

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**HILSTON GUERIM**

**SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE *Streptococcus pyogenes* ISOLADOS DE UM SURTO EM  
INDÚSTRIA PARANAENSE**

**CURITIBA**

**2009**

**HILSTON GUERIM**

**SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE *Streptococcus pyogenes* ISOLADOS DE UM SURTO EM  
INDÚSTRIA PARANAENSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Cristina Leise B. Monteiro

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> MSc Rosângela Stadnick L. Almeida Torres

**CURITIBA**

**2009**

*Dedico este trabalho a João Carlos Bento da Silva, um avô carinhoso e cheio de vida, que amava a família acima de tudo.*

## **AGRADECIMENTOS**

À orientadora Profª Dra. Cristina L. B. Monteiro pela oportunidade, ajuda e compreensão.

À Profª MSc Rosângela Stadnick L. de Almeida Torres, que fez muito mais que contribuir para este trabalho, pela amizade, paciência, por tudo que me ensinou, expresso minha enorme admiração e gratidão.

A todos do LACEN que estiveram envolvidos com este projeto, principalmente a equipe da Febre Reumática.

A minha amada Isabella Marcon, por todo carinho, dedicação, companheirismo e ajuda direta no projeto.

Ao meu irmão Higor pelo incentivo e apoio durante todo o programa de mestrado.

A Alessandra Daur pela ajuda com as normas.

A todos que indiretamente ajudaram na elaboração deste trabalho.

A verdadeira viagem da descoberta consiste não em buscar novas paisagens mas em ter novos olhos.

Marcel Proust

## RESUMO

O *Streptococcus pyogenes* é a bactéria que causa a maior variedade de doenças em seres humanos, variando de impetigo e faringite a infecções invasivas e complicações não supurativas como a febre reumática e a glomerulonefrite. As infecções ocorrem com maior prevalência em crianças e adolescentes, com fácil disseminação em locais fechados e com grandes aglomerados de pessoas, como creches e escolas. A elucidação de surtos envolvendo esta bactéria é de extrema necessidade para que medidas de retenção e controle da disseminação sejam postas em prática. Neste estudo analisamos amostras de orofaringe de todos os trabalhadores de uma indústria empacotadora de gêneros alimentícios na cidade de Curitiba que apresentou entre seus funcionários indicativos de um provável surto de infecção estreptocócica, com o desenvolvimento de um quadro de glomerulonefrite. A análise epidemiológica verificou a prevalência de sintomas, incidência da infecção por *Streptococcus pyogenes* entre os funcionários, a susceptibilidade a diferentes classes de antimicrobianos e a variabilidade genética dos isolados através da técnica de *Pulsed-Field Gel Eletrophoresis* - PFGE. O estudo constatou que 20% dos trabalhadores apresentavam infecção pelo *Streptococcus pyogenes*. Todos os isolados apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos testados. A análise molecular descreveu dois perfis de macrorestrição epidemiologicamente relacionados com diferença em apenas uma banda, caracterizando uma deleção de material genético entre os clones. Confirmando a existência do surto por *Streptococcus pyogenes* em adultos, com um caso de glomerulonefrite.

Palavra Chave: *Streptococcus pyogenes*, Glomerulonefrite, Surto, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*.

## ABSTRACT

*Streptococcus pyogenes* is the bacteria responsible for the major number of diseases in human beings, going from impetigo and pharyngitis to invasive infections and non suppurative complications as rheumatic fever and glomerulonephritis. The infections occurs more often in children and teenagers, with a great dissemination in closed areas and crowded places as nurseries and schools. The elucidation of epidemiologic outbreaks involving this bacteria is extremely important to the dissemination control practice. In the present study, orofaringe samples of every employee of a food industry located in Curitiba that had signs of an outbreak of streptococcal infection with glomerulonephritis was analysed. The epidemiologic analysis determinate the sintoms prevalence, the incidence of *Streptococcus pyogenes* infection in the employees, the susceptibility to different classes of antimicrobial and the genetic variability of the isolated throught the *Pulsed-Field Gel Eletrophoresi* (PFGE) technique. The results demonstrated that 20% of the employees were infected by *Streptococcus pyogenes*. Every isolated has presented susceptibility to the antimicrobial tested. The molecular analysis describe two macrorestriction profile epidemiologically related with a difference in only one band, which characterizes a genetic deletion between the clones. This confirms an *Streptococcus pyogenes* outbreak in adults, with a glomerulonephritis case.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, Glomerulonephritis, Outbreak, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DO <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	32
FIGURA 2 - CHEF-DR III DA BioRad.....	35
FIGURA 3 - CUBA ELETROFORÉTICA COM ELETRODOS EM POSIÇÃO HEXAGONAL.....	36
FIGURA 4 - PERFIL DE MACRORESTRIÇÃO DOS CLONES A E A <sub>1</sub> .....	39
FIGURA 5 - PERFIL DE MACRORESTRIÇÃO DE 14 ISOLADOS.....	40
FIGURA 6 - PERFIL DE MACRORESTRIÇÃO DE 14 ISOLADOS RESTANTES....	41

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ISOLADOS DE ESTREPTOCOCOS BETA HEMOLÍTICOS EM FUNCIONÁRIOS DE INDÚSTRIA PARANAENSE.....	37
GRÁFICO 2 - PREVALÊNCIA DE SINTOMAS DESCRITOS PELOS 20 PACIENTES COM CULTURA POSITIVA PARA <i>S. pyogenes</i> .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-PCR	-	<i>Arbitrary Primed PCR</i>
ASLO	-	Antiestreptolisina O
CLSI	-	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
MLSB	-	<i>Macrolide-lincosamide-streptogramin B</i>
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
EBH	-	Estreptococos beta hemolíticos
EBHGA	-	Estreptococos beta hemolíticos do grupo A
<i>emm</i>	-	<i>M protein gene</i>
<i>erm</i>	-	<i>Erythromycin resistance methylase</i>
IL	-	Interleucinas
LACEN	-	Laboratório Central do Estado
<i>mef</i>	-	<i>Macrolide efflux pumps</i>
PFGE	-	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
PIV	-	<i>Pett IV buffer</i>
PYR	-	<i>L-pyrrolidonyl b-naphthylamide</i>
RAPD	-	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
REA	-	<i>Restriction Endonucleases Analysis Ribotyping</i>
<i>Spe</i>	-	<i>Streptococcal pyrogenic exotoxin</i>
THB	-	<i>Todd-Hewitt broth</i>
TNF- $\alpha$	-	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TNF- $\beta$	-	<i>Tumor necrosis factor beta</i>
VHS	-	Velocidade de hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
3.1 COMPLICAÇÕES DA INFECÇÃO.....	14
3.1.1 Complicações Não Supurativas.....	16
3.1.1.1 Febre Reumática.....	16
3.1.1.2 Glomerulonefrite.....	17
3.2 MORFOLOGIA DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO A.....	18
3.2.1 Composição celular .....	18
3.2.2 Fatores de virulência .....	20
3.2.3 Identificação laboratorial.....	22
3.2.4 Susceptibilidade a antimicrobianos .....	24
3.3 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA.....	26
3.4 EPIDEMIOLOGIA .....	29
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>31</b>
4.1 AMOSTRAS .....	31
4.2 IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL DOS ISOLADOS .....	32
4.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE POR DISCO DIFUSÃO.....	33
4.4 PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS.....	33
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo *Streptococcus pyogenes* é justificado pela grande incidência e principalmente pelas complicações que estas infecções acarretam. São doenças de grande frequência e diversidade, algumas vezes graves que requerem um acompanhamento a longo prazo e com tratamentos de alto custo para o sistema de saúde. O mais surpreendente é que se trata de infecções causadas por um agente sensível ao antibiótico mais antigo e conhecido, a penicilina, antibiótico de primeira escolha terapêutica (MELO-CRISTINO *et al.*, 2006; JOHNSON *et al.*, 2002).

A facilidade de disseminação, que ocorre de pessoa para pessoa através do contato direto ou pelo ar (tosse e espirros), junto com os fatores de virulência associa este estreptococo a surtos de infecções que acomete principalmente crianças e adolescentes (MELO-CRISTINO *et al.*, 2006)

A infecção estreptocócica pode acometer a orofaringe ou a pele desenvolvendo doenças como a faringite, escarlatina, erisipela, impetigo e a fasciite necrosante, popularmente conhecida como a doença da bactéria devoradora de carne, em que o tratamento deve ser emergencial com remoção cirúrgica da parte infectada. Os *S pyogenes* ainda podem comprometer o coração ou os rins com o desenvolvimento das complicações não supurativas, a febre reumática e a glomerulonefrite (JOHNSON *et al.*, 2002; KHANDKE *et al.*, 1987; SINGLE e MARTIN, 1992).

A glomerulonefrite pode ser desencadeada por infecções estreptocócicas tanto de pele como de orofaringe. Os M tipos específicos nefritogênicos apresentam um mimetismo molecular com o colágeno e outras macromoléculas encontradas na membrana basal glomerular, desencadeando reações autoimunes e formação de complexos imunológicos que são depositados nos glomérulos. Esse acometimento renal desenvolve hipertensão arterial, edema de face e extremidades de início súbito, hematúria e congestão circulatória renal (SILVA, 1998).

O período de latência da glomerulonefrite seguida de infecção de pele é de três a seis semanas e os títulos de antiestreptolisina O (ASLO) geralmente são baixos. Os M tipos nefritogênicos predominantemente associados a

infecções de pele são os tipos M2, M42, M49, M56, M57 e M60. Já a glomerulonefrite seguida de infecção de orofaringe o período de latência varia de uma a duas semanas com títulos de ASLO elevados. Os M tipos freqüentemente associados à glomerulonefrite desencadeados por uma infecção de orofaringe são os tipos M1, M4, M12 e M25 (BISNO, 1995; BESSEN *et al.*, 1996).

O relato epidemiológico é um grande aliado das medidas de prevenção e controle de infecções estreptocócicas. Permite a elucidação de casos de surtos e início de medidas de controle de disseminação em uma comunidade, possibilitando o desenvolvimento de medidas de prevenção como também auxilia na criação de uma vacina polivalente contra os M tipos mais prevalentes (AMEEN *et al.*, 1997; MARKOWITZ, 1997).

A Eletroforese em Campo Pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE) é atualmente a ferramenta molecular mais apropriada para elucidação de surtos ou epidemias, pois permite acompanhar a disseminação clonal de cepas virulentas em uma família, hospital ou comunidade por possuir alto poder discriminatório entre os isolados (YAN *et al.*, 2003; GONZÁLEZ-REY *et al.*, 2003)

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar geneticamente os isolados de *Streptococcus pyogenes* coletados durante um surto de tonsilofaringite estreptocócica, que teve como complicação um caso de glomerulonefrite aguda, em uma indústria empacotadora de gêneros alimentícios na cidade de Curitiba.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a susceptibilidade de isolados de *S. pyogenes* a variadas classes de antimicrobianos utilizando a técnica de disco difusão.
- Correlacionar geneticamente isolados de *S. pyogenes* através da análise do perfil de macrorestrição com a enzima *Sma* I, utilizando a técnica de *Pulsed-Field Gel Eletrophoresis*.
- Utilizar os critérios de TENOVER para correlacionar o perfil genético encontrado entre o caso índice de glomerulonefrite aguda e os demais funcionários que apresentaram tonsilofaringite estreptocócica para caracterização genética e confirmação do surto nesta indústria.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

O interesse em estudar os estreptococos iniciou na segunda metade do século XIX, quando foi relatado por Billroth a presença de uma bactéria, encontrada em feridas, com formato de cocos agrupados em cadeias. Alguns anos depois, em 1879, Louis Pasteur encontrou em mulheres mortas por sépsis puerperal os mesmos cocos em cadeias e assim relacionou a presença desses cocos com as doenças supurativas. Em 1884, após Fehleisen descrever essas bactérias como responsáveis por induzir a erisipela em humanos, Rosenbach as denominou de *Streptococcus pyogenes*. Não demorou muito para Schötmuller observar o crescimento em placas de ágar sangue e classificar os estreptococos em hemolíticos e não hemolíticos. Mas foi Brown quem sugeriu a terminologia alfa, beta e gama. A observação entre o aparecimento de casos de cardite e artrite após infecções estreptocócicas que Bela Schick, em 1912, associou os estreptococos a doenças não supurativas, a febre reumática e a glomerulonefrite aguda. As observações de Bela Schick foram confirmadas por Dicks em 1920 e a glomerulonefrite passou a ser associada como uma complicação não supurativa resultante de infecções estreptocócicas (BISNO,1995; QUIE, 1991).

Durante cinco décadas de estudos, essas bactérias foram classificadas somente com base nas características apresentadas por suas colônias em cultivo, reações bioquímicas e hemolíticas. Rebecca Lancefield demonstrou que grande parte dos estreptococos beta hemolíticos apresentava em sua parede celular um carboidrato C que poderia servir como fonte de identificação sorológica, propondo classificá-los em grupos representados pelas letras (A-H e K-V) (LANCEFIELD, 1941).

#### 3.1 COMPLICAÇÕES DA INFECÇÃO

Os estreptococos beta hemolíticos do grupo A (EBHGA) possuem relevância clínica em todo o mundo sendo responsáveis por doenças

supurativas e não supurativas que afetam principalmente crianças e adolescentes. Por apresentar como principal sítio de infecção o trato respiratório superior é a principal bactéria encontrada em infecções de orofaringe. As infecções recorrentes de orofaringe e de pele pelo *Streptococcus pyogenes* são o ponto de partida para que o indivíduo desencadeie complicações não supurativas que resultam em graves seqüelas. (TODD, 1996).

Normalmente as infecções de orofaringe são auto limitadas, mas o microrganismo pode contaminar superfícies adjacentes e resultar em abscesso peritonsilar, otite média, sinusite e quando há disseminação para o trato respiratório inferior o *Streptococcus pyogenes* pode causar pneumonia ou ainda meningite (KAPLAN, 1980).

As infecções de pele podem causar a piodermite, a erisipela, celulite e a fascite necrosante principalmente em regiões tropicais. Dos sítios primários pode ocorrer à disseminação hematogênica ocorrendo a bacteremia. No trato genital feminino o estreptococo pode aparecer como responsável por febre puerperal ou vulvovaginites. O maior risco é a ocorrência de sepsis, como complicação em qualquer um dos sítios mencionados (CONE *et al.*, 1987; SWINGLER *et al.*, 1988; ACHARYA *et al.*, 1988; JOHNSON *et al.*, 1996; ARAGON *et al.*, 1999).

A disseminação dos estreptococos ocorre com grande facilidade em ambientes fechados e com grande número de pessoas. Os estreptococos do grupo A são os principais responsáveis pelas infecções bacterianas de orofaringe, representando 30% entre crianças que apresentam manifestações clínicas da infecção das vias aéreas superiores (VIEIRA *et al.*, 2006)

A faringoamigdalite é facilmente transmitida entre membros da mesma família e entre crianças que freqüentam creches ou escolas, a incidência da tonsilofaringite estreptocócica é de duas a 18 vezes maior do que nas crianças de mesma faixa etária que não freqüentam creches (VIEIRA *et al.*, 2006; LAU *et al.*, 2003).

### 3.1.1 Complicações Não Supurativas

#### 3.1.1.1 Febre Reumática

A febre reumática está sempre vinculada a infecções prévias de garganta por *Streptococcus pyogenes*, o paciente apresenta febre alta com dores nas articulações, artrite, nódulos subcutâneos e cardite. A grande complicação da febre reumática é a cardite, que pode ocasionar lesão permanente nas válvulas cardíacas (SCHWEON e NOVATNACK, 2003; OLIVER, 2000).

A alta incidência em países em desenvolvimento é devida às más condições de moradia, aglomerados de pessoas, diagnóstico inadequado de faringite estreptocócica, tratamento inadequado da infecção e ausência de um acompanhamento, o que leva a recorrências da infecção e conseqüente disseminação de cepas virulentas (KUMAR *et al.*, 1999; ZHENG *et al.*, 2009).

As complicações da febre reumática são provenientes de uma desordem auto-imune, desencadeada pelos antígenos bacterianos. A produção de anticorpos contra as estruturas antigênicas dos estreptococos promove uma reação cruzada com as proteínas humanas. Devido a uma similaridade entre as seqüências de aminoácidos, há a formação de epítomos semelhantes entre as estruturas protéicas humanas como a miosina, tropomiosina, queratina e outras moléculas do hospedeiro com os antígenos bacterianos. E é essa mimicrasia molecular que promove a reação cruzada (OLIVIER, 2000; SMOOT, 2002).

Os antígenos bacterianos que podem estar envolvidos com a reação cruzada na febre reumática é a proteína M, o epítomo do *N*-acetil-glucosamina e a cápsula de ácido hialurônico. Somente alguns sorotipos M possuem epítomos capazes de promover a reação cruzada. Os sorotipos que normalmente estão envolvidos nos casos de febre reumática são M1, M3, M5, M6, M18, M19 e M24 (OLIVIER, 2000; SMOOT, 2002).

O tratamento é feito com antiinflamatórios e antimicrobianos intramuscular a cada quatro semanas. O antibiótico de escolha é a penicilina G

benzatina ou penicilina G procaína, podendo utilizar como alternativa terapêutica a eritromicina. O acompanhamento é fundamental tendo em vista que 10% dos casos em que o tratamento é feito de maneira adequada o *Streptococcus pyogenes* permanece na orofaringe (SCHWEON e NOVATNACK, 2003).

### 3.1.1.2 Glomerulonefrite

A glomerulonefrite também é uma complicação não supurativa proveniente de uma infecção prévia por *Streptococcus pyogenes*, porém diferente da febre reumática, a glomerulonefrite não está vinculada somente a infecções de orofaringe. Pode ser desencadeada por uma faringite, normalmente no inverno, e por infecções cutâneas, que apresenta maior incidência no verão (EFSTRATIOU, 2000).

É uma complicação da infecção estreptocócica que é desenvolvida em aproximadamente 15% dos pacientes infectados pelo *Streptococcus pyogenes*. Normalmente 90% dos pacientes recuperam-se sem maiores intervenções, com reparo da função renal em aproximadamente quatro semanas (HAHN *et al.*, 2005; VINEN e OLIVEIRA, 2003).

A sintomatologia clínica da glomerulonefrite é caracterizada por uma retenção de líquidos com formação de edema, dor de cabeça, náusea, vômito e anorexia. A síndrome nefrítica aguda eleva a pressão sanguínea devido à redução da função renal. No exame urinário evidencia-se proteínas e eritrócitos. Na dosagem de anticorpos anti-estreptolisina pode ocorrer elevação dos títulos, porém em alguns casos este aumento pode não ser evidenciado, tendo em vista que alguns sorotipos nefritogênicos não produzem estreptolisina (COUSER, 1999; MCSHAN *et al.*, 2008).

A complicação da glomerulonefrite se dá com a deposição de um antígeno estreptocócico na região glomerular após uma infecção por *Streptococcus pyogenes*. A formação de complexos imunes de anticorpos com esses antígenos cria depósitos na região que sofre alterações na permeabilidade da membrana glomerular, esses fatores acabam por

desencadear a captação de células inflamatórias. Assim como na febre reumática, a glomerulonefrite também apresenta uma desordem autoimune em que o antígeno estreptocócico forma uma reação cruzada com as estruturas glomerulares (EFSTRATIOU, 2000; SCHWEON e NOVATNACK, 2003).

Na glomerulonefrite desencadeada por infecção de pele os M tipos que predominantemente estão envolvidos são os tipos M2, M42, M49, M56, M57 e M60. E na glomerulonefrite desenvolvida a partir de infecções de orofaringe os M tipos predominantes são os tipos M1, M4, M12 e M25. Apesar do M12 ser o principal M tipo nefritogênico há publicações demonstrando que nem todas as cepas M12 são nefritogênicas (MCSHAN *et al.*, 2008).

Existe um período de latência entre a infecção estreptocócica e o desenvolvimento da glomerulonefrite aguda. Na glomerulonefrite seguida de infecção de pele o período de latência pode ser de três a seis semanas e os títulos de estreptolisina O geralmente são baixos. Nos casos em que a glomerulonefrite é seguida de uma infecção de orofaringe o tempo de latência reduz para uma ou duas semanas e ocorre elevação dos títulos de estreptolisina O (MCSHAN *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2009).

### 3.2 MORFOLOGIA DO ESTREPTOCOCOS DO GRUPO A

#### 3.2.1 Composição celular

O *Streptococcus pyogenes* possui uma cápsula de revestimento mais externo, formado de ácido hialurônico, o mesmo que encontramos na substância fundamental do tecido conjuntivo explicando assim a falta de imunogenicidade dessa estrutura no hospedeiro infectado. Esta cápsula está relacionada com a virulência da célula, devido as suas características antifagocitária (MURRAY, 2004). A sua espessura pode variar de acordo com a produção do ácido hialurônico e da hialuronidase. Normalmente a cápsula é perdida na fase de crescimento estacionário da bactéria, devido a preparação de hialuronidase durante as fases finais de crescimento logarítmico. A princípio

o ácido hialurônico não é imunogênico em humanos, porém há pesquisas que demonstraram títulos de anticorpos contra o ácido hialurônico desnaturado parcialmente. A infecção e adesão da célula ocorrem com a digestão da cápsula pela hialuronidase, resultando na exposição da proteína M intacta (STOLLERMAN, 1999).

É na parede celular que encontramos os antígenos grupo específicos. A parede celular do grupo A possui um antígeno de estrutura complexa, um polissacarídeo formado de *L*-ramnose e *N*-acetil-*D*-glicosamina unidos através de ligações covalentes aos glicopeptídeos. Também na parede celular, encontramos as proteínas M, T e R, que são antígenos encontrados em fímbrias que compõem a superfície da parede celular (MOSES *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 1996).

As funções das proteínas T e R ainda não estão definidas, porém sabe-se que a proteína M está relacionada com a capacidade antifagocitária dos estreptococos do grupo A, isso é explicado pela capacidade de ligação da proteína ao fator H, reduzindo a formação do complexo C3b B que faz a opsonização da célula (MOSES *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 1996).

A proteína M é formada pela região C-terminal, N-terminal e por quatro blocos de aminoácidos repetidos localizados entre as duas regiões terminais, os blocos são denominados de A, B, C e D. Os blocos B, C e D tem sua formação conservada entre os diferentes tipos de proteínas M. Já o bloco A apresenta-se com uma seqüência única de aminoácidos para cada proteína M, juntamente com uma pequena seqüência de aminoácidos do N-terminal, são as seqüências hipervariáveis da proteína M (JOHNSON *et al.*, 2002; SMOOT *et al.*, 2002).

É sobre essas porções supervariáveis que os estreptococos do grupo A criaram a variação genética com diferente antigenicidade. Esse mecanismo consiste em uma recombinação gênica no bloco de repetição A e na curta seqüência de aminoácidos do N-terminal. Com isso a célula bacteriana pode desviar o reconhecimento dos anticorpos M específico e também gera uma maior diversidade de M tipos. Devido a esse mecanismo, as infecções ocasionadas por EBHGA induzem uma imunidade específica para o tipo sorológico que gerou a reação imune, mas não cria imunidade contra os outros sorotipos (POSTOL, *et al.*, 2009)

Atualmente são reconhecidos mais de 90 sorotipos-M diferentes, e como a imunidade para as infecções estreptocócicas do grupo A é tipo M específica. Porém foi evidenciado que uma determinada região da proteína M apresenta uma seqüência de aminoácidos comum a vários tipos de proteína M, com base nessa informação os esforços para a produção de uma vacina estão concentrados na porção altamente conservada da proteína M (STOLLERMAN, 1999; KONEMAN, 2001; KAO *et al.*, 2005).

Dentre os sorotipos já classificados é possível distribuí-los de acordo com a patogenia. Os sorotipos M1, M2, M4, M12, M25, M42, M49, M55, M56, M57, M59, M60 e M61 são mais associados com glomerulonefrite aguda enquanto que os sorotipos M1, M3, M5, M6, M16, M18, M19 e M24 estão associados com a febre reumática (OLIVER, 2000; STOLLERMAN, 1999; TYRRELL *et al.*, 2002).

### 3.2.2 Fatores de virulência

Os fatores de virulência do *S. pyogenes* determinam a sua capacidade de aderir e invadir as células do hospedeiro, impedir que seja opsonizado e fagocitado, bem como produzir enzimas e toxinas que serão responsáveis pelos efeitos patogênicos do SBHGA (MURRAY, 2004).

Esses fatores são representados pela cápsula antifagocitária, ácido lipoteicóico, proteína M, proteína F, exotoxinas pirogênicas, estreptolisina S, estreptolisina O, estreptoquinase, DNase e C5a peptidase (BRANDT *et al.*, 2003).

A infecção do SBHGA inicia com a sua aderência às células do hospedeiro, isso ocorre mediado por uma variedade de antígenos, porém os mais importantes são a proteína M junto com o ácido ipoteicóico. Este faz uma ligação com os ácidos graxos na fibronectina e células epiteliais enquanto que a proteína M reforça a fixação podendo invadir a células epiteliais, o que explica as infecções persistentes. A capacidade que cada sorotipo tem de aderir às células do hospedeiro e colonizar diferentes sítios varia de acordo

com a sua carga genética, pois são os genes portados por cada sorotipo que iram expressar as adesinas (EDWARDS *et al.*, 2003; MURRAY, 2004).

Considerado o maior fator de virulência dos *S. pyogenes*, a proteína M fornece a este patógeno a capacidade de evitar a fagocitose. A proteína M tem a capacidade de se ligar ao fator H responsável pela regulação da via alternativa do complemento. O sistema complemento tem um mediador de fagocitose, componente C3b, que é desestabilizado pelo fator H. Dessa forma quando o componente C3b liga-se na região da proteína M é digerido pelo fator H, evitando a fagocitose. Além desse mecanismo também temos a ligação de fibrinogênio com a proteína M que acaba por bloquear a ativação do sistema complemento pela via alternativa, diminuindo a quantidade de C3b ligado. Acompanhado da proteína M temos a C5a peptidase que faz a degradação do complemento C5a, mediador de inflamação responsável pela quimiotaxia dos neutrófilos e fagócitos mononucleares (EDWARDS *et al.*, 2003; MURRAY, 2004, KONEMAN, 2001).

Há também outros fatores, que são responsáveis pelos efeitos da infecção. São as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (*Spe*), representadas por três toxinas termolábeis diferentes, *SpeA*, *SpeB* e *SpeC*. Os genes para as toxinas A e C, são encontrados em um bacteriófago lisogênico do estreptococo e o gene para a toxina B é cromossômico. O gene *SpeB* pode ser encontrado em todos os estreptococos do grupo A, já os outros dois genes podem ou não estar presentes. Elas atuam como antígenos potencializados, assim macrófagos e células T auxiliares interagem rapidamente com as toxinas, liberando IL-1, IL-2, IL-6, fatores de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), (TNF- $\beta$ ) e interferon desencadeando eventos como a síndrome tóxica estreptocócica, e o exantema em pacientes com escarlatina (EDWARDS *et al.*, 2003; MURRAY, 2004, KONEMAN, 2001).

Outra forma que o *S. pyogenes* possui para potencializar a infecção é a produção de estreptoquinases. Essas enzimas hidrolisam coágulos de fibrina, com isso não há formação de barreiras de fibrina, permitindo a rápida disseminação dos *S. pyogenes*. A determinação de anticorpos antiestreptoquinase pode ser usada como marcador de infecção. Outra forma de disseminar o agente é por meio de desoxirribonucleases, denominadas de DNase A, B, C e D que são imunológica e eletroforicamente diferentes, fazem

a despolimerização do DNA livre na secreção, diminuindo a viscosidade e facilitando a disseminação dos patógenos. Junto com os títulos de antistreptolisina O (ASLO), os anticorpos contra DNase B são importantes marcadores de infecções faríngeas e cutâneas (EDWARDS *et al.*, 2003; MURRAY, 2004, KONEMAN, 2001).

Uma das características de identificação do *S. pyogenes* é o halo de hemólise que forma ao redor da colônia, em ágar sangue. Este halo é formado pela estreptolisina S, uma hemolisina que atua tanto na presença como na ausência de oxigênio, não é antigênica, mas pode ser responsável pela ação leucotóxica dos SBHGA. Outra hemolisina presente nesses estreptococos é a estreptolisina O, diferente da anterior esta só é ativa na ausência de oxigênio e é antigênica. Apresenta efeito tóxico em uma variedade de tipos celulares, dissolve os lisossomos dos leucócitos, liberando enzimas hidrolíticas que danificam leucócitos, monócitos e outras células. Por ser antigênica, a determinação de títulos de anticorpos contra a estreptolisina O (ASLO) ajuda no diagnóstico de infecções faríngeas recentes por estreptococos. Para infecções cutâneas a determinação desses anticorpos não é reprodutível, provavelmente pela ação inibitória do colesterol sobre a estreptolisina O. Nessas circunstâncias a determinação de anti-DNase B se faz mais reprodutível (EDWARDS *et al.*, 2003; MURRAY, 2004, KONEMAN, 2001).

### 3.2.3 Identificação Laboratorial

Os estreptococos são bactérias gram-positivas de morfologia esférica ou ovóide com diâmetro entre 0,5 e 2,0  $\mu\text{m}$ , apresentam-se em pares ou em cadeias formada em um único plano com tamanhos variados. São anaeróbios facultativos, catalase negativos, podem ser encapsulados ou não encapsulados, exigem meios de cultura enriquecidos para serem isolados, podem apresentar três comportamentos diferentes em meios enriquecidos com sangue, diferenciando-os em alfa, beta ou gama hemolíticos (STOLLERMAN, 1999; EFSTRATIOU, 2000).

A primeira análise de identificação de um estreptococo é feita pela observação em uma lâmina corada pela técnica de Gram, preparada a partir de um esfregaço de amostra ou de um cultivo de estreptococos. Nesta análise observa-se cocos gram-positivo agrupados formando uma cadeia linear. A observação do seu comportamento em placas de ágar sangue determina a sua segunda característica. Quando estes são capazes de formar um halo de hemólise parcial, evidenciado por uma coloração esverdeada ao redor da colônia, classificamos como um estreptococo alfa hemolítico. Quando a lise dos eritrócitos da placa ao redor da colônia é total o agente é classificado como um estreptococo beta hemolítico. E quando o estreptococo é incapaz de produzir hemólise ao redor da colônia é classificado como um gama hemolítico (KONEMAN, 2001; MURRAY, 2004; LAU, *et al.*, 2003).

Dentre os estreptococos beta hemolíticos (EBH) a classificação sorológica proposta por Rebecca Lancefield determinada pela constituição do carboidrato C, presente na parede celular permite classificá-los em 20 grupos sorológicos diferentes (grupos de Lancefield) representados por letras maiúsculas do alfabeto - A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U e V (KONEMAN, 2001; MURRAY, 2004; LAU *et al.*, 2003).

O teste de PYR, um teste presuntivo para identificação de estreptococos beta hemolítico do grupo A (EBHGA) descrito pela primeira vez em 1982 por Facklam e seus colaboradores. Facklam utilizou *L*-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida que ao ser hidrolizado por uma aminopeptidase bacteriana específica (pirrolidonil arilamidase) libera  $\beta$ -naftilamida que é detectada pela adição de *N,N*-dimetilaminocinamaldeído, formando uma coloração vermelha no meio. Posteriormente foram incluídas algumas modificações transformando o teste para tiras de papel de filtro, facilitando o teste. A suscetibilidade a bacitracina também é um teste complementar na identificação de EBHGA, a presença de um halo de sensibilidade de qualquer tamanho ao redor de um disco de bacitracina de baixa concentração (0,04 unidades) em placa de ágar sangue é considerado prova positiva para presunção de SBHGA (KONEMAN *et al.*, 2001; MALHOTRA-KUMAR *et al.*, 2003).

Outro teste de identificação de SBHGA de maior reprodutibilidade é realizado com a identificação do carboidrato de grupo específico presente na parede celular. O processo de identificação inicia com a extração enzimática do

antígeno e segue com aglutinação usando partículas de látex (KONEMAN *et al.*, 2001; MALHOTRA-KUMAR *et al.*, 2003).

Identificado o agente como SBHGA ainda é possível prosseguir com a identificação determinando os sorotipos. Essa identificação é fundamentada na presença de duas proteínas de superfície celular, proteína M e proteína T. Atualmente são reconhecidos mais de 90 sorotipos-M e 25 sorotipos-T (YAN *et al.*, 2003; STOLLERMAN, 1999; EFSTRATIOU, 2000).

#### 3.2.4 Susceptibilidade a antimicrobianos

Até o momento os estudos de sensibilidade a antimicrobianos dos *S. pyogenes* vem descrevendo resultados semelhantes aos achados de décadas atrás. Quando se trata da penicilina os estudos confirmam a sensibilidade universal ao primeiro antibiótico produzido. O que torna a penicilina o antibiótico de primeira escolha terapêutica. Porém já há a descrição de uma tolerância a ação desta droga, caracterizada por uma resposta lenta a terapia. Que pode ser justificado por penetração inadequada do antibiótico nas criptas amigdalinas e no tecido adenóide, locais em que a bactéria pode ficar alojada (JOHNSON, 2002; SKOCZYNSKA *et al.*, 2007; LAU *et al.*, 2003; PRESTES-CARNEIRO *et al.*, 2005; MELO-CRISTINO *et al.*, 2006).

Em casos de alergia ou falência terapêutica são utilizados os macrolídeos como drogas de segunda escolha terapêutica. Porém já existem estudos relatando uma mudança na suscetibilidade a estes antibióticos pelo *S. pyogenes* (BISNO, 2002; YOUNG *et al.*, 2004; RICHTER *et al.*, 2005).

A resistência do *S. pyogenes* a eritromicina foi descrita pela primeira vez em 1954 por LOWBURY e seus colaboradores. Depois disso outros casos de resistência a eritromicina foram descritos em países de continentes distintos. No Japão cepas datadas de 1969 a 1972, Canadá em 1974, Finlândia 1999, Estados Unidos e Puerto Rico em 2002 e América Latina em 2003 (MELO-CRISTINO *et al.*, 2006; HSUEH *et al.*, 2001).

A modificação ribossomal através de uma metilase é o mecanismo de resistência mais encontrado entre os *Streptococcus* spp, codificado pelo gene

*erm* (erythromycin resistance methylase), envolve resíduos de adenina na subunidade 23S do RNAr (YOUNG *et al.*, 2004; RICHTER *et al.*, 2005).

O gene *erm* determina resistência a eritromicina e com resistência indutiva as streptograminas B e lincosamidas, ocasionando uma alteração no ribossomo que determina um decréscimo na taxa de ligação dos macrolídeos, lincosamidas e streptograminas B ao sítio alvo. Já o gene *mef* (A) determina resistência aos macrolídeos, porém continua sensível as lincosamidas e estreptograminas (YOUNG, *et al.*, 2004; RICHTER *et al.*, 2005).

Em 2007 foi publicado um trabalho com análise de isolados coletados durante seis anos em Madrid e Gipuzkoa – Espanha. PEREZ-TRALLERO e seus colaboradores analisaram as características genéticas das cepas resistentes a eritromicina com fenótipo MLS<sub>b</sub> e qual a frequência de aumento de cepas resistentes durante o período de 1999 a 2005. Utilizaram a tipagem *emm*, tipagem T e seqüência de multilocus. Nos resultados foi encontrado uma resistência de 21,3% com um crescimento de variação anual de 14,3% para 28,9%. Os autores também demonstraram que o fenótipo de resistência da maioria das cepas, nos primeiros quatro anos, era o fenótipo M, porém em 2004 e 2005 aproximadamente 50% dos isolados era fenótipo MLSB (PEREZ-TRALLERO *et al.*, 2007).

Outro estudo realizado na França com 1500 isolados de *S. pyogenes* coletados de crianças, pesquisou a susceptibilidade a eritromicina, azitromicina, josamicina, clindamicina e streptogramina B. 6,2% das cepas eram resistentes a eritromicina, 3,4% apresentavam o fenótipo cMLSB com genes *erm* B e 2,8% o fenótipo M com o gene *mef* A (BINGEN *et al.*, 2000). Em 2004 os mesmos autores avaliaram a diversidade genética de 322 cepas de *Streptococcus pyogenes*, também de orofaringes de crianças. Dos isolados resistentes a eritromicina 69,4% era portador do gene *erm* B, 4,2% do gene *erm* A e 26,4% do gene *mef* A (BINGEN *et al.*, 2004).

Uma pesquisa realizada sobre 1011 isolados coletados de 10 Centros Europeus em 2002 encontrou resistência a eritromicina em 12,3% das cepas. Desses 60,5% portavam o gene *erm* A (sub classe *erm*TR), 23,4% expressavam o gene *mef* A e 14,5% gene *erm* B (NAGAI *et al.*, 2002).

Na Alemanha o estudo foi realizado em 381 cepas de *S. pyogenes*, 50,6% apresentavam *mef A*, 31,5% *erm A* e 13,0% *erm B*. Os pesquisadores relataram 23 multilocus com seqüências diferentes (REINERT *et al.*, 2004).

Nos Estados Unidos os níveis de aumentados de resistência dos *Streptococcus pyogenes* também foi relatado em um estudo que abrangeu várias regiões do país. Dos isolados de orofaringes 6,9% foram resistentes a azitromicina, 6,6% resistentes a claritromicina e 0,5% a clindamicina. O fenótipo de resistência MLSB representou 56% dos isolados e os outros 44% fenótipo M (RICHTER *et al.*, 2005).

Em 2003 foi publicada uma pesquisa realizada no Rio de Janeiro, em que foi analisada a susceptibilidade de 357 isolados de *S. pyogenes* a dez antibióticos. A sensibilidade a penicilina foi confirmada nos isolados, como também para cefens e vancomicina. A resistência para tetraciclina e sulfametossaxol-trimetoprim foi elevada com porcentagens de 43% e 77,9% respectivamente. A resistência a eritromicina foi baixa quando comparado aos estudos realizados em outros países, três isolados foram resistentes e três apresentaram resistência intermediária. O fenótipo iMLScB (*erm TR*) foi expresso em três isolados e três apresentaram o fenótipo M (*mef A*) (D'OLIVEIRA *et al.*, 2003).

A resistência aos macrolídeos vem gerando problemas para alguns países, levando-os a determinar novas condutas para o tratamento de infecções por *S. pyogenes*, com restrições ao uso desses antibióticos. No Brasil ainda são raros os estudos de verificação da suscetibilidade a antimicrobianos dos SBHGA, bem como a análise de variabilidade genética dos isolados de casos de infecções benignas ou invasivas.

### 3.3 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Diante da freqüência e da gravidade das complicações geradas pelas infecções estreptocócicas é crucial o desenvolvimento de pesquisas epidemiológicas com a finalidade de descrever os sorotipos envolvidos com as formas mais graves. Só a partir dessas informações será possível a

implantação de trabalhos objetivados no desenvolvimento de uma vacina multivalente.

Tratando-se da exposição de dados epidemiológicos, as ferramentas de análise genética tornam-se fundamentais. A biologia molecular possibilita um grande poder de discriminação entre isolados com identificação de linhagens dentro de um mesmo sorotipo, possibilitando novas classificações e descrição de um perfil cromossomal de maior relação com as formas graves da infecção (ALVES, 2003; GONZÁLEZ-REY *et al.*, 2003; YAN *et al.*, 2003).

Com a tipagem molecular podemos detectar a fonte de infecção e fornecer evidências laboratoriais para identificar um surto. Ao escolher o método de tipagem genética deve-se buscar uma metodologia que permita a diferenciação clara das cepas, com uma reprodutibilidade considerável. Nas pesquisas epidemiológicas envolvendo *S. pyogenes* dos últimos anos encontramos métodos moleculares bastante variados, como *Restriction Endonucleases Analysis* (REA), *Ribotyping*, tipagem do gene *emm*, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), todas são capazes de fazer a diferenciação entre vários clones de SBHGA. Porém algumas com maior reprodutibilidade, poder discriminatório ou menor custo do que outras (GONZÁLEZ-REY, *et al.*, 2003; YAN *et al.*, 2003; TENOVER *et al.*, 1995).

O método utilizado para estudos epidemiológicos envolvendo o *Streptococcus pyogenes* considerado mais rápido, fácil e menos oneroso é com uma boa reprodutibilidade é o RAPD, também conhecido por AP-PCR (*Arbitrary Primed PCR*) (MICHELI *et al.*, 1994; GONZÁLEZ-REY *et al.*, 2003). No entanto temos algumas publicações que realizaram a análise comparativa da técnica de RAPD com a técnica de PFGE e demonstraram que o poder discriminatório do PFGE é mais satisfatório do que os resultados de RAPD.

Em 1997 foi publicado um trabalho que utilizou o PFGE para realizar a análise genética de isolados de *S. pyogenes*. Os autores notaram que a utilização da enzima de restrição *SmaI* na técnica de PFGE determinava um poder discriminatório para a técnica superior aos resultados obtidos com a técnica de RAPD, mesmo usando três primers distintos (BERT *et al.*, 1997).

GONZÁLEZ-REY e seus colaboradores obtiveram resultados semelhantes quando comparou as duas técnicas. O autor confirmou as

facilidades, o baixo custo e a rapidez da técnica de RAPD frente a outras metodologias de tipagem molecular, porém o PFGE obteve resultados com maior poder discriminatório e uma reprodutibilidade interlaboratorial melhor que o RAPD (GONZÁLEZ-REY *et al.*, 2003). Alguns autores apontam a baixa reprodutibilidade do RAPD quando comparado com padrões de bandejamento de outros laboratórios como um fator negativo da técnica (VAN BELKUM, 1995; LASKER, 2002; TYLER, 1997).

No Brasil, DUARTE e seus colaboradores (2005) demonstraram que as duas metodologias resultaram em um poder discriminatório satisfatório. Mas a o PFGE se destaca pela exatidão na diferenciação de clones. O PFGE evidenciou perfis com bandas mais homogêneas facilitando a interpretação.

A técnica de macro restrição de eletroforese em campo pulsado (PFGE) tem a desvantagem de ser trabalhosa e demorada, com protocolos de no mínimo cinco dias. Entretanto é a técnica de referência para tipificar grande parte das bactérias pela alta discriminação e ótima reprodutibilidade (GONZÁLEZ-REY *et al.*, 2003).

No PFGE não há análise de alguns fragmentos de cromossomo, mas sim a análise de todo o material genético. Este é digerido por enzimas de restrição que fazem o reconhecimento de seqüências raras, formando grandes fragmentos. Para a digestão do material genético de *Streptococcus pyogenes* a enzima *SmaI* tem sido bastante utilizada devido ao conteúdo de G+C presente nestas cepas serem menos freqüentes (TENOVER *et al.*, 1995; DUARTE *et al.*, 2005).

Enquanto que a eletroforese convencional é limitada à análise de fragmentos de até 50 kb o PFGE separa fragmentos de até 1500 kb. Isso é possível devido à alternância periódica do campo elétrico. Como o campo elétrico é formado por eletrodos dispostos em um hexágono as moléculas são permanentemente forçadas a modificar a orientação da corrida (ALVES, 2003; TENOVER *et al.*, 1995).

Como a análise do material genético no PFGE é feita na integra, a observação de possíveis eventos genéticos, como a ocorrência de mutações pontuais, deleções ou inserções, torna-se mais eficiente. E como ocorre a formação de poucas bandas durante a corrida, aproximadamente de 10 a 20 fragmentos, a leitura fica facilitada (FASOLA, LIVDAHL & FERRIERI, 2003).

TENOVER (1995) também descreve as prováveis formas de se encontrar as bandas dentro do perfil eletroforético. De acordo com a diferença de bandas e o posicionamento destas é possível determinar quais eventos genéticos (deleção, inserção, mutações pontuais) que ocorreram para distinguir os perfis (TENOVER *et al.*, 1995).

### 3.4 EPIDEMIOLOGIA

A descrição de dados epidemiológicos de determinado patógeno permite a melhor compreensão das patologias relacionadas a esse agente. Diversos trabalhos publicados em todo o mundo têm objetivado a descrição de casos de patologias relacionadas ao *S. pyogenes*. No Brasil ainda são poucas as informações sobre o comportamento de SBHGA, principalmente a descrição de diferentes sorogrupos.

Em outros países, estudos envolvendo crianças serviram para alarmar quanto a importância de um diagnóstico correto. Smith e seus colaboradores analisando crianças de cinco meses a doze anos de uma instituição de cuidados diários, encontraram uma prevalência de 36% de positividade para EBHGA entre as crianças e de 8% entre os funcionários (SMITH *et al.*, 1989). Em 1992 foi relatado um surto dentro de um desses centros de cuidados diários para crianças, onde foi encontrado 61% de positividade para SBHGA entre crianças de um a sete anos (FALCK & KJELLANNDER, 1992).

O alarmante destes dados não está apenas relacionado a alta frequência, mas sim pelo fato do *Streptococcus pyogenes* ser o precursor de duas seqüelas não supurativas graves, febre reumática e glomerulonefrite aguda. A estimativa é de que a febre reumática e a cardiopatia reumática afetam 12 milhões de pessoas, com mais de 400.000 mortes por ano (NORDET & ACHUTTI, 1995).

Em 2009 Vieira levantou dados sobre a prevalência de *Streptococcus pyogenes* em orofaringe de crianças que freqüentam creches, comparando duas região do Brasil. Vieira identificou na região de São Paulo uma prevalência semelhante ao que encontramos nos dados internacionais. Já na

região Norte os valores acusaram uma prevalência maior, com 26% de culturas positivas entre as crianças (VIEIRA *et al.*, 2009).

Um grupo de pesquisadores chineses avaliou a existência de dois surtos de infecção de orofaringe por *Streptococcus pyogenes* associados a dois casos de glomerulonefrite. Os pesquisadores utilizaram o PFGE como ferramenta molecular para caracterizar os dois tipos de clones envolvidos no surto. A análise de susceptibilidade das cepas demonstrou resistência a eritromicina e a tetraciclina (ZHENG, 2009).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 AMOSTRAS

Durante o mês de abril de 2004, vários funcionários de uma empresa empacotadora de gêneros alimentícios na cidade de Curitiba, Paraná procuraram ajuda médica por apresentarem febre, dor no corpo e dor à deglutição. Dentre os funcionários que apresentaram queixas, houve um caso de internação que posteriormente foi confirmado o diagnóstico de glomerulonefrite aguda.

Diante dos relatos dos trabalhadores e das evidências clínicas suspeitou-se de um provável surto de faringite estreptocócica dentro da indústria. A epidemiologia foi acionada e foram coletadas amostras de orofaringe de todos os funcionários da empresa.

Durante o período de duas semanas foram enviadas 100 amostras coletadas da orofaringe dos trabalhadores ao Laboratório de Pesquisa e Identificação de Estreptococos do Laboratório Central do Estado – LACEN, sendo que 98 pertenciam a funcionários e duas amostras foram coletadas da médica e da enfermeira que fizeram o atendimento aos pacientes.

Os funcionários que apresentaram cultura positiva para *S. pyogenes* receberam a indicação de tratamento por penicilina benzatina 1.200.000 UI. Duas semanas depois, todos os funcionários que apresentaram cultura positiva para *Streptococcus pyogenes* foram submetidos a mais uma coleta de secreção de orofaringe para verificar a eficácia terapêutica.

Os isolados de *Streptococcus pyogenes* foram armazenados em freezer - 80°C em sangue de carneiro desfibrinado.

## 4.2 IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL DOS ISOLADOS

As amostras foram coletadas utilizando-se um swab armazenado em meio de Stuart. No LACEN as amostras foram semeadas pela técnica de esgotamento em meio ágar sangue (Tryptose Blood Agar, suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado), em seguida as placas foram incubadas a temperatura de 36°C por 18-24 horas.

A caracterização fenotípica é formada com a identificação de cocos gram-positivos (FIGURA 1a), presença de hemólise total ao redor das colônias em meio Agar sangue, caracterizando colônias beta hemolíticas, conforme FIGURA 1b, em seguida foi realizado os testes de catalase e Pyr.

As provas de identificação foram concluídas com a classificação sorológica de Lancefield, utilizando o *Kit Diagnostic Reagents, Streptococcal Grouping kit* (Oxoid – Basingstoke, United Kingdom).

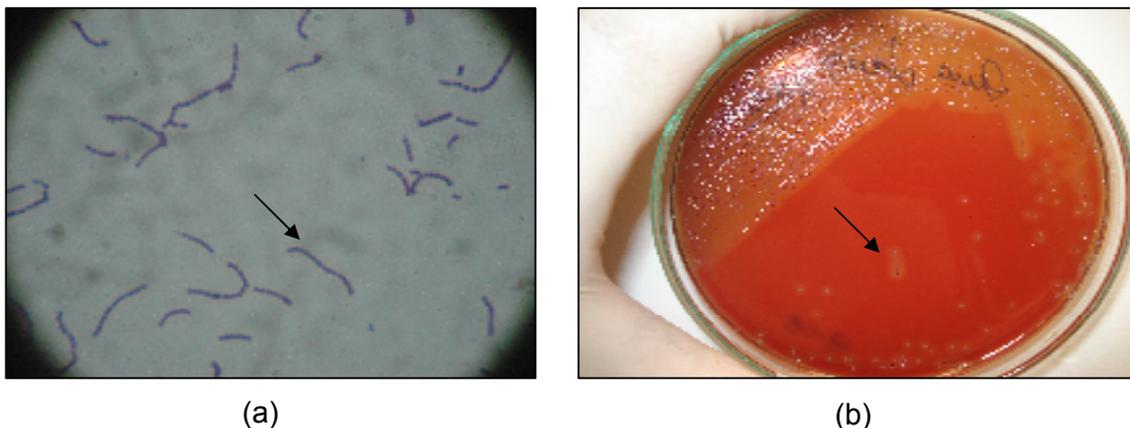


FIGURA 1 – IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DO *Streptococcus pyogenes*

FONTE – o autor (2009)

LEGENDA: (a) coloração de Gram, a seta evidencia cocos gram-positivos com arranjo em cadeia; (b) a seta destaca o crescimento do *S. pyogenes* em ágar sangue com formação de halos com hemólise total.

#### 4.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE POR DISCO DIFUSÃO

A susceptibilidade a antimicrobianos foi testada em meio de ágar Mueller Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Foi realizado uma suspensão bacteriana em salina, respeitando a escala de 0,5 de Mac Farland. Os antimicrobianos testados foram os seguintes: ampicilina 10µg (Oxoid - Basingstoke, United Kingdom), clindamicina 2µg (Oxoid - Basingstoke, United Kingdom), cloranfenicol 30µg (Oxoid - Basingstoke, United Kingdom), eritromicina 15µg (Oxoid - Basingstoke, United Kingdom), penicilina 10µg (Oxoid - Basingstoke, United Kingdom), tetraciclina 30µg (Oxoid - Basingstoke, United Kingdom), vancomicina 30µg (Oxoid - Basingstoke, United Kingdom), azitromicina 15µg (Oxoid - Basingstoke, United Kingdom) e cefepime 30µg (Oxoid - Basingstoke, United Kingdom), de acordo com as normas do CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*, 2008).

#### 4.4 PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS

A análise molecular desse estudo foi realizada pela técnica de eletroforese em campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Eletrophoresis* - PFGE). Os isolados foram reativados em caldo Todd Hewit Broth (THB) e incubados a 36°C por 20-24 horas.

Para obtenção de crescimento puro foi realizado um repique em placa de ágar sangue a partir de uma colônia. Em seguida o isolado foi inoculado novamente em THB.

Uma alíquota de 1,5 mL da cultura bacteriana, THB, foi submetida a uma centrifugação de 5000 rpm por 5 minutos sob uma temperatura de 4°C, em seguida à centrifugação o precipitado foi lavado por duas vezes com tampão PIV (Tris-HCl 0,01M, pH 8,0 contendo NaCl 1M), com 1 mL na primeira lavagem e 0,5 mL na segunda, sempre nas mesmas condições da centrifugação inicial.

Após a última lavagem o precipitado é homogeneizado com 200µL de PIV e levado ao Banho Maria de 51°C. Sem tirar o tubo do Banho Maria foi adicionado 200µL de agarose de baixo ponto de gelificação à 1,5% (BioRad). Sem retirar a mistura do Banho Maria, uma alíquota de 80 µL foi retirada para ser adicionada a uma forma de acrílico. Esse processo é repetido até esgotar a mistura, possibilitando a confecção de cinco blocos (*plugs*) de agarose contendo os microrganismos.

Ainda no mesmo dia os *plugs* foram embebidos em uma solução de lise que é formada de tampão EC (Tris-HCl 6,0Mm pH 8,0, NaCl 1M, EDTA tetrassódico 0,1M pH 8,0, deoxicolato de sódio à 0,2% e sarcosil a 0,5%), neste tampão é acrescentado lisozima (500µL/mL), mutanolisina (25 U/mL), Brij (25%) e RNase I (50µL/mL). Os *plugs* devem permanecer nesta solução durante 18 horas em Banho Maria de 37°C.

Após a permanência em tampão de lise, toda a solução foi retirada do tubo, para dar lugar à solução contendo proteinase K. Esta solução é formada de tampão ESP (EDTA tetrassódico 0,5mM pH 9,0, sarcosil 1%) e proteinase K 0,1 mg/mL. Novamente os *plugs* permaneceram na solução em Banho Maria, porém, a temperatura de 51°C e por 24 horas.

Passada às 24 horas foi realizada a lavagem dos *plugs* para remover o tampão ESP. A lavagem teve início após a retirada de toda a solução de proteinase K de dentro do tubo contendo os *plugs*. Em seguida foi adicionado 10mL de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA dissódico 1mM pH 8,0) e submeteu-se a uma leve agitação durante uma hora. Transcorrido esse tempo o tampão TE foi trocado para iniciar uma nova lavagem, esse processo foi repetido por quatro vezes.

Após as quatro lavagens, foi separado um *plug* de cada amostra a ser analisada. Em micro tubos, devidamente identificados para cada cepa é posto o *plug* e adicionado o tampão da enzima *SmaI* (Tris-HCl 6mM pH 8,0, HCl 20mM, MgCl<sub>2</sub> 7H<sub>2</sub>O a 6mM e 2β-mercaptoetanol a 0,04%) permanecendo a temperatura ambiente por 20 minutos.

Transcorrido os 20 minutos o tampão de *SmaI* foi retirado do micro tubo e adicionado 90 µL de uma solução formada de 3 µL enzima *SmaI*, tampão de *SmaI* (10% do volume total da solução) e água ultrapura necessária para completar 90µL. Adicionado essa solução em cada eppendorff estes

foram incubados em Banho Maria a temperatura de 30° C durante vinte a quatro horas.

Foi preparado o gel de agarose 1,1% preparado com tampão TBE 0,5X. Cada *plug* retirado do eppendorff foi posto em um dos poços do gel de corrida. Os poços foram recobertos com agarose 1%.

O gel contendo os blocos foi colocado no aparelho de PFGE (CHEF-DR III da BioRad), em tampão TBE 0,5% a 12°C.

Foi utilizado a seguinte programação: Pulsos iniciais de 5 e finais de 35, 6 V, tempo de corrida de 24 horas e um ângulo de 120° (FIGURA 2).

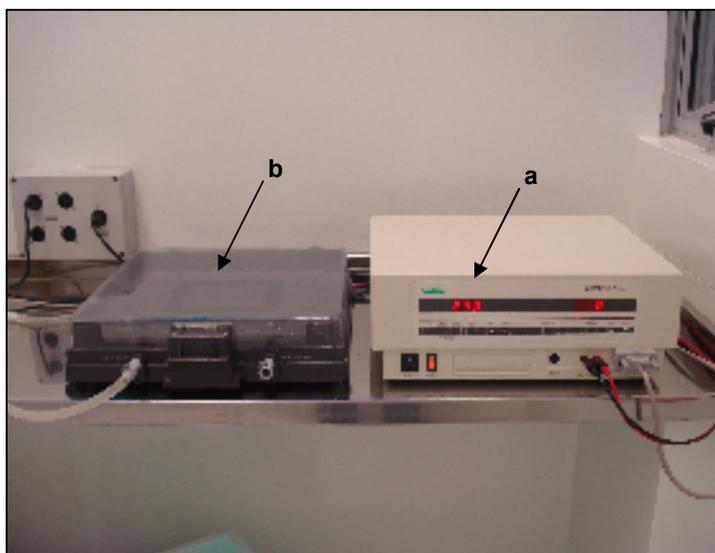


FIGURA 2 – CHEF-DR III DA BioRad

FONTE – o autor (2009)

LEGENDA: seta (a) programador de corrida, seta (b) cuba eletroforética.

Depois de transcorrido às 24 horas, retirar o gel do aparelho para que este seja revelado em solução de brometo de etídio, durante vinte minutos (FIGURA 3). Em seguida o gel é levado para um transiluminador de luz ultravioleta. As bandas já separadas no gel são então fotografadas em um sistema de fotodocumentação com uma câmera Polaroid 667 (Polaroid).

Para a analisar a clonalidade de perfis eletroforéticos separados por PFGE adotamos os parâmetros descritos por TENOVER em 1995. Para haver duas cepas consideradas idênticas é necessário que o perfil de fragmentação

demonstrado no gel, após a ação da enzima de restrição deve ser idêntico. A presença de 1 a 3 bandas diferentes indica que houve um evento genético alterando o perfil das cepas, isto levaria a conclusão de que as cepas pertencem aos mesmo complexo clonal consideradas intimamente relacionadas. Quando observa-se a diferença de 4 a 6 bandas entre os perfis, determinamos que houve dois eventos genéticos, havendo a possibilidade das cepas pertencerem ao mesmo complexo clonal, o que as tornariam possivelmente relacionadas. Nos perfis em que há mais de sete bandas diferentes determinamos como cepas distantes, pertencentes a complexos clonais diferentes (TENOVER *et al.*, 1995).

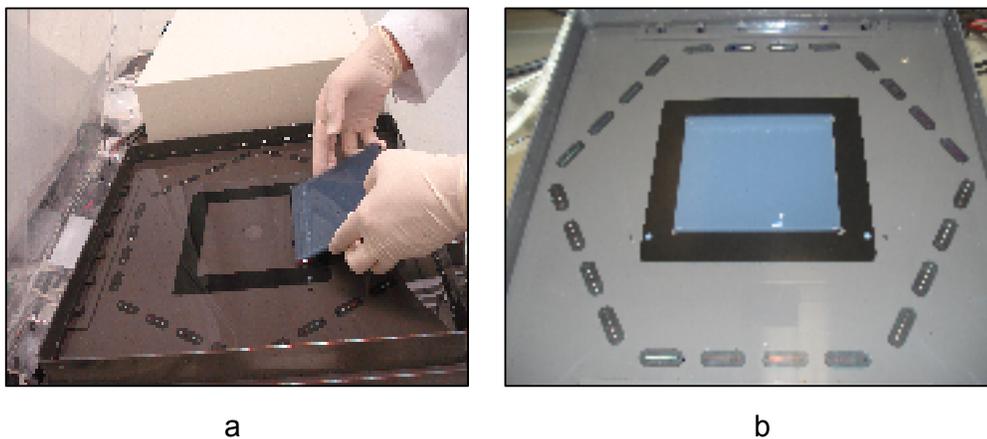


FIGURA 3 – CUBA ELETROFORÉTICA COM ELETRODOS EM POSIÇÃO HEXAGONAL

FONTE – o autor (2009)

LEGENDA – (a) posicionamento do gel de agarose, (b) gel de agarose no interior do campo elétrico.

## 5 RESULTADOS

Durante o surto foram analisadas 100 amostras de secreção tonsilofaringeana, sendo que 98 pertenciam aos funcionários da empresa, uma amostra da médica e uma da enfermeira que participaram da coleta das amostras. Dentre estas amostras 26 funcionários apresentaram cultura positiva para estreptococos beta hemolíticos. Desses isolados vinte (77%) foram identificados como *Streptococcus pyogenes*, quatro (15%) pertencentes ao grupo B e dois (8%) pertencentes ao grupo C; conforme GRÁFICO 1.

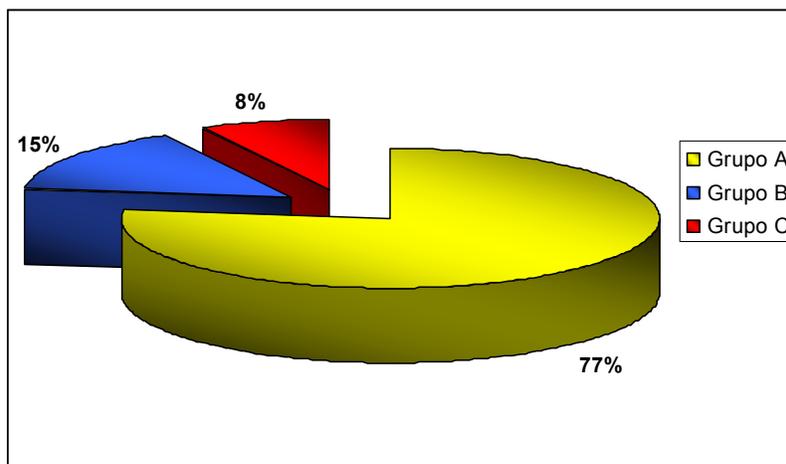


GRÁFICO 1 – ISOLADOS DE ESTREPTOCOCOS BETA HEMOLÍTICOS EM FUNCIONÁRIOS DE UMA INDÚSTRIA PARANAENSE.

Entre os 20 funcionários que apresentaram cultura positiva para *Streptococcus pyogenes*, 17 apresentavam sintomas como febre, cefaléia, dor nas pernas, dor nas costas, dor a deglutição, e hiperemia de orofaringe. Uma funcionária apresentou sintomas graves e foi encaminhada para internamento tendo como diagnostico a glomerulonefrite (GRÁFICO 2).

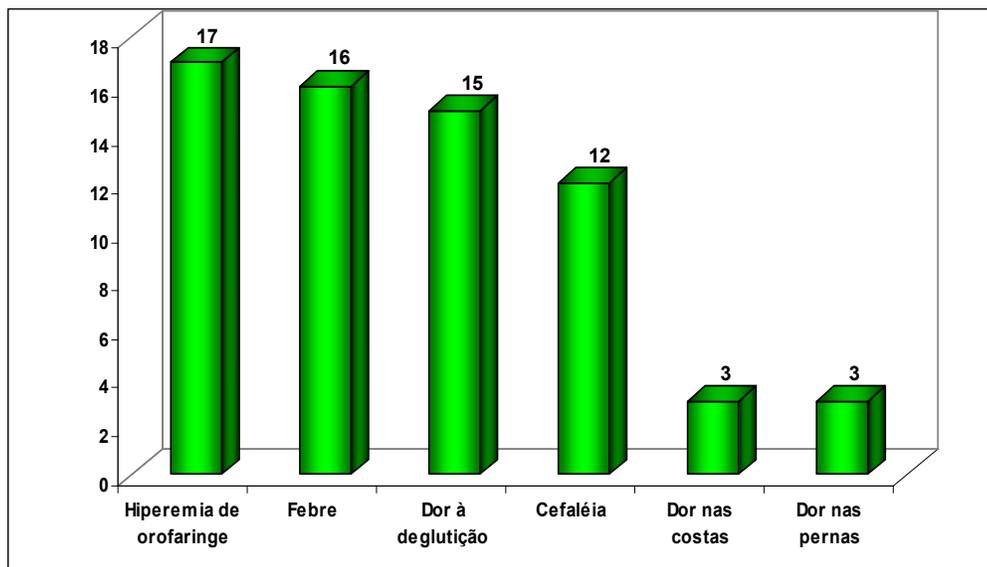


GRÁFICO 2 – PREVALÊNCIA DE SINTOMAS DESCRITOS PELOS 20 PACIENTES COM CULTURA POSITIVA PARA *S. pyogenes*.

Os 20 funcionários que apresentaram cultura positiva para *Streptococcus pyogenes* receberam orientações para iniciar o tratamento com penicilina benzatina 1200.000 UI. Desses, 15 aderiram ao tratamento, enquanto que cinco funcionários não seguiram a terapia recomendada.

Vinte dias após a primeira coleta, novas amostras foram coletadas dos vinte funcionários que apresentaram cultura positiva para SBHGA para comprovação da eficácia terapêutica. Nessas amostras foi identificado oito culturas positivas para *Streptococcus pyogenes*. Desses oito isolados cinco pertenciam a funcionários que não aderiram ao tratamento proposto e todos permaneciam com os sintomas relatados anteriormente. Os três isolados restantes pertenciam aos funcionários que aderiram ao tratamento, mas permaneceram com os sintomas da doença.

A análise da variabilidade genética dos *Streptococcus pyogenes* foi realizada pela técnica de PFGE. Os perfis obtidos pela eletroforese em campo pulsado determinaram a presença de dois clones diferentes que passamos a denominar de Clone A e Clone A<sub>1</sub> (FIGURA 4).

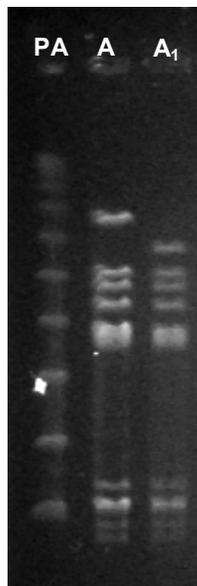


FIGURA 4– PERFIL DE MACRORESTRIÇÃO DOS CLONES A E A<sub>1</sub>  
LEGENDA – PA: padrão de peso molecular; A: clone A; A<sub>1</sub> : clone A<sub>1</sub>.  
FONTE – O autor (2009)

A paciente que apresentou o quadro de glomerulonefrite foi considerada por esse estudo como sendo o caso índice. O *Streptococcus pyogenes* isolado neste paciente apresentou o perfil eletroforético correspondente ao clone A.

Analisando todos os perfis encontramos uma incidência de 71,43% do Clone A e de 28,57% do Clone A<sub>1</sub>.

Nas figuras 5 e 6 cada perfil clonal está representado pela letra “P” acompanhado de um número correspondente a cada paciente.

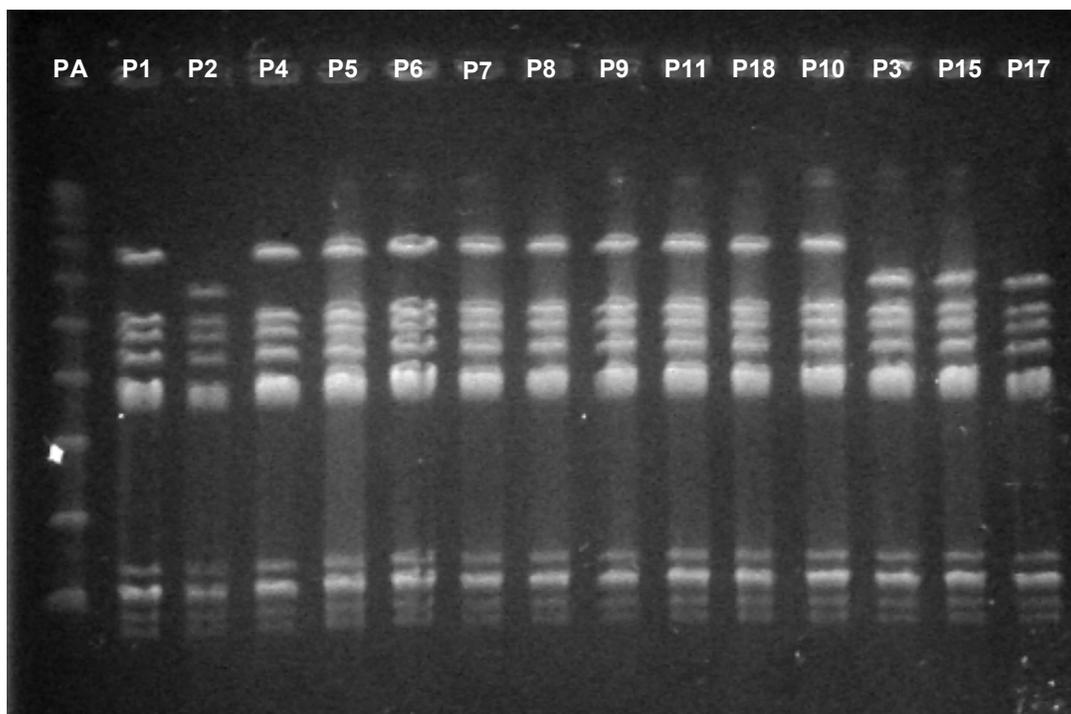


FIGURA 5 – PERFIL DE MACRORESTRIÇÃO DE 14 ISOLADOS

LEGENDA – PA: padrão; A: clone A; A<sub>1</sub> : clone A<sub>1</sub>

FONTE – O autor (2009).

O perfil de macrorestrição dos isolados obtidos dos funcionários na segunda coleta está representado pelas siglas iniciais (P) acompanhado de um asterisco (\*). Sete desses isolados apresentaram o mesmo perfil encontrado na primeira amostra, porém um dos isolados (P8\* - Clone A<sub>1</sub>) apresentou um perfil diferente da primeira amostra (P8 – Clone A). Este paciente relatou não ter feito nenhum tipo de tratamento (Figura 6).

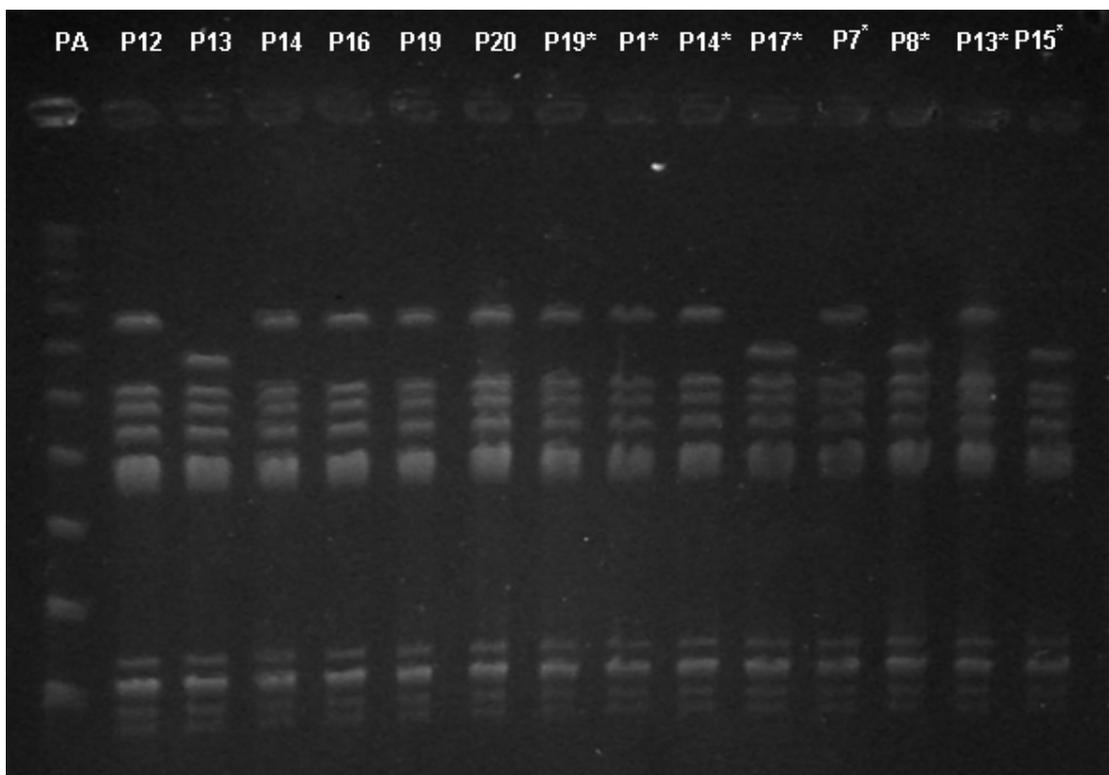


FIGURA 6 – PERFIL DE MACRORESTRIÇÃO DOS 14 ISOLADOS RESTANTES

LEGENDA – PA: padrão.

FONTE – O autor (2009)

O gel de eletroforese demonstrou a presença de dois perfis clonais, que permite destacar a existência de um evento genético responsável pela diferença de bandas. De acordo com TENOVER, o desaparecimento de uma banda maior sem o aparecimento de duas bandas menores novas caracteriza um evento de deleção no cromossomo.

Na análise de susceptibilidade os antimicrobianos por disco difusão, foi observado que todos os isolados apresentaram-se sensíveis aos antimicrobianos testados. Os antimicrobianos testados foram: ampicilina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, penicilina, tetraciclina, vancomicina, azitromicina e cefepime.

## 6. DISCUSSÃO

A identificação de isolados de orofaringes dos funcionários da indústria empacotadora de gêneros alimentícios demonstrou a alta incidência de estreptococos beta hemolítico em um grupo de convívio diário, caracterizado pelo predomínio de *Streptococcus pyogenes*. A identificação dessa bactéria em 20% das amostras equipara-se aos resultados obtidos na década de setenta em Fortaleza, o estudo apresentou 49% de isolados coletados de universitários positivo para estreptococos beta hemolítico (NORONHA, 1975). Em 1983, na cidade de Araraquara, SP a análise de estudantes de primeiro grau resultou em uma frequência de 17,6% de estreptococos beta hemolítico, dos quais 79,3% pertenciam ao grupo A, 5,8% ao grupo C e 14,9% ao grupo G (MEDONÇA *et al.*, 1983).

A primeira discrepância dos resultados dessa pesquisa com os resultados já publicados é a existência do *Streptococcus pyogenes* em adultos. Em 2007 Steer e colaboradores descreveram as características de infecção do SBHGA, relatando o predomínio das infecções em crianças e adolescentes, com pequena incidência em adultos. SOUZA e colaboradores (1990), analisaram amostras coletadas de 972 crianças entre seis e treze anos de idade, no Rio de Janeiro. A identificação sorológica dos estreptococos isolados de orofaringe foi analisada de acordo com o grupo socioeconômico. Amostras obtidas de crianças de baixa renda 5,5% pertenciam ao grupo A, enquanto que nas crianças de nível socioeconômico médio, 41,6% dos isolados foram identificados como pertencentes ao grupo A (SOUZA *et al.*, 1990).

Vieira, em 2006, ao fazer um estudo comparativo entre diferentes regiões do Brasil encontrou, no caso de maior prevalência, uma porcentagem inferior ao demonstrado por esta pesquisa (Vieira *et al.*, 2006).

Algumas décadas atrás pesquisas mostraram altos índices de SBHGA na população brasileira. Castro em 1961 estudou três grupos de estudantes assintomáticos do Rio de Janeiro e observou que dos isolados 8,5% era do grupo A e 20,8% pertenciam aos grupos B,C e G. Em 1980, Benchetrit também no Rio de Janeiro, analisou 433 amostras de pacientes com suspeita de infecção do trato respiratório sendo isolados 161 cepas, da qual 112 (69,5%) correspondiam ao grupo A, 32 ao grupo G, 10 ao grupo B, 03 ao grupo C, 01

ao grupo F e 03 não grupáveis. Já em São Paulo três anos depois, Vernin encontrou prevalências diferentes para os grupos sorológicos, 23% dos isolados pertenciam ao grupo A, 9% pertencia ao grupo C e 8% ao grupo G (CASTRO, 1991; NORONHA 1975).

A velocidade com que esta bactéria se difundiu dentro do ambiente de trabalho demonstra sua alta capacidade de disseminação com potencial para desencadear um surto epidemiológico. A análise sintomatológica dos funcionários descreve a existência de uma pequena variedade de sintomas que não são capazes de distinguir se a cepa era ou não uma cepa nefritogênica. Zheng e seus colaboradores publicaram em 2009 a existência de dois surtos envolvendo cepas nefritogênicas, nos dois casos o quadro sintomatológico de início era simples, com irritação de orofaringe e febre. De forma inesperada o quadro evoluiu para inchaços repentinos e aumento de pressão.

Alguns relatos de casos isolados de glomerulonefrite são encontrados na literatura, como o trabalho publicado em 2007 por Fujino descrevendo um caso de glomerulonefrite em mulher adulta após várias infecções recorrentes. Em 2008 McShan publicou a existência de quatro casos isolados de glomerulonefrite em diferentes regiões da China, todos desenvolvidos pelo tipo M49. Porém a identificação de surtos envolvendo focos de glomerulonefrite é pouco documentado. Zheng *et al* em 2009 publicou a existência de dois surtos porém ficou constatado a presença de 11 clones distintos. Diferente do que ocorreu no caso relatado por esta pesquisa, em que apenas dois clones epidemiologicamente relacionados foram os responsáveis pela disseminação dos casos de faringite.

Na França com 1500 isolados de *S. pyogenes* coletados de crianças, pesquisou a suscetibilidade a eritromicina, azitromicina, josamicina, clindamicina e streptogramina B. 6,2% das cepas eram resistentes a eritromicina, 3,4% apresentavam o fenótipo cMLSB com genes *erm B* e 2,8% o fenótipo M com o gene *mef A* (BINGEN *et al.*, 2000). Em 2004 os mesmos autores avaliaram a diversidade genética de 322 cepas de *Streptococcus pyogenes*, também de orofaringes de crianças. Dos isolados resistentes a eritromicina 69,4% era portador do gene *erm B*, 4,2% do gene *erm A* e 26,4% do gene *mef A* (BINGEN *et al.*, 2004).

Diferente do que tem ocorrido em alguns países e em algumas regiões do Brasil, a análise de susceptibilidade aos antimicrobianos demonstrou um comportamento característico dos *Streptococcus pyogenes*, descrevendo uma alta sensibilidade aos antibióticos testados (STEER *et al.*, 2007). Apesar das cepas terem apresentado grande capacidade de disseminação e virulência, não apresentam genes de resistência a antimicrobianos.

Apesar de a faringite estreptocócica poder ser auto-limitada o uso de antibióticos faz-se necessário, principalmente nas situações em que há a suspeita de um surto (KAPLAN e SHET, 2004). Diante dos resultados desse estudo verifica-se que uma parcela dos funcionários que tiveram cultura positiva para *Streptococcus pyogenes* na primeira coleta aderiram ao tratamento com penicilina e permaneceram como portadores do SBHGA na segunda coleta. Kaplan e Johnson em 2001 objetivando detectar falhas na terapia antimicrobiana para SBHGA, relataram que a penicilina não foi efetiva em tratar infecções causadas por diferentes sorotipos, entre os quais, o sorotipo nefritogênico M4 (KAPLAN e JOHNSON, 2001).

A utilização do PFGE como ferramenta de análise molecular foi determinado pelo seu alto poder de diferenciação genética e por ser de fácil interpretação. A metodologia é bastante trabalhosa, com um protocolo que leva oito dias contando da cultura de crescimento até o dia da revelação do gel de corrida. O alto custo da análise também é um fator negativo para a escolha da metodologia. Porém em casos de suspeita de surto o PFGE ainda demonstra com maior facilidade de interpretação as variações genéticas de cada isolado permitindo a identificação de eventos genéticos possivelmente relacionados com as pequenas diferenças entre clones (TENOVER, 1995). Na identificação de prováveis surtos é uma ferramenta que apresenta maiores parâmetros de diferenciação e comparação (ZHENG *et al.*, 2009).

Na análise dos isolados desse estudo evidenciamos com facilidade a presença de dois clones considerados parentes próximos. A presença de apenas dois fragmentos diferentes entre as amostras confirma a proximidade genética dos isolados. Segundo Tenover (1995), quando evidenciamos dois ou três fragmentos diferentes entre as amostras é indicativo de que há uma diferença genética, caracterizando as cepas como parentes próximos com a

mesma origem. Tenover ainda descreve as formas de identificação do evento genético que adicionou ou subtraiu a banda de diferenciação.

A denominação dos dois clones como clone A e clone A<sub>1</sub> foi determinado elegendo o isolado do caso de glomerulonefrite como sendo o caso índice, o qual teve o seu perfil eletroforético representado pela letra A. Analisando os 28 isolados, encontramos a presença de 20 perfis do Clone A e 8 perfis que se distinguiram do primeiro perfil apenas pela deleção de uma banda maior e aparecimento de uma banda intermediária, esse perfil passou a ser chamado de clone A<sub>1</sub>. De acordo com Tenover, quando temos parentes próximos, distintos por apenas uma diferença genética devemos denominá-los de Clones representados por letras maiúsculas do alfabeto com uma distinção numérica entre as letras (TENOVER, 1995).

Ainda com base no artigo de Tenover, analisando os dois clones, encontramos o evento genético que determinou os dois perfis. Como o caso índice determinou um perfil com uma banda superior e o clone A<sub>1</sub> apresentou o perfil com uma exclusão de banda superior e introdução de uma banda intermediária. Podemos interpretar tal diferença como deleção de um fragmento de DNA. Se as diferenças entre os perfis estivessem acusando uma terceira banda diferente com peso molecular bem menor, poderíamos afirmar que houve a inserção de um ponto de restrição na estrutura do DNA (TENOVER, 1995).

Analisando os perfis de primeira coleta e o de segunda coleta, notamos que os pacientes que apresentaram cultura positiva na segunda amostra ainda estavam colonizados pelo mesmo perfil. Isso pode implicar em duas hipóteses. A primeira é fundamentada em uma infecção posterior, ou seja, o indivíduo fez o tratamento correto e de forma eficiente e a infecção foi resolvida, como a segunda coleta ocorreu vinte dias depois é possível que o funcionário tenha entrado novamente em contato com o agente infeccioso, transformando-o novamente em um portador do *S. pyogenes*. A segunda hipótese é fundamentada em uma falha terapêutica, embora exista sensibilidade *in vitro* para os isolados de *S. pyogenes* ao antibiótico penicilina, falhas terapêuticas podem ocorrer entre 25 e 35% dos casos. Isso pode ocorrer devido à capacidade do microrganismo permanecer protegido da ação do agente antimicrobiano ou pela falta de adesão ao tratamento. No funcionário

P8 encontramos perfis diferentes nas duas coletas, como o paciente afirma não ter realizado o tratamento, entendemos que este funcionário fez a auto-limitação da infecção pelo primeiro clone. Entretanto o paciente entrou em contato com uma nova cepa, porém com o clone A<sub>1</sub> (CONLEY *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2003; GERBER *et al.*, 1999; MELLO *et al.*, 2003; SANS *et al.*, 2005).

Tenover afirma que linhagens provenientes de surtos pertencem à mesma espécie e são epidemiologicamente relacionadas, uma vez que são isoladas num mesmo período, dentro da mesma área e provenientes de uma fonte comum de infecção. Tais isolados são clonalmente relacionados, apresentando os mesmos fenótipos e genótipos (TENOVER, 1995).

Diante dessas definições e levando-se em conta os resultados obtidos neste trabalho, confirmou-se a ocorrência de um surto de faringite estreptocócica na indústria de produtos alimentícios, na cidade de Curitiba-PR, em março de 2004, com circulação de dois clones no local. O isolado do primeiro paciente que apresentou sintomas de faringite seguida de glomerulonefrite agrupou-se com mais 19 isolados do surto, apresentando similaridade genética de 100% por meio da técnica de PFGE. Com isso estes isolados são pertencentes a um sorotipo nefritogênico, caracterizando um surto de glomerulonefrite.

## 7 CONCLUSÃO

- Todos os isolados apresentaram sensibilidade aos seguintes antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, cefepime, azitromicina, penicilina, clindamicina, eritromicina, tetraciclina e vancomicina.

- A técnica de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* diferenciou dois clones epidemiologicamente relacionados com diferença de dois fragmentos no perfil clonal, demonstrando uma alteração genética ocasionada por deleção de um fragmento de DNA. Confirmando a alta sensibilidade da técnica na análise de variabilidade genética.

- O caso índice descreu o perfil clonal que tomamos como referência para evidenciar um surto, que foi confirmado com a presença de dois clones epidemiologicamente relacionados.

## REFERÊNCIAS

ACHARYA, U.; LAMONT, C.A.R.; COOPER. Group A beta-hemolytic *Streptococcus* causing disseminated intravascular coagulation and maternal death. **LANCET**, v. 12, p. 595, 1988.

ACIKGOZI, Z. C.; GOCER, S.; TUNCER, S. Macrolide resistance determinants of group A streptococci in Ankara, Turkey. **J Antimicrob Chemother**, v. 12 (52), p. 110-112, 2003.

AMEEN, A.S.; NSANZE, H.; DAWSON, K.P.; OTHMAN, S.; MUSTAFA, N.; JOHNSON, D.R.; KAPLAN, E.L. Serotypes of group A streptococci isolated from healthy schoolchildren in the United Arab Emirates. **Bull WHO**, v. 75, N. 4, P. 355-359, 1997.

ARAGON, T.; KATZ, M.; MINTZ, L.; VUGIA, D.; WATERMAN, S.; BRADSHAW, D.; LACEY, T.; SANDERS, M.; DDWYER, D. Nosocomial group A streptococcal infections associated with asymptomatic health-care workers –Maryland and California, 1997. **JAMA**, v, 281, n. 2, p. 1077-78, 1999.

AROUB, E.M.; BARRETT, D.J.; MACLAREN, N.K.; KRISCHER, J.P. Association of Class II human histocompatibility leukocyte antigens with rheumatic fever. **J Clin Invest**, v. 77, p. 2019-26, 1986.

AYOUB, E.; NELSON, B.; BARRET, D. Group A Streptococcal antibodies in subjects with or without rheumatic fever in areas with high or low incidences of rheumatic fever. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 10(5), p. 886-890, 2003.

BERT, F.; BRANGER, C.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. **Current Microbiology**, v. 34, p. 226-229, 1997.

BISNO, A. L. *Streptococcus pyogenes*. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infection Diseases**, 4 ed.; v. 2; c. 176, p. 1786-1799, 1995.

BISNO, A. L.; Acute Pharyngitis: Etiology and Diagnosis. **Pediatrics**, American Academy of Pediatrics, v. 97, n. 6 (part 2 of 2), p. 949-953, 1996.

BRANDT, C. M.; HAASE, G.; SPELLERBERG, B.; HOLLAND, R.; LÜTTICKEN, R.; DRS (Distantly related *sic*) Gene polymorphisms among *emm12*-type *Streptococcus pyogenes* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(4):1794-1797, Apr 2003.

CASCONE, C.; SANTAGATI, M.; NOVIELLO, S.; IANNELLI, F.; ESPOSITO, S.; POZZI, G.; STEFANI, S. Macrolide-Resistance Genes in Clinical Isolates of *Streptococcus pyogenes*. **Microb Drug Resist**, v. 8(2), p. 129-132, 2002.

CLEARY, P. P.; KAPLAN, E. L.; HANDLEY, J. P.; WLAZLO, A.; KIM, M. H. HAUSER, A. R.; SHLIEVERT, P. M. Clonal basis for resurgence of serious *Streptococcus pyogenes* disease in the 1980s. **LANCET**. V. 339, p. 518-521, 1992.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S18. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standard Institute**, January 2008.

COCKERILL, F. R.; MACDONALD, K. L.; THOMPSON, R. L.; ROBERSON, F.; KOHNER, P. C.; BESSER-WIEK, J. *et al.* An Outbreak of Invasive Group A Streptococcal Disease Associated With High Carriage Rates of the Invasive Clone Among School-aged Children. **JAMA**, v. 277(1), p. 38-43, 1997.

CONE, L. A.; WOODARD, D. R.; CHLIEVERT, P. M.; TOMORY, G. S. Clinical and bacteriologic observations of a toxic shock-like syndrome due to *Streptococcus pyogenes*. **New Engl J Med**, v. 317, n. 3, p. 11-14, 1987.

COUSER, W. G. Glomerulonephritis. **The Lancet**, 353: 1509, May 1999.

DESCHEEMAEKER, P.; CHAPELLE, S.; LAMMENS, C.; HAUCHECORNE, M.; WIJDOOGHE, M.; VANDAMME, P. *et al.* Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. **J Antimicrob Chemother**, v.45, p. 167-73, 2000.

DESJARDINS, M.; DELGATY, K. L.; RAMOTAX, K.; SEETARAM, C.; TOYE, B. Prevalence and Mechanisms of Erythromycin Resistance in Group A and Group B *Streptococcus*: Implications for Reporting Susceptibility Results. **J Clin Microbiol**, v. 42(12), p. 5620-5623, 2004.

DICUONZO, G.; FISCARELLI, E.; GHERARDI, G.; LORINO, G.; BATTISTONI,

F.; LANDI, S. *et al.* Erythromycin-Resistant Pharyngeal Isolates of *Streptococcus pyogenes* Recovered in Italy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46(12), p. 3987-3990, 2002.

DURMAZ, R.; DURMAZ, B.; BAYRAKTAR, M.; OZEROL, I. H.; KALCIOGLU, M. T.; AKTAS, E.; CIZMECI, Z. Prevalence of Group A Streptococcal Carriers in Asymptomatic Children and Clonal Relatedness among Isolates in Malatya, Turkey. **J Clin Microbiol**, v. 16; 41(11), p. 5285-5287, 2003.

EDWARDS, M. L.; FAGAN, P. K.; SMITH-VAUGHAN, H.; CURRIE, B. J.; SRIPRAKASH, K. S. Strains of *Streptococcus pyogenes* from severe invasive bind Hep2 and HaCat cells more avidly than strains from uncomplicated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(8): 3936: 3938, Aug 2003.

EFSTRATIOU, A. Group A streptococci in the 1990s. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 45:3-12, 2000.

ENGELGAU, M. M.; WOERNLE, C. H.; SCHWARTZ, B.; VANCE, N. J.; HORAN, J. M. Invasive group A *Streptococcus* carriage in a child care center after a fatal case. **Arch of Dis in Child**, v. 71(4), p. 318-322, 1994.

FACKLAM, R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clin Microbiol Reviews**, v. 15(4), p. 613-630, 2002.

FISCHETTI, V. A. Streptococcal M Protein. The bacteria that cause strep throat and rheumatic fever depend on his cell-surface molecule to evade the body's defenses. The key to the protein's power is its remarkable structure. **Scientific American**, p. 32-39, 1991.

FUJINO, M. YAMAKAMI K, ODA, T., OMASU, F., MURAI T. Sequence and expression of NAPIr is conserved among group A streptococci isolated from patients eith acute poststreptococcal glomerulonephritis (APSGN) and non-APSGN. **J. Nephrol**, v 20(3), p. 362-369. May-Jun 2007.

GONZÁLEZ-REY, C.; BELIN, A. M.; JÖRBECK, H.; NORMAN, M.; KROVACEK, K.; HENRIQUES, B.; KÄLLENIUS, G.; SVENSON, S. B. RAPD-PCR and PFGE as tools in the investigation of an outbreak of beta-haemolytic *Streptococcus* group A in a Swedish hospital. **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Diseases**, v. 26, p. 25-35, 2003.

GUILHERME L., POSTOL E., FRESCHI B. S., HIGA F., ALENCAR R., LASTRE M., ZAYAS C., PUSCHEL C. R. A vaccine against *S. pyogenes*: Design and experimental immune response. **Clin Microbiol Reviews**, v. 35(3), p. 443-458, 2009.

HAHN, R. G.; KNOX, L. M.; FORMAN, T. A. Evaluation of poststreptococcal illness. **American Family Physician**, Los Angeles, 71(10)1949, 2005.

JOHNSON, D. R. KAPLAN, E. L. SRAMEK, J.; BICOVA, R.; HAVLICEK, J.; HAVLICKOVA, H.; MOTLOVA, J.; KRIZ, P. **Laboratory diagnosis of group A streptococcal infections**, WHO, Geneva, p. 1-55, 1996.

JOHNSON, D. R.; STEVENS, D. L. KAPLAN, E. L. Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with severe systemic infections, rheumatic fever, or uncomplicated pharyngitis. **J Infect Dis**, v. 166, p. 374-382, 1992.

KAO, C. H.; CHEN, P. Y.; HUANG, F. L.; CHEN, C. W.; CHI, C. S.; LIN, Y. H.; SHIH, C. Y.; HU, B. S.; LI, C. R.; MA, J. S.; LAU, Y. .; LU, K. C.; YU, H. W. Clinical and genetic analysis of invasive and non-invasive group A streptococcal infections in central Twain. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 38:105-111, 205.

KAPLAN, E. L. The group A streptococcal upper respiratory tract carrier state: an enigma. **J Pediatrics**, v. 97, n. 3, p. 337-345, 1980.

KHANDKE, K. M. FAIRWELL, T.; MANJULA, B. N. Difference in the structural features of streptococcal M proteins from nephritogenic and rheumatogenic serotypes. **J Exp Med**, v. 166, p. 151-162, 1987.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECEKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5 ed, 2001. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda. Rio de Janeiro – RJ, p. 589-614.

KUMAR, R. K. RAMMOHAN, R.; NARULA, J.; KAPLAN, E. L. Epidemiology of streptococcal pharyngitis, rheumatic fever, and rheumatic heart disease. In Narula J, Virmani R, Reddy K. S., Tandon R. **Rheumatic Fever**, 1 ed, c. 2, p. 41-68, 1999.

LANCEFIELD, R. C. Specific relationship of cell composition to biological activity of hemolytic streptococci. **Harvery Lecture Ser**, v. 36, p. 251-290, 1941.

LAU, S K. P.; WOO, P. C. Y.; YIM, T.; TO, A. P. C.; YUEN, K. Molecular characterization of a strain of group A *Streptococcus* isolated from a patient with a psoas abscess. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(10):4888-4891, Oct 2003.

MARKOWTIZ, M. Lessons from the Recen Outbreaks of Rheumatic Fever in the United States. In: LUE, H. C. **Pediatric Cardiology Updates**. P. 123-127, 1997.

MAZÓN, A.; GIL-SETAS, A.; SOTA DE LA GÁNDARA, L. J.; VINDEL, A.; SÁEZ-NIETO, J. A. Transmission of *Streptococcus pyogenes* causing successive infections in a family. **Clin Microbiol Infect**, v. 9, p. 554-559, 2002.

MCGREGORT, K. F.; SPRATT, B. G. Identity and Prevalence of Multilocus Sequence Typing-Defined Clones of Group A Streptococcus within a Hospital Setting. **J Clin Microbiol**, v. 43(4), p. 1963-67, 2005.

MCSHAN, W. M., FERRETTI, J.J., KARASAWA T., SUVOROV, A.N. Genome sequence of a nephritogenic and highly transformable M49 strain of *Streptococcus pyogenes*. **J. Bacteriol**, v 23, p. 7773-7785, 2008

MELLO, M. C. N.; FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA-CARVALHO, B. T. Antimicrobial susceptibility patterns and genomic diversity in strains of *Streptococcus pyogenes* isolated in 1978-1997 in different Brazilian cities. **J Med Microbiol**, v. 52, p. 251-258, 2003.

MELO-CRISTINO, J.; SANTOS, L.; RAMIREZ, M. The Viriato Study: update of antimicrobial susceptibility data of bacterial pathogens from community-acquired respiratory tract infections in Portugal in 2003 and 2004. **Rev Port Pneumol**. v. 12, n. 1, p. 9-30, Jan-Feb, 2006.

MOSES, A. E.; WESSELS, M. R.; ZALCMAN, K.; ALBRETI, S.; NATANSON-YARON, S.; MENES, T.; HANSKI, E. Relative Contributions of Hyaluronic Acid Capsule and M Protein to Virulence in a Mucoïd Strain of the Group A *Streptococcus*. **Infec and Immun**, v. 65, n. 1, p. 64-71, 1997.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. **J Clin Microbiol**, v. 37(6), p. 1661-1669,.1999.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1661-1669 June 1999.

OLIVEIRA, R. E. C.; BARROS, R. R.; MENDONÇA, C. R. V.; TEIXEIRA, L. M.; CASTRO, A. C. D. Antimicrobial Susceptibility and Survey of Macrolide Resistance Mechanisms among *Streptococcus pyogenes* Isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 9(1), p. 87-91, 2003.

OLIVIER, A. Rheumatic fever- is still a problem? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 45:13-21, 2000.

QUIE, P. G. Development of effective programs for control of epidemic streptococcal infections. **Pediatr Infec Dis J**, v. 10, n. 10, p. 7-10, 1991.

ROBINSON, D. A.; SUTCLIFFE, J. A.; TEWODROS, W.; MANOHARAN, A.; BESSEN, D. E. Evolution and Global Dissemination of Macrolide-Resistant Group A Streptococci. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50(9), p. 2903-2911, 2006.

SCHWEON, S.; NOVATNACK, E. Don't underestimate group A strep. **Alberta Association of Registered Nurses**, 66(8):28-32, Aug 2003.

SEPPÄLÄ, H.; SKURNICK, M.; SOINI, H.; ROBERTS, M. C.; HOUVINEM, P. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42(2), p. 257-262, 1998.

SINGLE, L. A.; MARTIN, D. R. Clonal differences within M-types of the group A *Streptococcus* revealed by pulsed-field gel electrophoresis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 91, p. 85-90, 1992.

SMOOT, J. C.; KORGENSKI, E. K. DALY, J. A.; VEASY, L. G. MUSSER, J. M. Molecular analysis of group A *Streptococcus* type *emm* 18 isolates temporally associated with acute rheumatic fever outbreaks in Salt Lake City, Utah. **Journal of Clinical Microbiology**, 40(5):1805-1810, May 2002.

SPPÄLA, H.; HE, Q.; ÖSTERBLAD, M.; HUOVINEN, P. Typing of group A streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1945-1948. Aug, 1994.

STEER, A. C., DANCHIN M. H., CARAPETIS J. R., Group A streptococcal infections in children. **J Paediatr Child Health**, v. 43(4), p. 203-213, Apr. 2007.

STOLLERMAN, G.H. Clinical Microbiology of Group A Streptococci. In: Marula J, Virmani R, Reddy KS, Tandon R. **Rheumatic Fever**, 1 ed, c. 4, p. 79-101, 1999.

SUMITA ROY, M. D.; KAPLAN, E. L.; RODRIGUEZ, B.; SCHREIBER, J. R.; SALATA, R. A.; PALAVECINO, E.; JOHN, C. A Family Cluster of Five Cases of Group A Streptococcal Pneumonia. **Pediatrics**, v. 112, p. 61-65, 2003.

SWINGLER, G. R.; BIGRIGG, M. A.; HEWITT, B. G.; McNULTY, C. A. M. Disseminated intravascular coagulation Associated with group A streptococcal infection in pregnancy. **LANCET**, p. 1456-57, 1988.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURAY, B. E.; PERSING, D. H. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33(9), p. 2233–2239, 1995.

TODD, J. Streptococcal Infection. In: NELSON, W. E.; BEHRMAN, R. E.; KLIEGMAN, R. M.; ARVIN, A. M. **Textbook of Pediatrics**, 15<sup>th</sup> ed.; c. 175, p. 750-760, 1996.

TYRRELL, G. H.; LOVGREN, M.; FORWICK, B.; HOE, N. P.; MUSSER, J. M. TALBOT, J. A. M types of group A streptococcal isolates submitted to the national center for *Streptococcus* (Canada) from 1993 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 4466-4471. Dec, 2002.

VINEN, C. S.; OLIVEIRA, D. B. G Acute glomerulonephritis. **Postgraduate Medical Journal**, 79:206-213, 2003.

VIEIRA, F.M.; FIGUEIREDO C.R.; SOARES, M.C.; WECKX, L.Y. *et al.* Prevalence of *Streptococcus pyogenes* as an oropharynx colonizer in children attending daycare: a comparative study of different regions in Brazil. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 72(5): p. 587-591, 2006

WOODBURY, R. L.; KLAMMER, K. A.; XIONG, Y.; BAILIFF, T.; GLENNEN, A.; BARTKUS, J. M. *et al.* Plasmid-Borne *erm* (T) from Invasive, Macrolide-Resistant *Streptococcus pyogenes* Strains. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52(3), p. 1140-1143, 2009.

YAN, J. J.; LIU, C. C.; KO, W. C.; HSU, S. Y. WU, H. M. LIN, Y. S. LIN, M. T.; CHUANG, W. J. WU, J. J. Molecular analysis of group A streptococcal isolates associated with scarlet fever in southern Taiwan between 1993 and 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 4858-4861, Oct 2003.

YAN, J. J.; LIU, C. C.; KO, W. C.; HSU, S. Y.; WU, H. M.; LIN, Y. S. *et al.* Molecular Analysis of Group A Streptococcal Isolates Associated with Scarlet Fever in Southern Taiwan between 1993 and 2002. **J Clin Microbiol**, v. 41(10), p. 4858–4861, 2003.

YORK, M. K.; GIBBS, L.; PERDREAU-REMINGTON, F. Characterization of Antimicrobial Resistance in *Streptococcus pyogenes* Isolates from the San Francisco Bay Area of Northern California. **J Clin Microbiol**, v. 37(6): p. 1727-

1731, 1999.

ZHENG, M. H., JIAO Z. Q., ZHANG L. J., YU S. J., TANG G. P. YAN X. M., *et al*, Genetic analysis of group A streptococcus isolates recovered during acute glomerulonefrite outbreaks in Guizhou Province of China. **Clin Microbiol**, v. 47(3), p. 715-720, Dec. 2008.