :
SIC         : -----CGTATTCAGGAAGTTGCTTTCTTG-ACCGCGGTTTGCCTAT-TCAATCACTGACAAACGTGAAGG----- :
SII         : -----A-T-C----- :

F-gyrBSII   : -----TTGAAAGTTATTGGTGATACAGATCGT----- :
R-gyrBSII   : -----TCACTCCAGACGGTGAATCTTT----- :
Pv-gyrB/SII : -----CGGTACAACCGTTCAC----- :
SGG         : -----AGCT-T-C-T-A-G-T-T-T-CCA-G-T-C----- :
SGP         : -----AGCT-C-C-T-A-G-T-T-T-CCA-T-T-C----- :
SIC         : -----C-C-A-T-T-T-C----- :
SII         : -----TTGAAAGTTATTGGTGATACAGATCGT-CGGTACAACCGTTCAC-TCACTCCAGACGGTGAATCTTT----- :

```

Fig 1. Alignment of partial sequences of the *recN* and *gyrB* genes retrieved from GenBank database:

S. gallolyticus subsp. *gallolyticus* CIP105428 (**SGG**) [GenBank accession no. EU917270.1 and EU003726.1], *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* CIP105070 (**SGP**) [GenBank accession no. EU917274.1 and EU003748.1], *S. lutetiensis* CIP108103 (*S. infantarius* subsp. *coli*) (**SIC**) [GenBank accession no. EU917279.1 and EU003729.1] and *S. infantarius* subsp. *infantarius* CIP 106107 (**SII**) [GenBank accession no. EU917278.1 and EU003767.1] used in primers and probes design

VI. DISCUSSÃO GERAL

A primeira parte deste estudo dedicou-se ao desenvolvimento de ensaios moleculares utilizando a metodologia de PCR em tempo real para detecção das subespécies do complexo *S. bovis/S. equinus* consideradas clinicamente relevantes: *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. infantarius* subsp. *coli* e *S. infantarius* subsp. *infantarius*.

Inicialmente, desenvolvemos e validamos um ensaio de *qPCR* baseado no gene *recN* para detecção e quantificação da espécie *S. gallolyticus* sp. Este ensaio foi capaz de detectar e quantificar esta espécie a partir de DNA extraído tanto de cultivo bacteriano quanto de amostras clínicas, especificamente *swab* retal. O ensaio foi sensível, com limite de detecção de até 30 cópias genômicas, e específico para *S. gallolyticus* sp., porém não discriminatório para as subespécies *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* e *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. Este ensaio possibilitou a quantificação de *S. gallolyticus* sp. através de amostras coletadas por *swab* retal como também poderia ser utilizado em amostras de tecidos da mucosa intestinal conforme anteriormente descrito por ABDULAMIR *et al.* (2010). Também, seria possível o uso deste ensaio para quantificação deste agente em outras amostras clínicas como sangue, líquido e *swab* vaginal. Poderia ser utilizado como ferramenta diagnóstica em bacteremias de pacientes sob risco ou com doenças intestinais, hepáticas e/ou biliares (BECK *et al.*, 2008). Investigações acerca da colonização vaginal e mensuração da carga bacteriana de *S. gallolyticus* sp. poderia auxiliar na prevenção de meningites em neonatos causadas por *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (GAVIN *et al.*, 2003; ONOYAMA *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2010; STURT *et al.*, 2010; KLATTE *et al.*, 2012; NAGAMATSU *et al.*, 2012).

O desenvolvimento do segundo ensaio esteve condicionado ao critério de especificidade para as subespécies de *S. gallolyticus* sp. Este segundo ensaio foi desenvolvido e validado também baseado no gene *recN* e possibilita análise em formato *multiplex*. Sua utilização foi prevista como uma análise complementar ao primeiro ensaio. Diversos estudos referem que infecções por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* são mais prevalentes que *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* em casos de EI e CCR, fundamentando a importância em discriminar estas duas subespécies a partir de amostras clínicas. Recentemente, uma metanálise reforçou a significância

estatística destas associações inferindo sobre um aumento em mais de sete vezes no risco de CCR e mais de 16 vezes de EI em pacientes com infecções causadas por *S. bovis* biotipo I (*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*) quando comparada com infecções causadas por *S. bovis* biotipo II (BOLEIJ *et al.*, 2011b). Entretanto, os autores referem que a maior parte dos estudos analisados reportava apenas a nomenclatura de *S. bovis* e a ausência da identificação de subespécies foi a principal limitação declarada nesta metanálise. A simples classificação em *S. bovis* biotipo II impede a correta discriminação entre três das subespécies patogênicas do *SBEC*, que apresentam particularidades epidemiológicas já delineadas, mas não completamente esclarecidas. Notadamente, a maior parte dos estudos sobre colonização intestinal em humanos pelas subespécies do *SBEC* considerou *S. bovis* como uma única espécie e sequer reportaram seus resultados pela clássica denominação de biotipos I ou II, como no estudo realizado por AL-JASHAMY *et al.* (2010).

Autores enfatizam que *S. bovis* não deve ser considerado como uma única espécie e que técnicas moleculares devem ser utilizadas para identificação das subespécies do *SBEC*, e estes resultados devem ser informados tanto em publicações científicas como na prática médica (DEL CAMPO-MORENO, 2012; TJALSMA & BOLEIJ, 2012). Logo, desenvolvemos e validamos mais dois ensaios de *qPCR* para identificação das subespécies *S. infantarius* subsp. *coli* e *S. infantarius* subsp. *infantarius*. Estes dois ensaios também foram desenvolvidos com a previsão da sua utilização no formato *multiplex*. Notoriamente, as baixas prevalências observadas de infecções em humanos por *S. infantarius* sp. merece maiores investigações, especialmente acerca da colonização intestinal e formas de aquisição destes agentes (ABDELGADIR *et al.*, 2008; GOMEZ-GARCES *et al.*, 2012; LAZAROVITCH *et al.*, 2012).

Ensaio de *qPCR* do tipo TaqMan-MGB[®] possuem excelente sensibilidade e especificidade para sua utilização na identificação de patógenos. Podem ser considerados de fácil execução e são capazes de fornecer resultados em menos de 1 hora de análise (ESPY *et al.*, 2006; BUH GASPARIĆ *et al.*, 2010). Os ensaios desenvolvidos neste estudo possibilitam, no formato *multiplex*, analisar uma amostra utilizando apenas quatro poços de reação (duplicata) para identificação das quatro subespécies investigadas.

Algumas técnicas moleculares, principalmente *PCR/RFLP*, já foram descritas para a identificação de espécies e subespécies do *SBEC* (CHEN *et al.*, 2008; JANS *et*

al., 2012). Contudo, estas técnicas têm uma execução mais complexa, maior tempo de análise e menor sensibilidade quando comparadas com *qPCR*. Além disso, limitam-se em gerar resultados qualitativos enquanto a metodologia de *qPCR* possibilita obtenção de resultados quantitativos.

Para o nosso conhecimento os ensaios de *qPCR* propostos neste estudo compõem pela primeira vez uma opção para identificação das quatro subespécies clinicamente importantes do *SBEC* utilizando a metodologia de PCR em tempo real. Destacamos que estes ensaios poderiam ser rapidamente incorporados na rotina clínica de um laboratório de microbiologia que dispusesse de uma plataforma de *qPCR* com filtros de aquisição compatíveis com as sondas utilizadas neste estudo.

Na segunda etapa desta pesquisa delineamos um estudo transversal para investigar a colonização intestinal, pelas subespécies anteriormente citadas, de voluntários ambulatoriais submetidos à colonoscopia. Estes voluntários apresentavam risco ou já possuíam registros clínicos para doenças do cólon ou outras doenças gastrointestinais.

Pudemos observar uma prevalência geral, positividade para qualquer uma das subespécies, de 35,2% dos 54 voluntários investigados. Este percentual representa mais que o triplo do percentual médio descrito na população geral (NOBLE, 1978; FARROW *et al.*, 1983). Previamente, autores investigaram uma população semelhante àquela que incluímos em nosso estudo e puderam verificar uma prevalência de 24,7% de *S. bovis* isolado a partir de amostras fecais (AL-JASHAMY *et al.*, 2010). SHANAN *et al.* (2011) investigaram colonização intestinal por *S. bovis* e puderam relacionar com carcinoma de cólon, hepático e gástrico em 50% dos casos e com doenças hepatobiliares não malignas em torno de 30%. Pacientes que apresentam bacteremia e/ou endocardite causada por *S. bovis* podem evidenciar doenças gastrointestinais em mais de 50% dos casos (ZARKIN *et al.*, 1990; ALAZMI *et al.*, 2006). Esse percentual é ainda maior (60%) quando considerada presença de adenomas e CCR em pacientes infectados por *S. bovis* (BOLEIJ *et al.*, 2011b).

As prevalências encontradas para *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (11%) e *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (13%) foram muito semelhantes. Nosso estudo não pôde verificar as evidências descritas de que *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* está relacionado com a presença de adenomas e/ou adenocarcinomas de cólon (BOLEIJ *et al.*, 2011b). Entretanto, um recente estudo tipo caso-controle não pôde evidenciar diferença estatística entre pacientes com bacteremia por *S. gallolyticus* subsp.

gallolyticus e presença de adenoma tubular com displasia de baixo grau (CORREDOIRA-SANCHEZ *et al.*, 2012). Outro estudo recente referiu que não foi possível correlacionar presença de pólipos com colonização intestinal por *S. bovis* (SHANAN *et al.*, 2011). Nosso estudo não pôde verificar associação significativa entre os voluntários colonizados por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, ou qualquer uma das outras subespécies investigadas, e presença de pólipos ou adenomas.

Normalmente, as bacteremias causadas por *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* são descritas com uma frequência menor que *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (BECK *et al.*, 2008; LAZAROVITCH *et al.*, 2012). No entanto, GOMEZ-GARCES *et al.* (2012) relataram que em mais de 50% das bacteremias causadas pelas subespécies do SBEC tinham como agente etiológico *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. As frequências similares de colonização encontradas neste estudo para as duas subespécies de *S. gallolyticus* sp. assim como a não comprovada associação com lesões prévias do cólon (pólipos e/ou adenomas) impedem uma sugestão sobre a superioridade de qualquer uma destas em gerar infecções sistêmicas. Contudo, encontramos associação entre doença hemorroidária e colonização por ao menos uma das subespécies. Doença hemorroidária com lesões ulceradas poderia representar uma porta de entrada para disseminação sistêmica destes agentes, o que já foi relatado para meningite por *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (SMITH *et al.*, 2010).

Diarreia e/ou constipação crônicas podem estar associadas a doenças inflamatórias do cólon (MOSHKOWITZ *et al.*, 1992). Pudemos identificar esta condição nos prontuários clínicos de seis (66,6%) voluntários que estavam colonizados por ao menos uma das subespécies pesquisadas entre nove dos que apresentavam esta condição. Também identificamos que dois voluntários colonizados por alguma das subespécies apresentavam histórico para colite ulcerativa entre três registros. AL-JASHAMY *et al.* (2010) identificaram colite ulcerativa em 29,3% de 41 pacientes em que *S. bovis* foi isolado nas fezes. Considerando que realmente observamos 19 pacientes positivos para *S. bovis*, apenas 10,5% dos colonizados tinham colite ulcerativa.

As prevalências observadas entre as duas subespécies de *S. infantarius* sp. variaram em praticamente o dobro: *S. infantarius* subsp. *coli* (20,4%) e *S. infantarius* subsp. *infantarius* (11,1%). O significado de uma variação de prevalências na colonização intestinal em humanos por estas duas subespécies é desconhecido. Este

estudo buscou explorar a associação entre *S. infantarius* sp. compondo a microbiota intestinal de humanos com doenças do cólon e outras doenças gastrintestinais, algo até então não investigado. BECK *et al.* (2008) referiram que entre 58 hemoculturas positivas e identificadas como *S. bovis*, 29% deveriam ser reclassificadas como *S. infantarius* subsp. *coli*. Estes pacientes apresentavam disfunções hepáticas e biliares em 71,4% dos casos. Outro estudo relatou uma significativa associação entre patologias hepatobiliares e infecção por *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (GOMEZ-GARCES *et al.*, 2012). Nosso estudo foi capaz de encontrar associações entre doenças hepatobiliares e colonização por subespécies do SBEC. Doença do trato biliar esteve associada com colonização por ao menos uma das subespécies do SBEC e quando consideradas a colonização pelas subespécies de *S. infantarius* spp, não exclusivamente.

A colonização por *S. infantarius* sp. foi concomitante com a colonização por *S. gallolyticus* sp. em oito (42,1%) dos 19 voluntários positivos. A possibilidade dos efeitos sinérgicos neste tipo de colonização precisa ser melhor esclarecido em um número maior de amostras positivas. Pudemos verificar que a colonização concomitante por *S. infantarius* subsp. *infantarius* e outras subespécies analisadas esteve associada com doença hepática crônica. CORREDOIRA *et al.* (2005) encontraram associação significativa entre doença hepatobiliar e infecção por *S. bovis* biotipo II. Conforme esta identificação, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. infantarius* subsp. *coli* ou *S. infantarius* subsp. *infantarius* poderiam estar relacionadas com esta condição.

S. infantarius subsp. *infantarius* foi a única não encontrada como um resultado exclusivo de colonização, sempre esteve associada a outra subespécie. As infecções causadas por *S. infantarius* subsp. *infantarius* em humanos são muito pouco prevalentes (BECK *et al.*, 2008; GOMEZ-GARCES *et al.*, 2012; LAZAROVITCH *et al.*, 2012). Nossa experiência prática no laboratório de microbiologia indica que a identificação por métodos fenotípicos automatizados pode gerar resultados falso-negativos para esta subespécie, sugerindo que isto poderia contribuir para uma prevalência subestimada.

S. infantarius subsp. *coli* foi a subespécie com maior número de resultados exclusivos, seis voluntários estavam colonizados apenas por esta subespécie. Verificamos uma associação entre doença do trato biliar e colonização exclusiva por *S. infantarius* subsp. *coli*. Isto estaria de acordo com os achados de LAZAROVITCH *et*

al. (2012), que relataram envolvimento desta subespécie com patologias biliares em até 75% dos casos de bacteremia causadas por esta subespécie.

Os resultados da avaliação por colonoscopia não demonstraram diferenças significativas entre pacientes colonizados e não colonizados pelas subespécies do *SBEC*. Observamos apenas dois voluntários com adenoma túbulo-viloso e isto limitou uma comparação entre adenomas em estágio avançado com adenomas em estágio inicial. Recentemente, um estudo tipo caso-controle pode evidenciar um aumento no risco em 3,5 vezes dos pacientes apresentarem adenomas em estágio avançados concomitantes a bacteremia por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Entretanto, não puderam encontrar associação significativa para adenomas em estágio inicial e bacteremia pelo agente citado (CORREDOIRA-SANCHEZ *et al.*, 2012).

Neste estudo observamos um único voluntário com colonização concomitante de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* e *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. A história clínica deste voluntário indicava diagnóstico para CCR em 2000, ressecado no mesmo ano. Posteriormente, ele foi submetido a sucessivas avaliações colonoscópicas com resultados que ilustravam um avanço de achados pré-neoplásicos para neoplásicos tal como descrito por BOLEIJ *et al.* (2010). As implicações da colonização mista por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* e *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* na transformação das células da mucosa colônica e uma possível evolução desde estágios iniciais de adenoma até adenocarcinoma ainda não foi estudado e merece maiores investigações.

Pudemos identificar uma voluntária com infecção pelo vírus *HIV* sob tratamento com antiretrovirais. Esta voluntária apresentou positividade para colonização por *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* e *S. gallolyticus* subsp. *coli*, com número de cópias para *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* calculado em mais de 32×10^3 por 5µL de amostra. No prontuário clínico constava, além de litíase biliar, aumento de linfonodo inguinal a direita com pesquisa negativa para bacilo álcool-ácido resistente (B.A.A.R) e fungos. MANFREDI *et al.* (1999) referem que bacteremia episódica e recorrente causada por *S. bovis* em pacientes infectados pelo vírus *HIV* deve ser considerada mesmo que estes não apresentem lesões de cólon, principalmente se complicações hepatobiliares forem constatadas.

Neste estudo pudemos desenvolver e validar através de um método molecular uma nova alternativa para detecção das quatro subespécies do *SBEC* consideradas patogênicas, que anteriormente eram descritas como uma única espécie denominada

S. bovis. Os ensaios desenvolvidos poderão ser utilizados para correta identificação de isolados provenientes de inúmeros sítios infecciosos bem como diretamente de amostras biológicas. Os ensaios de *qPCR* possuem excelente sensibilidade, especificidade e facilidade de execução para implementação em laboratórios de pesquisa ou laboratórios de microbiologia clínica.

Ainda há muito a ser explorado sobre as implicações clínicas relacionadas com a colonização intestinal por cada uma das quatro subespécies do *SBEC* descritas como patogênicas em humanos. A maior parte dos estudos considera *S. bovis* como uma única espécie, impedindo comparações entre as subespécies. Outro fator limitante para comparações está relacionado com as metodologias para identificação. Nosso estudo baseou seus resultados em um método molecular enquanto a maioria dos estudos publicados até o momento refere isolamento por cultivo e métodos fenotípicos de identificação.

Nosso estudo pôde inferir que uma população sob risco ou com doenças do cólon e outras doença gastrintestinais apresenta um percentual três vezes maior de colonização por subespécies do *SBEC* que a população saudável. Doença hemorroidária e doença do trato biliar foram associadas com colonização por ao menos uma das subespécies do *SBEC* investigadas. A colonização mista de *S. infantarius* subsp. *infantarius* com outras subespécies do *SBEC* esteve associada com doença hepática crônica e que a colonização exclusiva por *S. infantarius* subsp. *coli* esteve relacionada com doença do trato biliar.

Diante do exposto, verificamos que novos estudos com delineamentos tipo caso-controle e coorte devem ser desenvolvidos. Prioritariamente devem submeter todos os voluntários à colonoscopia e a coleta de amostras deve ser realizada em diversos segmentos do cólon. A análise das amostras deve ser realizada por métodos moleculares, preferencialmente *qPCR*. Desta forma, as lacunas que ainda envolvem a relação entre colonização intestinal por subespécies do *SBEC* com adenomas e CCR em diferentes estágios poderiam ser esclarecidas. Outras patologias gastrintestinais, como disfunções hepatobiliares e doenças inflamatórias do cólon, também devem ser alvo de novas investigações em indivíduos colonizados por subespécies do *SBEC*.

VII. CONCLUSÕES

- Foi desenvolvido e validado o ensaio de *qPCR* do tipo TaqMan-MGB[®] para detecção e quantificação de *Streptococcus gallolyticus* sp.;
- Foram desenvolvidos e validados os ensaios de *qPCR* do tipo TaqMan-MGB[®] para detecção de *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* e *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* baseado em sequencia parcial do gene *recN*;
- Foram desenvolvidos e validados os ensaios de *qPCR* do tipo TaqMan-MGB[®] para detecção de *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* e *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* baseado em sequencia parcial do gene *gyrB*;
- O percentual de colonização intestinal para ao menos uma subespécie do SBEC entre 54 voluntários investigados foi de 35,2%: *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (11,1%), *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (13%), *S. infantarius* subsp. *coli* (20,4%) e *S. infantarius* subsp. *infantarius* (11,1%);
- Doença hemorroidária esteve relacionada com colonização para ao menos uma subespécie; doença do trato biliar esteve relacionada com colonização para ao menos uma subespécie e com colonização por *S. infantarius* sp.; doença do trato biliar esteve relacionada com colonização exclusiva por *S. infantarius* subsp. *coli*; doença hepática esteve relacionada com *S. infantarius* subsp. *infantarius* quando em colonização mista.

VIII. PERSPECTIVAS

São perspectivas do nosso estudo, através da elaboração de novos projetos de pesquisa, as seguintes investigações:

- Avaliar a colonização da mucosa do cólon pelas subespécies do *SBEC* em pacientes submetidos à colonoscopia em fragmentos dos seguintes tecidos: mucosa normal, mucosa com edema, mucosa com inflamação aguda, mucosa com inflamação crônica, mucosa hiperplásica, pólipos hiperplásicos, adenoma tubular, adenoma túbulo-viloso, adenoma viloso e adenocarcinoma;
- Avaliar a colonização da mucosa retal pelas subespécies do *SBEC* em pacientes com doença hemorroidária;
- Avaliar a colonização intestinal pelas subespécies do *SBEC* em pacientes cirróticos com CHILD-PUGH A, B e C;
- Investigar a prevalência de bacteremia/EI causadas pelas subespécies do *SBEC* em nosso meio;
- Investigar a prevalência de *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* em gestantes através de coleta vaginal em período pré-natal;
- Investigar a prevalência de meningites em neonatos causada por *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* a partir do líquido.

As perspectivas descritas acima estão baseadas nos ensaios de PCR em tempo real desenvolvidos neste estudo e poderão auxiliar nas investigações epidemiológicas acerca das implicações clínicas relacionadas com estas subespécies.

IX. REFERÊNCIAS

- ABDELGADIR, W., *et al.* A traditional Sudanese fermented camel's milk product, Gariss, as a habitat of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. **Int J Food Microbiol**, v.127, n.3, p.215-9. Oct 31, 2008.
- ABDULAMIR, A. S., *et al.* The association of *Streptococcus bovis/galloyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role. **J Exp Clin Cancer Res**, v.30, p.11, 2011.
- ABDULAMIR, A. S., *et al.* Molecular detection, quantification, and isolation of *Streptococcus galloyticus* bacteria colonizing colorectal tumors: inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8. **Mol Cancer**, v.9, p.249, 2010.
- ABDULAMIR, A. S., *et al.* Investigation into the controversial association of *Streptococcus galloyticus* with colorectal cancer and adenoma. **Bmc Cancer**, v.9, p.403, 2009.
- AL-JASHAMY, K., *et al.* Prevalence of colorectal cancer associated with *Streptococcus bovis* among inflammatory bowel and chronic gastrointestinal tract disease patients. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.11, n.6, p.1765-8, 2010.
- ALAZMI, W., *et al.* The association of *Streptococcus bovis* bacteremia and gastrointestinal diseases: a retrospective analysis. **Dig Dis Sci**, v.51, n.4, p.732-6. Apr, 2006.
- APSINGI, S., *et al.* Late *Streptococcus bovis* infection of knee arthroplasty and its association with carcinoma of the colon: a case report. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**, v.15, n.6, p.761-2. Jun, 2007.
- BECK, M., *et al.* Comprehensive study of strains previously designated *Streptococcus bovis* consecutively isolated from human blood cultures and emended description of *Streptococcus galloyticus* and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*. **J Clin Microbiol**, v.46, n.9, p.2966-72. Sep, 2008.
- BEEBE, J. L. & E. W. KONEMAN. Recovery of uncommon bacteria from blood: association with neoplastic disease. **Clin Microbiol Rev**, v.8, n.3, p.336-56. Jul, 1995.
- BIARC, J., *et al.* Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S.bovis*). **Carcinogenesis**, v.25, n.8, p.1477-84. Aug, 2004.
- BLEIBEL, W., *et al.* *Streptococcus bovis* endophthalmitis: a unique presentation of colon cancer. **Dig Dis Sci**, v.52, n.9, p.2336-9. Sep, 2007.
- BOLEIJ, A., *et al.* Bacterial responses to a simulated colon tumor microenvironment. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.11, n.10, p.851-62. Oct, 2012a.
- BOLEIJ, A., *et al.* Selective antibody response to *Streptococcus galloyticus* pilus proteins in colorectal cancer patients. **Cancer Prev Res (Phila)**, v.5, n.2, p.260-5. Feb, 2012b.

BOLEIJ, A., *et al.* Surface-affinity profiling to identify host-pathogen interactions. **Infect Immun**, v.79, n.12, p.4777-83. Dec, 2011a.

BOLEIJ, A., *et al.* Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. **Clin Infect Dis**, v.53, n.9, p.870-8. Nov, 2011b.

BOLEIJ, A., *et al.* Increased exposure to bacterial antigen RpL7/L12 in early stage colorectal cancer patients. **Cancer**, v.116, n.17, p.4014-22. Sep 1, 2010.

BOLEIJ, A., *et al.* Association between *Streptococcus bovis* and colon cancer. **J Clin Microbiol**, v.47, n.2, p.516. Feb, 2009.

BOUVET, A., *et al.* *Streptococcus infantarius* sp. nov. related to *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equinus*. **Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets**, v.418, p.393-5, 1997.

BUH GASPARIC, M., *et al.* Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.396, n.6, p.2023-9. Mar, 2010.

BURNETT-HARTMAN, A. N., *et al.* Infectious agents and colorectal cancer: a review of *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, JC virus, and human papillomavirus. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.17, n.11, p.2970-9. Nov, 2008.

CHEN, H. J., *et al.* PCR-RFLP assay for species and subspecies differentiation of the *Streptococcus bovis* group based on *groESL* sequences. **J Med Microbiol**, v.57, n.Pt 4, p.432-8. Apr, 2008.

CHEUNG, M., *et al.* Neonate with late onset *Streptococcus bovis* meningitis: case report and review of the literature. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.19, n.9, p.891-3. Sep, 2000.

COFFEY, S., *et al.* The increasing incidence of *Streptococcus bovis* endocarditis and bacteraemia: a case series from 1997 to 2010. **Int J Cardiol**, v.161, n.2, p.111-3. Nov 15, 2012.

COHEN, L. F., *et al.* *Streptococcus bovis* infection of the central nervous system: report of two cases and review. **Clin Infect Dis**, v.25, n.4, p.819-23. Oct, 1997.

COLLINS, D., *et al.* Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. **Lancet Oncol**, v.12, n.5, p.504-12. May, 2011.

CORREDOIRA-SANCHEZ, J., *et al.* Association between bacteremia due to *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* I) and colorectal neoplasia: a case-control study. **Clin Infect Dis**, v.55, n.4, p.491-6. Aug, 2012.

CORREDOIRA, J., *et al.* Characteristics of *Streptococcus bovis* endocarditis and its differences with *Streptococcus viridans* endocarditis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.27, n.4, p.285-91. Apr, 2008a.

CORREDOIRA, J., *et al.* Association between *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis* II/1) bacteremia and noncolonic cancer. **J Clin Microbiol**, v.46, n.4, p.1570. Apr, 2008b.

CORREDOIRA, J. C., *et al.* Clinical characteristics and significance of *Streptococcus salivarius* bacteremia and *Streptococcus bovis* bacteremia: a prospective 16-year study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.24, n.4, p.250-5. Apr, 2005.

COUNIHAN-EDGAR, K. L., *et al.* Genotypic characterization of *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* isolates from sea otters with infective endocarditis and/or septicemia and from environmental mussel samples. **J Clin Microbiol**, v.50, n.12, p.4131-3. Dec, 2012.

DAJANI, A. S., *et al.* Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. **GMDA Bull**, v.58, n.1, p.14-7. Mar, 1991.

DAS NEVES, F. J., *et al.* [Colon and rectal cancer mortality in Brazilian capitals, 1980-1997]. **Arq Gastroenterol**, v.42, n.1, p.63-70. Jan-Mar, 2005.

DE SILVA, T., *et al.* HIV infection associated with *Strongyloides stercoralis* colitis resulting in *Streptococcus bovis* bacteraemia and meningitis. **Sex Transm Infect**, v.81, n.3, p.276-7. Jun, 2005.

DEL CAMPO-MORENO, R. [Is it necessary to identify the isolates of the *Streptococcus bovis* group correctly at subspecies level?]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.30, n.4, p.173-4. Apr, 2012.

DURANTE-MANGONI, E., *et al.* Current features of infective endocarditis in elderly patients: results of the International Collaboration on Endocarditis Prospective Cohort Study. **Arch Intern Med**, v.168, n.19, p.2095-103. Oct 27, 2008.

DUVAL, X., *et al.* Definite *Streptococcus bovis* endocarditis: characteristics in 20 patients. **Clin Microbiol Infect**, v.7, n.1, p.3-10. Jan, 2001.

ELLMERICH, S., *et al.* Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. **Carcinogenesis**, v.21, n.4, p.753-6. Apr, 2000.

ESPY, M. J., *et al.* Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clin Microbiol Rev**, v.19, n.1, p.165-256. Jan, 2006.

FACKLAM, R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clin Microbiol Rev**, v.15, n.4, p.613-30. Oct, 2002.

FARROW, J. A., *et al.* Taxonomic studies on some group D streptococci. **J Gen Microbiol**, v.129, n.5, p.1423-32. May, 1983.

FERNANDEZ-RUIZ, M., *et al.* *Streptococcus bovis* bacteraemia revisited: clinical and microbiological correlates in a contemporary series of 59 patients. **J Infect**, v.61, n.4, p.307-13. Oct, 2010.

FERRARI, A., *et al.* Colonoscopy is mandatory after *Streptococcus bovis* endocarditis: a lesson still not learned. Case report. **World Journal of Surgical Oncology**, v.6, p.49, 2008.

FERREIROS, E., *et al.* Epidemiologic, clinical, and microbiologic profile of infective endocarditis in Argentina: a national survey. The Endocarditis Infecciosa en la Republica Argentina-2 (EIRA-2) Study. **Am Heart J**, v.151, n.2, p.545-52. Feb, 2006.

FLORET, N., *et al.* A cluster of bloodstream infections caused by *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* that involved 5 preterm neonates in a university hospital during a 2-month period. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.31, n.2, p.194-6. Feb, 2010.

GARCIA-PAIS, M. J., *et al.* [*Streptococcus bovis* bacteremia. What explorations should be performed?]. **Med Clin (Barc)**, v.139, n.1, p.45. Jun 2, 2012.

GARZA-GONZALEZ, E., *et al.* Immune response against *Streptococcus gallolyticus* in patients with adenomatous polyps in colon. **Int J Cancer**. Feb 29, 2012.

GAVIN, P. J., *et al.* Neonatal sepsis caused by *Streptococcus bovis* variant (biotype II/2): report of a case and review. **J Clin Microbiol**, v.41, n.7, p.3433-5. Jul, 2003.

GIANNITSIOTI, E., *et al.* Characteristics and regional variations of group D streptococcal endocarditis in France. **Clin Microbiol Infect**, v.13, n.8, p.770-6. Aug, 2007.

GLAZUNOVA, O. O., *et al.* Partial *recN* gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.60, n.Pt 9, p.2140-8. Sep, 2010.

GOLD, J. S., *et al.* Association of *Streptococcus bovis* bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. **Arch Surg**, v.139, n.7, p.760-5. Jul, 2004.

GOMEZ-GARCES, J. L., *et al.* [Diseases associated with bloodstream infections caused by the new species included in the old *Streptococcus bovis* group]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.30, n.4, p.175-9. Apr, 2012.

GONZALEZ, C. A. & E. RIBOLI. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. **Eur J Cancer**, v.46, n.14, p.2555-62. Sep, 2010.

GONZLEZ-QUINTELA, A., *et al.* Prevalence of liver disease in patients with *Streptococcus bovis* bacteraemia. **J Infect**, v.42, n.2, p.116-9. Feb, 2001.

GRANT, R. J., *et al.* *Streptococcus bovis* meningitis in an infant. **J Clin Microbiol**, v.38, n.1, p.462-3. Jan, 2000.

GUPTA, A., *et al.* *Streptococcus bovis* endocarditis, a silent sign for colonic tumour. **Colorectal Disease**, v.12, n.3, p.164-71. Mar, 2010.

HAIMOWITZ, M. D., *et al.* A blood donor with bacteraemia. **Lancet**, v.365, n.9470, p.1596. Apr 30-May 6, 2005.

HERRERO, I. A., *et al.* Reevaluation of *Streptococcus bovis* endocarditis cases from 1975 to 1985 by 16S ribosomal DNA sequence analysis. **J Clin Microbiol**, v.40, n.10, p.3848-50. Oct, 2002.

HEWITSON, P., *et al.* Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemocult): an update. **Am J Gastroenterol**, v.103, n.6, p.1541-9. Jun, 2008.

HINSE, D., *et al.* Differentiation of species of the *Streptococcus bovis/equinus*-complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry in comparison to *sodA* sequence analyses. **Syst Appl Microbiol**, v.34, n.1, p.52-7. Feb, 2011.

HOEN, B., *et al.* Emergence of endocarditis due to group D streptococci: findings derived from the merged database of the International Collaboration on Endocarditis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.24, n.1, p.12-6. Jan, 2005.

HOOPER, L. V. & J. I. GORDON. Commensal host-bacterial relationships in the gut. **Science**, v.292, n.5519, p.1115-8. May 11, 2001.

INCA. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil - 1. Neoplasias - Epidemiologia. 2. Neoplasias - Mortalidade. 3. Incidência. 4. Brasil. **I. N. D. Câncer**. Rio de Janeiro, Brasil: INCA 2011.

JANS, C., *et al.* A novel multiplex PCR/RFLP assay for the identification of *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* complex members from dairy microbial communities based on the 16S rRNA gene. **FEMS Microbiol Lett**, v.326, n.2, p.144-50. Jan, 2012.

JOLOBE, O. M. Special considerations apply when *Streptococcus bovis* is the culprit pathogen. **American Journal of Emergency Medicine**, v.28, n.2, p.253. Feb, 2010.

KEUSCH, G. T. Opportunistic infections in colon carcinoma. **Am J Clin Nutr**, v.27, n.12, p.1481-5. Dec, 1974.

KLATTE, J. M., *et al.* A longitudinal case series description of meningitis due to *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* in infants. **J Clin Microbiol**, v.50, n.1, p.57-60. Jan, 2012.

KLEIN, R. S., *et al.* Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. **N Engl J Med**, v.297, n.15, p.800-2. Oct 13, 1977.

KUPFERWASSER, I., *et al.* Clinical and morphological characteristics in *Streptococcus bovis* endocarditis: a comparison with other causative microorganisms in 177 cases. **Heart**, v.80, n.3, p.276-80. Sep, 1998.

LAGIER, J. C., *et al.* Human gut microbiota: repertoire and variations. **Front Cell Infect Microbiol**, v.2, p.136, 2012.

LAZAROVITCH, T., *et al.* The relationship between the new taxonomy of *Streptococcus bovis* and its clonality to colon cancer, endocarditis, and biliary disease. **Infection**. Aug 11, 2012.

- LI, Q., *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of the microbiota in ulcerated and non-ulcerated regions in the patients with Crohn's disease. **PLoS One**, v.7, n.4, p.e34939, 2012.
- LIN, I. H., *et al.* Sequencing and comparative genome analysis of two pathogenic *Streptococcus gallolyticus* subspecies: genome plasticity, adaptation and virulence. **PLoS One**, v.6, n.5, p.e20519, 2011.
- LIN, L. H., *et al.* Rectal swab sampling followed by an enrichment culture-based real-time PCR assay to detect *Salmonella enterocolitis* in children. **Clin Microbiol Infect**, v.17, n.9, p.1421-5. Sep, 2011.
- MANFREDI, R., *et al.* *Streptococcus bovis* bacteremia in patients infected with the human immunodeficiency virus: case reports and literature review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.18, n.2, p.148-50. Feb, 1999.
- MARCHESI, J. R., *et al.* Towards the human colorectal cancer microbiome. **PLoS One**, v.6, n.5, p.e20447, 2011.
- MC, C. W. & J. M. MASON, 3RD. Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case. **J Med Assoc State Ala**, v.21, n.6, p.162-6. Dec, 1951.
- MCKENNA, A. J., *et al.* Long-term gastrointestinal outcomes after *Streptococcus bovis* bacteraemia. **Int J Clin Pract**, v.65, n.11, p.1203-5. Nov, 2011.
- MOSHKOWITZ, M., *et al.* *Streptococcus bovis* endocarditis as a presenting manifestation of idiopathic ulcerative colitis. **Postgrad Med J**, v.68, n.805, p.930-1. Nov, 1992.
- NAGAMATSU, M., *et al.* Neonatal meningitis caused by *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.18, n.2, p.265-8. Apr, 2012.
- NOBLE, C. J. Carriage of group D streptococci in the human bowel. **J Clin Pathol**, v.31, n.12, p.1182-6. Dec, 1978.
- NOGUCHI, N., *et al.* Association of tannase-producing *Staphylococcus lugdunensis* with colon cancer and characterization of a novel tannase gene. **J Gastroenterol**, v.42, n.5, p.346-51. May, 2007.
- NOVAIS, C. M. & M. PIRES-ALVES. PCR em tempo real - Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista Biotecnológica Ciência & Desenvolvimento**, v.33, p.10-13, 2004.
- OGUNTOYINBO, F. A., *et al.* Analysis of bacterial communities of traditional fermented West African cereal foods using culture independent methods. **Int J Food Microbiol**, v.145, n.1, p.205-10. Jan 31, 2011.
- OLSON, A. B., *et al.* Development of real-time PCR assays for detection of the *Streptococcus milleri* group from cystic fibrosis clinical specimens by targeting the *cpn60* and 16S rRNA genes. **J Clin Microbiol**, v.48, n.4, p.1150-60. Apr, 2010.

ONOHAMA, S., *et al.* Neonatal bacterial meningitis caused by *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. **J Med Microbiol**, v.58, n.Pt 9, p.1252-4. Sep, 2009.

OSAWA, R., *et al.* *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; gallate degrading organisms formerly assigned to *Streptococcus bovis*. **Syst Appl Microbiol**, v.18, p.74-78, 1995.

PARK, H. K., *et al.* Real-time PCR assays for the detection and quantification of *Streptococcus pneumoniae*. **FEMS Microbiol Lett**. Aug 23, 2010.

PARSONNET, J., *et al.* *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. **N Engl J Med**, v.325, n.16, p.1127-31. Oct 17, 1991.

POTTER, M. A., *et al.* A prospective controlled study of the association of *Streptococcus bovis* with colorectal carcinoma. **J Clin Pathol**, v.51, n.6, p.473-4. Jun, 1998.

POULSEN, L. L., *et al.* *Enterococcus* and *Streptococcus* spp. associated with chronic and self-medicated urinary tract infections in Vietnam. **Bmc Infectious Diseases**, v.12, p.320, 2012.

POYART, C., *et al.* Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.52, n.Pt 4, p.1247-55. Jul, 2002.

ROMERO, B., *et al.* Reidentification of *Streptococcus bovis* isolates causing bacteremia according to the new taxonomy criteria: still an issue? **J Clin Microbiol**, v.49, n.9, p.3228-33. Sep, 2011.

ROWLAND, I. R. The role of the gastrointestinal microbiota in colorectal cancer. **Curr Pharm Des**, v.15, n.13, p.1524-7, 2009.

RUIZ JUNIOR, E., *et al.* A study of infectious endocarditis in Ribeirao Preto, SP-Brazil. Analysis of cases occurring between 1992 and 1997. **Arq Bras Cardiol**, v.74, n.3, p.217-31. Mar, 2000.

RUSNIOK, C., *et al.* Genome sequence of *Streptococcus gallolyticus*: insights into its adaptation to the bovine rumen and its ability to cause endocarditis. **Journal of Bacteriology**, v.192, n.8, p.2266-76. Apr, 2010.

SASAKI, E., *et al.* Development of a diagnostic PCR assay targeting the Mn-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) for identification of *Streptococcus gallolyticus*. **J Clin Microbiol**, v.42, n.3, p.1360-2. Mar, 2004.

SCHLEGEL, L., *et al.* New group D streptococcal species. **Indian Journal of Medical Research**, v.119 Suppl, p.252-6. May, 2004.

SCHLEGEL, L., *et al.* Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.53, n.Pt 3, p.631-45. May, 2003.

SCHLEGEL, L., *et al.* *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.50 Pt 4, p.1425-34. Jul, 2000.

SHANAN, S., *et al.* Significant association of *Streptococcus bovis* with malignant gastrointestinal diseases. **Int J Microbiol**, v.2011, p.792019, 2011.

SHEBL, F. M., *et al.* Opportunistic intestinal infections and risk of colorectal cancer among people with AIDS. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.28, n.9, p.994-99. Sep, 2012.

SIBLEY, C. D., *et al.* Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. **Infection Genetics and Evolution**, v.12, n.3, p.505-21. Apr, 2012.

SILLANPAA, J., *et al.* A collagen-binding adhesin, Acb, and ten other putative MSCRAMM and pilus family proteins of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* Group, biotype I). **Journal of Bacteriology**, v.191, n.21, p.6643-53. Nov, 2009.

SMITH, A. H., *et al.* *Streptococcus bovis* meningitis and hemorrhoids. **J Clin Microbiol**, v.48, n.7, p.2654-5. Jul, 2010.

STURT, A. S., *et al.* *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* (biotype II/2), a newly reported cause of adult meningitis. **J Clin Microbiol**, v.48, n.6, p.2247-9. Jun, 2010.

THUNY, F., *et al.* Management of infective endocarditis: challenges and perspectives. **Lancet**, v.379, n.9819, p.965-75. Mar 10, 2012.

TJALSMA, H. & A. BOLEIJ. Subtyping of *Streptococcus bovis* group bacteria is needed to fully understand the clinical value of *Streptococcus gallolyticus* (*S. bovis* biotype I) infection as early sign of colonic malignancy. **Int J Clin Pract**, v.66, n.3, p.326. Mar, 2012.

TJALSMA, H., *et al.* Profiling the humoral immune response in colon cancer patients: diagnostic antigens from *Streptococcus bovis*. **Int J Cancer**, v.119, n.9, p.2127-35. Nov 1, 2006.

TOLLER, I. M., *et al.* Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.108, n.36, p.14944-9. Sep 6, 2011.

TRIPODI, M. F., *et al.* Molecular epidemiology of *Streptococcus bovis* causing endocarditis and bacteraemia in Italian patients. **Clin Microbiol Infect**, v.11, n.10, p.814-9. Oct, 2005.

TRIPODI, M. F., *et al.* *Streptococcus bovis* endocarditis and its association with chronic liver disease: an underestimated risk factor. **Clin Infect Dis**, v.38, n.10, p.1394-400. May 15, 2004.

VASKA, V. L. & J. L. FAOAGALI. *Streptococcus bovis* bacteraemia: identification within organism complex and association with endocarditis and colonic malignancy. **Pathology**, v.41, n.2, p.183-6. Feb, 2009.

VILAICHONE, R. K., *et al.* Spontaneous bacterial peritonitis caused by *Streptococcus bovis*: case series and review of the literature. **Am J Gastroenterol**, v.97, n.6, p.1476-9. Jun, 2002.

VILARRASA, N., *et al.* *Streptococcus bovis* meningitis in a healthy adult patient. **Scand J Infect Dis**, v.34, n.1, p.61-2, 2002.

VOGELMANN, R. & M. R. AMIEVA. The role of bacterial pathogens in cancer. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, n.1, p.76-81. Feb, 2007.

VOLLMER, T., *et al.* Interactions between endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates and human endothelial cells. **Bmc Microbiology**, v.10, p.78, 2010.

WAISBERG, J., *et al.* Infectious endocarditis from *Streptococcus bovis* associated with colonic carcinoma: case report and literature review. **Arq Gastroenterol**, v.39, n.3, p.177-80. Jul-Sep, 2002.

WANG, S. M., *et al.* Surveillance of shigellosis by real-time PCR suggests underestimation of shigellosis prevalence by culture-based methods in a population of rural China. **J Infect**, v.61, n.6, p.471-5. Dec, 2010.

WHO. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Infection with *Helicobacter pylori* (Group 1). W. H. O.-. **Iarc**. 61: 177 p. 1994.

WITTWER, C. T. & N. KUSUKAWA. Real-Time PCR and Melting Analysis. In: D. H. Persing (Ed.). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. Washington, DC: **ASM Press**, v.1, 2011. Real-Time PCR and Melting Analysis, p.63-81

ZARKIN, B. A., *et al.* The triad of *Streptococcus bovis* bacteremia, colonic pathology, and liver disease. **Ann Surg**, v.211, n.6, p.786-91; discussion 791-2. Jun, 1990.

ANEXO A. Apresentações de trabalhos em Congressos Internacionais

Palermo, Italy 4 - 8 September 2011



XVIII Lancefield International Symposium

ABSTRACT BOOK

Session 5

New tools in streptococcal research

●

DEVELOPMENT OF REAL-TIME PCR ASSAY FOR DETECTION OF THE *STREPTOCOCCUS GALLOLYTICUS* BY TARGETING THE *recN* GENE.PAULO GUILHERME MARKUS LOPES¹, PEDRO ALVES d'AZEVEDO¹

1. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – Porto Alegre, RS – Brazil

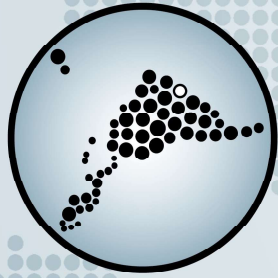
Objectives: Intestinal bacteria have been implicated in colorectal cancer pathology. Our aim was to develop a real-time PCR (RT-PCR) assay to expedite the detection and quantification of *S. gallolyticus*. The *recN* gene was chosen as a target using a TaqMan MGB probe.

Methods: Four clinical strains and ten control strains were utilized to develop this RT-PCR assay. The control bacterial strain used to test the sensitivity and specificity of the RT-PCR assay was *Streptococcus gallolyticus* ATCC 9809, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 33400, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* ATCC 6569 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The specimens were grown on 5% sheep blood agar. A single colony was inoculated into 1 mL of saline solution and serial dilutions were performed for *S. gallolyticus* quantification. Bacterial DNA was extracted by boiling preparation. Amplification and detection were carried out by the StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Results: The sensitivity of the RT-PCR assay was verified with *S. gallolyticus* strain using 40 amplification cycles with a dilution series from 80 to 1 CFU/uL. The detection limit was 3 CFU/uL. For assessment of the assay specificity was considered the possibility that crossing points from closely related *Streptococcus spp.* and other intestinal bacteria showed false positives. All the negative control strains were tested using 40 amplification cycles and 10 to 20 ng/uL of genomic DNA. Only targeted *S. gallolyticus* was detected defining the assay specificity of 100%.

Conclusion: Development of RT-PCR assay targeting *recN* gene has showed great detection ability for *S. gallolyticus*. Therefore, this assay is useful as a novel tool for assessment of the presence of *S. gallolyticus* in clinical samples.

Financial support: CNPq



XXI ALAM

Congresso Latinoamericano
de Microbiologia

SANTOS - BRASIL

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO ENTEROCOCCUS E DO COMPLEXO STREPTOCOCCUS BOVIS/EQUINUS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE MALDI-TOF MS com a autoria de: MARKUS-LOPES, PG, REITER, KC, PAIM, TGS, OLIVEIRA, CF, D'AZEVEDO, PA foi apresentado na forma de pôster durante o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM).

De 28 de outubro a 1 de novembro de 2012 Mendes Convention Center, Santos, SP

Carlos P. Taborda

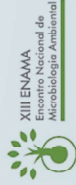
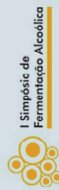
Prof. Dr. Carlos P. Taborda

Presidente da Associação Latinoamericana de Microbiologia

Adalberto Pessoa Junior

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

Presidente do XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia



Organização e realização

Autores: Markus-Lopes PG, Reiter KC, Paim TGS, Oliveira CF, d'Azevedo PA.

Título: Identificação de espécies do gênero *Enterococcus* e do complexo *Streptococcus bovis/equinus* utilizando a metodologia de MALDI-TOF MS.

Introdução: A metodologia *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight* (MALDI-TOF) *Mass Spectroscopy* (MS) tem demonstrado excelente acurácia na identificação de bactérias com relevância clínica. A correta identificação está condicionada ao reconhecimento dos padrões espectroscópicos de proteínas característicos e conservados para as distintas espécies e subespécies bacterianas. Logo, realizamos um estudo comparativo entre os métodos fenotípicos de identificação bacteriana e MALDI-TOF MS.

Objetivo: Comparar uma metodologia espécie-específica baseada no espectro de massas de proteínas bacterianas (MALDI-TOF MS) com a metodologia fenotípica convencional na identificação de cocos gram-positivos no laboratório clínico.

Casuística e métodos: A amostra foi composta de isolados clínicos do gênero *Enterococcus* (n=37) e do complexo *Streptococcus bovis/equinus* (n=8), além de sete cepas padrão ATCC (*E. faecalis* ATCC 29212, *S. gallolyticus* ATCC 9809, *S. agalactiae* ATCC 13813, *S. oralis* ATCC 10557, *S. salivarius* ATCC 7073 e *S. mutans* ATCC 25175 e *S. parasanguinis* ATCC 903). A identificação convencional foi realizada baseada em provas bioquímicas como produção ácida, capacidade de crescimento, atividades enzimáticas entre outras. Os ensaios de MALDI-TOF MS foram realizados no VITEK® MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França).

Resultados e conclusões: A identificação bacteriana pelo método de espectrometria de massas obteve 100% de concordância com a metodologia fenotípica convencional para todas as amostras analisadas, incluindo os isolados clínicos e as cepas padrão ATCC. Os isolados clínicos do complexo *S. bovis/equinus* assim como a cepa padrão ATCC 9809 puderam ser identificados em nível de subespécies através da metodologia MALDI-TOF MS e concordaram com a classificação em biótipos (I, II/1 e II/2) anteriormente definida pela análise fenotípica. Foram identificados cinco isolados como *S. gallolyticus* spp *gallolyticus*, dois *S. gallolyticus* spp *pasteurianus* e um *S. infantarius* spp *coli*. Nos isolados clínicos do gênero *Enterococcus* puderam ser identificadas cinco espécies: *E.*

hirae, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. faecium* e *E. faecalis*. Embora o nível de concordância tenha sido pleno, ainda se faz necessário avaliar o grau de especificidade em uma amostra com maior número de isolados do gênero *Streptococcus*, especialmente do complexo *S. bovis/equinus*.

Apoio: CNPq.

ANEXO B. Regras para submissão: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures, must be uploaded separately as supplementary file.

The manuscript should be arranged in the following order:

Running title: with up to 40 characters (letters and spaces)

Title: with up to 250 characters

Author's names: without titles or graduations

Institutional affiliations: full address of the corresponding author only

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

REFERENCES

must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author. CLICK HERE [+]

FIGURES AND TABLES MUST BE UNDERSTANDABLE WITHOUT REFERENCE TO THE TEXT

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover.

Tables: should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Technical Notes: Technical Notes should communicate rapidly single novel techniques or original technical advances. The entire note should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables (it means around 10 double-spaced typed Word file maximum). The text must not be not divided into sections. Therefore, the state of art must be very briefly presented; results must be rapidly presented and discussed at a time. Complementary tables and figures may be published as supplementary data. References must be limited to few essential ones and cited at the end of the note, using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Short communications: should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Alternative format: manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication.

Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

In case of clinical trials it's mandatory to inform the registration number of the REBEC platform.

A statement that the data/results of the manuscript are not plagiarism and have not been published elsewhere.

ONCE A PAPER IS ACCEPTED FOR PUBLICATION, THE AUTHORS MUST PROVIDE:

an affidavit, provided by the Editorial Office, signed by all authors. Authors from different countries or institutions may sign in different sheets containing the same basic statement;

a **copyright** assignment form, provided by the Editorial Office, signed by the corresponding author.

Page charges: there will be no page charges.

Proofs: one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

ANEXO C. Regras para submissão: *Journal of Clinical Microbiology*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

[Full-Length Papers](#)

Full-length papers include the elements described in this section.

Title, running title, and byline. Each manuscript should present the results of an independent, cohesive study; thus, numbered series titles are not permitted. Exercise care in composing a title. Avoid the main title/subtitle arrangement, complete sentences, and unnecessary articles. On the title page include the title, the running title (not to exceed 54 characters and spaces), the name of each author, the address(es) of the institution(s) at which the work was performed, each author's affiliation, and a footnote indicating the present address(es) of any author(s) no longer at the institution where the work was performed. Place a number sign (#) after the name of the author to whom inquiries regarding the paper should be directed (see "[Correspondent footnote](#)" below).

Study group in byline. A study group, surveillance team, working group, consortium, or the like (e.g., the Active Bacterial Core Surveillance Team) may be listed as a coauthor in the byline if its contributing members satisfy the requirements for authorship and accountability as described in these Instructions. The names (and institutional affiliations if desired) of the contributing members may be given as a separate paragraph in Acknowledgments.

If the contributing members of the group associated with the work do not fulfill the criteria of substantial contribution to and responsibility for the paper, the group may not be listed in the author byline. Instead, it and the names of its contributing members may be listed in the Acknowledgments section.

Correspondent footnote. The e-mail address for the corresponding author should be included on the title page of the manuscript. This information will be published in the article as a footnote to facilitate communication and will be used to notify the corresponding author of the availability of proofs and, later, of the PDF file of the published article. No more than two authors may be designated corresponding authors.

Abstract. Limit the abstract to 250 words or fewer and concisely summarize the basic content of the paper without presenting extensive experimental details. Avoid abbreviations and references, and do not include diagrams. When it is essential to include a reference, use the same format as shown for the References section but omit the article title. Conclude the abstract with a summary statement. Because the abstract will be published separately by abstracting services, it must be complete and understandable without reference to the text.

Introduction. The introduction should supply sufficient background information to allow the reader to understand and evaluate the results of the present study without referring to previous publications on the topic. The introduction should also provide the hypothesis that was addressed or the rationale for the present study. Choose references carefully to provide the most salient background rather than an exhaustive review of the topic.

Case Report. The Case Report section, placed after the introduction and before Materials and Methods, is optional and gives relevant clinical information about one or more patients while being incidental to the rest of the paper. (If the Case Report constitutes the entire article, the paper must be presented in Case Report format [see "[Case Reports](#)"], which differs from that used for a full-length text or a Short-Form paper [formerly a Note].)

Materials and Methods. The Materials and Methods section must include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. The sources of all media (i.e., name and location of manufacturer) or components of a new formulation must be provided. When centrifugation conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: make of centrifuge, model of rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugal force ($\times g$ rather than revolutions per minute). For commonly used materials and methods (e.g., media and protein concentration determinations), a simple reference or specifically recommended product or procedure is sufficient. If several alternative methods are commonly used, it is helpful to identify the method briefly as well as to cite the reference. For example, it is preferable to state "cells were broken by ultrasonic

treatment as previously described (9)" rather than to state "cells were broken as previously described (9)." This allows the reader to assess the method without constant reference to previous publications. Describe new methods completely, and give sources of unusual chemicals, reagents, equipment, or microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, include tables identifying the immediate sources (i.e., sources from whom the strains were obtained) and properties of the strains, mutants, bacteriophages, and plasmids, etc.

A method or strain, etc., used in only one of several experiments reported in the paper may be described in the Results section or very briefly (one or two sentences) in a table footnote or figure legend. It is expected that the sources from whom the strains were obtained will be identified.

Results. In the Results section, include the rationale or design of the experiments as well as the results; reserve extensive interpretation of the results for the Discussion section. Present the results as concisely as possible in one of the following: text, table(s), or figure(s). Avoid extensive use of graphs to present data which might be more concisely presented in the text or tables. For example, except in unusual cases, double-reciprocal plots used to determine apparent K_m values should not be presented as graphs; instead, the values should be stated in the text. Similarly, graphs illustrating other methods commonly used to derive kinetic or physical constants (e.g., reduced-viscosity plots and plots used to determine sedimentation velocity) need not be shown except in unusual circumstances. All tabular data must be accompanied by either standard deviation values or standard errors of the means. The number of replicate determinations (or animals) used for making such calculations must also be included. All statements concerning the significance of the differences observed should be accompanied by probability values given in parentheses. The statistical procedure used should be stated in Materials and Methods. Limit illustrations (particularly photomicrographs and electron micrographs) to those that are absolutely necessary to show the experimental findings. Number figures and tables in the order in which they are cited in the text, and be sure to cite all figures and tables.

Discussion. The Discussion section should provide an interpretation of the results in relation to previously published work and to the experimental system at hand. It must not contain extensive repetition of the Results section or reiteration of the introduction. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

Acknowledgments. The source of any financial support received for the work being published must be indicated in the Acknowledgments section. (It will be assumed that the absence of such an acknowledgment is a statement by the authors that no support was received.) The usual format is as follows: "This work was supported by Public Health Service grant CA-01234 from the National Cancer Institute."

Recognition of personal assistance should be given as a separate paragraph, as should any statements disclaiming endorsement or approval of the views reflected in the paper or of a product mentioned therein.

Appendixes. Appendixes that contain additional material to aid the reader are permitted. Titles, authors, and reference sections that are distinct from those of the primary article are not allowed. If it is not feasible to list the author(s) of the appendix in the byline or the Acknowledgments section of the primary article, rewrite the appendix so that it can be considered for publication as an independent article, either full-length paper or Short-Form (formerly Note) style. Equations, tables, and figures should be labeled with the letter "A" preceding the numeral to distinguish them from those cited in the main body of the text.

References

Effective January 2013, ASM has adopted the citation-sequence system of references in which references are cited in numerical order as they appear in the text (ASM no longer uses the citation-name system with an alphabetized reference list). For example, the first reference cited in an article is numbered 1 and listed first in References. In addition, ASM no longer allows the abbreviation of author lines in entries in the References section; "et al." may not be used in lieu of any author names, regardless of the number.

(i) References listed in the References section. The References section must include all journal articles (both print and online), books and book chapters (both print and online), patents, theses and dissertations, published conference proceedings, meeting abstracts from

published abstract books or journal supplements, letters (to the editor), and company publications, as well as in-press journal articles, book chapters, and books (publication title must be given). References should be cited in numerical order as they appear in the text (citation-sequence system). **Provide the names of all the authors for each reference, as the author line will not be abbreviated and “et al.” will not be used.** All listed references must be cited parenthetically by number in the text. Since title and byline information that is downloaded from PubMed does not always show accents, italics, or special characters, authors should refer to the PDF files or hard-copy versions of the articles and incorporate the necessary corrections in the submitted manuscript. Abbreviate journal names according to the [PubMed Journals Database](#) (National Library of Medicine, National Institutes of Health), the primary source for ASM style.

Follow the styles shown in the examples below for print references.

1. **Caserta E, Haemig HAH, Manias DA, Tomsic J, Grundy FJ, Henkin TM, Dunny GM.** 2012. *In vivo* and *in vitro* analyses of regulation of the pheromone-responsive prgQ promoter by the PrgX pheromone receptor protein. *J. Bacteriol.* **194**:3386-3394.
2. **Falagas ME, Kasiakou SK.** 2006. Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2274-2275. (Letter.) {"Letter" or "Letter to the editor" is allowed but not required at the end of such an entry.}
3. **Cox CS, Brown BR, Smith JC.** *J. Gen. Genet.*, in press.* {Article title is optional; journal title is mandatory.}
4. **da Costa MS, Nobre MF, Rainey FA.** 2001. Genus I. *Thermus* Brock and Freeze 1969, 295^{nl}, emend. Nobre, Trüper and da Costa 1996b, 605, p. 404-414. *In* Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed, vol 1. Springer, New York, NY.
5. **Stratagene.** 2006. *Yeast DNA isolation system: instruction manual*. Stratagene, La Jolla, CA. {Use the company name as the author if none is provided for a company publication.}
6. **Forman MS, Valsamakis A.** 2003. Specimen collection, transport, and processing: virology, p 1227-1241. *In* Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, White
7. **Fitzgerald G, Shaw D.** *In* A. E. Waters (ed), *Clinical microbiology*, in press. EFH Publishing Co., Boston, MA.* {Chapter title is optional.}
8. **García CO, Paira S, Burgos R, Molina J, Molina JF, Calvo C, Vega L, Jara LJ, García-Kutzbach A, Cuellar ML, Espinoza LR.** 1996. Detection of *Salmonella* DNA in synovial membrane and synovial fluid from Latin American patients using the polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum.* **39**(Suppl):S185. {Meeting abstract published in journal supplement.}
9. **Smith D, Johnson C, Maier M, Maurer JJ.** 2005. Distribution of fimbrial, phage and plasmid associated virulence genes among poultry *Salmonella enterica* serovars, abstr P-038, p 445. *Abstr. 105th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology*, Washington, DC. {Abstract title is optional.}
10. **Rotimi VO, Salako NO, Mohaddas EM, Philip LP.** 2005. Abstr 45th Intersci Conf Antimicrob. Agents Chemother., abstr D-1658. {Abstract title is optional.}
11. **Green PN, Hood D, Dow CS.** 1984. Taxonomic status of some methylotrophic bacteria, p 251-254. *In* Crawford RL, Hanson RS (ed), *Microbial growth on C₁ compounds*. Proceedings of the 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, DC.

ANEXO D. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - UFCSPA

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Desenvolvimento de um ensaio de PCR em tempo real para detecção de streptococcus gallolyticus através de swab retal e sangue total

Pesquisador Responsável Pedro d' Azevedo

Parecer 1377/11

Data da Versão 15/12/2010

Cadastro 732/10

Data do Parecer 16/06/2011

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

Desenvolver um ensaio de PCR em tempo real para identificação de streptococcus gallolyticus em voluntários com adenocarcinoma e adenoma a partir de sangue total e swab retal.

Sumário do Projeto

Detectar e quantificar a espécie streptococcus gallolyticus pode elucidar a incidência e as implicações clínicas relacionadas ao isolamento desta espécie em amostras clínicas podendo contribuir para o diagnóstico e tratamento de doenças gastrintestinais e endocardites bacterianas.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
-------------------	-----------------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
------------------	------------------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 68 Local UFCSP
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crítérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Comentário
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Uma parte da avaliação dos dados será qualitativa

Cronograma	Comentário
Data de início prevista	
Data de término prevista	mar/2013

Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
-----------------------------------	------------------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

As recomendações foram atendidas.

ANEXO E. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Desenvolvimento de um ensaio de PCR em tempo real para detecção de *Streptococcus gallolyticus* em swab retal e sangue total

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) Senhor(a),

Gostaríamos de contar com sua colaboração por alguns minutos.

O Complexo Hospitalar Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre em conjunto com a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre está realizando uma pesquisa sobre presença de bactérias no sangue e no intestino. Nas amostras que estaremos coletando vamos realizar análises laboratoriais para identificar estas bactérias.

Nesta pesquisa serão utilizadas amostras biológicas envolvendo coleta de sangue e swab retal. A coleta de sangue será feita através de perfuração com agulha estéril preferencialmente em veias de algum dos membros superiores (braços). Pequenos hematomas (roxo) podem aparecer no local da coleta, porém desaparecem facilmente sem complicações. Serão utilizados dois tubos com total de 6 mL de sangue coletado. A amostra de swab retal será coletada através da introdução de um swab (objeto de coleta semelhante a um “cotonete” conforme estou lhe apresentando) pelo orifício anal (ânus). Esse procedimento será realizado de forma rápida, indolor (possibilidade apenas de algum desconforto), minimamente invasiva com o máximo respeito a sua privacidade. Não será incluído qualquer procedimento que possa causar dor.

As informações sobre os resultados obtidos permanecerão sob a guarda dos pesquisadores em absoluto segredo. Os resultados desta pesquisa serão úteis para possibilitar novas informações para desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico associadas às doenças de intestino. Porém, os resultados não serão informados porque não representam benefícios clínicos imediatos.

Por isso, a sua colaboração autorizando a realização destes testes é muito importante para a realização deste estudo. Se você tiver alguma pergunta a fazer antes de decidir, ou durante o exame sinta-se à vontade para fazê-la.

Você não será prejudicado de qualquer forma caso sua vontade seja de não colaborar.

Esperando contar com seu apoio, desde já agradecemos.

Atenciosamente,
A Coordenação da Pesquisa

Eu, _____ (paciente ou responsável) fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informações a respeito das análises realizadas e esclareci minhas dúvidas. Sei que, a qualquer momento, poderei solicitar novas informações através do contato com os pesquisadores **Paulo Guilherme Markus Lopes e Pedro Alves d’Azevedo** pelo telefone **(51) 3303 8740 / (51) 33038800** ou pelo endereço **R. Sarmento Leite 245, 2º andar/sala 204**. Fui informado(a) também que para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia** pelo telefone **(51) 32148571** ou pelo endereço **Rua Prof. Annes Dias, 285 – Centro – CEP 90020-090 - Porto Alegre - RS**. O farmacêutico-bioquímico Paulo Guilherme Markus Lopes, CRF-RS 7770, certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, se assim o desejar, a qualquer momento, de acordo com estas informações.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Assinatura do Paciente.

Nome do Paciente

___/___/___

Assinatura do Pesquisador

Paulo Guilherme Markus Lopes

Nome do Pesquisador

___/___/___

Este formulário foi lido para _____
por Paulo Guilherme Markus Lopes em ___/___/___ enquanto eu estava presente.

Assinatura de testemunha