

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA DE FÁTIMA FARIAS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Streptococcus dysgalactiae subsp. *equisimilis* OBTIDOS NO HOSPITAL DE
DERMATOLOGIA SANITÁRIA DO
PARANÁ

CURITIBA

2009

FERNANDA DE FÁTIMA FARIAS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Streptococcus dysgalactiae subsp. *equisimilis* OBTIDOS NO HOSPITAL DE
DERMATOLOGIA SANITÁRIA DO
PARANÁ

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de Concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica e Patologia Médica, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção de título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Vânia Aparecida Vicente

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Débora do Rocio Klisiowicz

CURITIBA

2009

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Farias, Fernanda de Fátima
Caracterização molecular de isolados de *Streptococcus dysgalactiae*
subsp. *equisimilis* obtidos no Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná.
/ Fernanda de Fátima Farias. – Curitiba, 2009.
65 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Vânia Aparecida Vicente
Co-orientadora: Débora do Rocio Klisiowicz

Dissertação (mestre) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia.

1. Estreptococo 2. Infecção I. Título II. Vicente, Vânia Aparecida III.
Klisiowicz, Débora do Rocio IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 589.85

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dra. Vânia Aparecida Vicente pela orientação, amizade e incentivo mesmo à distância.

À Prof^a Dra. Débora do Rocio Klisiowicz pela disponibilidade, paciência, sem a qual esse trabalho não seria possível, o meu muito obrigada!

À Dra. Rosângela Stadnick Lauth de Almeida Torres minha eterna gratidão pelos anos de ótima convivência, pela amizade, conselhos, e por ser um exemplo a ser seguido.

À Prof^a. Dra. Ilma Hiroko Higuti pelo apoio e ajuda prestados.

Aos queridos amigos que fiz durante esses anos no laboratório, sem os quais nada disso seria possível: Francine, Raquel, Eduardo, Samarina. Muito obrigada pelos momentos de descontração que me deram motivação durante todo o período de elaboração deste trabalho.

Aos meu familiares, em especial meus pais, pelo apoio e por todo o incentivo, por ser quem sou.

Ao meu querido esposo José pelo companheirismo, paciência, dedicação e por todo o amor e carinho nos momentos difíceis.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O número de infecções causadas pelos estreptococos do grupo C de Lancefield vêm aumentando significativamente nos últimos tempos. Estes microrganismos que anteriormente eram mais associados a infecções em animais têm demonstrado importante papel como agente oportunista no homem, ocorrendo em lesões ulceradas, septicemia, bacteremia e síndrome do choque tóxico estreptocócico. Métodos moleculares foram utilizados para caracterização de 83 isolados de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* obtidos de secreção de lesão ulcerada de pacientes internados no Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná, no período de 2002 a 2007. Também foram incluídos neste estudo dois isolados provenientes de secreção de orofaringe de funcionários do hospital, três do ambiente hospitalar e quatro isolados de fezes de animais do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, localizado nas proximidades do hospital. A análise por RAPD revelou grande variabilidade, e a determinação do tipo-M através do sequenciamento do gene *emm* revelou seis tipos-M, sendo que três tipos-M principais (stG6792, stC1400 e stG211) circulavam entre os pacientes do hospital, provenientes de diferentes fontes de infecção. O tipo-M stC1400 está relacionado exclusivamente com isolados obtidos em pacientes da ala masculina do hospital evidenciando uma importante disseminação do agente pelo ambiente hospitalar.

Palavras-chave: Estreptococos do grupo C. RAPD. Proteína M. Caracterização molecular. Infecção de lesão.

ABSTRACT

The number of infections caused by *Streptococcus* Lancefield group C have increased significantly in recent times. These micro-organisms that were once more associated from infections in animals have shown significant potential as opportunistic agent in humans, being involved in diseases such as chronic leg ulcers, sepsis, bacteremia and acute streptococcal toxic shock. Molecular methods were used for molecular characterization of isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, Lancefield group C, obtained from secretion of ulcer patients at the Hospital of Sanitary Dermatology of Paraná; 83 isolates from patients hospitalized from 2002 to 2007 were used and also two isolates from throat secretions of hospital staff, three isolates from hospital environment and four isolates from feces of animals of the Center for Production and Research of Immunobiology, located near the hospital. The RAPD analysis revealed great variability, and determination of M-type by *emm* gene sequencing revealed six M-types, three main types-M (stG6792, stC1400 and stG211) were circulating among hospital patients from different sources of infection. M-type stC1400 is related exclusively to isolates from patients in the male ward of the hospital showing a significant dissemination of the agent for the hospital.

Key words: *Streptococcus* group C. RAPD. M protein. Molecular characterization. Infected lesion.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *S. equisimilis* UTILIZANDO O OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR OPA 13 42
- FIGURA 2 – DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS GRUPOS DE *S. equisimilis*..... 43
- FIGURA 3 – ARVORE FILOGENÉTICA DOS HAPLOTIPOS NUCLEOTÍDICOS DO GENE PARCIAL *EMM* DE ISOLADOS DE *S. equisimilis*. MÉTODO DE NEIGHBOR-JOINING COM DELEÇÃO PAR A PAR, UTILIZANDO O MODELO DE DIFERENÇAS NUCLEOTÍDICAS. BOOTSTRAP: 1000..... 44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – SEQÜÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS EM CADA REAÇÃO DE RAPD	37
TABELA 2 – RESULTADOS OBTIDOS PELO RAPD E SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO PARCIAL DO GENE <i>emm</i> PARA OS ISOLADOS DE <i>S.</i> <i>equisimilis</i> DE PACIENTES.....	45
TABELA 3 – RESULTADOS OBTIDOS PARA OS ISOLADOS DE ANIMAIS, FUNCIONÁRIOS E AMBIENTE.....	47

LISTA DE SIGLAS

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CPPI – Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos

DNA – Acido desoxirribonucléico

HDSPR – Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná

LACEN-PR – Laboratório Central do Estado do Paraná

RAPD – análise do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PFGE – Eletroforese em gel de campo pulsado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Características gerais e identificação.....	16
3.2 Estreptococos beta-hemolíticos de importância clínica.....	17
3.3 Caracterização molecular de sorotipos de estreptococos beta-hemolíticos.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Local de coleta e linhagens utilizadas.....	31
4.2 Meios de cultura, reagentes e soluções.....	31
4.2.1 Solução Salina.....	31
4.2.2 Meio de Stuart.....	32
4.2.3 Ágar Sangue.....	32
4.2.4 Meio Todd – Hewit.....	32
4.2.5 Clorofórmio-álcool isoamílico.....	32
4.2.6 DNA Polimerase.....	33
4.2.7 dNTP.....	33
4.2.8 Gel de Agarose (0,8%).....	33
4.2.9 Gel de Agarose (1,4%).....	33
4.2.10 Oligonucleotídeos iniciadores.....	33
4.2.11 Tampão CTAB.....	33
4.2.12 Tampão de Corrida para Gel de Agarose.....	34
4.2.13 Tampão Tris-EDTA.....	34
4.2.14 Solução de Brometo de Etídio.....	34
4.3 Isolamento.....	34
4.4 Identificação fenotípica	35
4.5 Extração do DNA total	36

4.6 RAPD.....	37
4.6.1 Análise do Polimorfismo Obtido por marcadores RAPD.....	38
4.7 Reações de sequenciamento do gene <i>emm</i>	38
4.7.1 Extração do DNA total.....	38
4.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	39
4.7.3 Reação de Sequenciamento.....	39
4.7.4 Análises das Sequências.....	40
4.7.5 Análises Filogenéticas.....	40
5. RESULTADOS.....	41
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

O *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, grupo C de Lancefield, é considerado um patógeno humano emergente, demonstrando importante papel como agente oportunista, sendo responsável por diversas doenças como infecções de feridas dermatológicas (DUCA *et al.*, 1969), lesões ulceradas (GOLDMAN; BRETON, 1978), pneumonia (STAMM; COBBS, 1980), septicemia, bacteremia (LAM; BAYER, 1984), celulite, faringite, meningite, endocardite (EFSTRATIOU, 1989), artrite séptica (GONZALEZ *et al.*, 2001), osteomielite vertebral (KUMAR *et al.*, 2005), síndrome do choque tóxico estreptocócico e surtos hospitalares (HASHIKAWA *et al.*, 2004), abscesso peritonsilar (GUPTA, LOVVORN e CENTOR, 2009).

Estabelecer a relação genética entre subgrupos de *Streptococcus dysgalactiae* é necessário para elucidar questões básicas envolvendo a epidemiologia, patogenicidade e identificação desses microrganismos (VIEIRA *et al.*, 1998). O processo de tipagem molecular é importante epidemiologicamente para caracterizar surtos de infecção, detectar a transmissão de patógenos nosocomiais, determinar a fonte de uma infecção além de possibilitar a caracterização de linhagens virulentas (OLIVE; BEAN, 1999).

O RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA Analysis*), análise do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, tem sido usado para a caracterização molecular de diversas bactérias de importância clínica (VAN BELKUM, 1994). É uma ferramenta simples para determinar a relação genética entre isolados de uma espécie (BERT *et al.*, 1996).

O sequenciamento do gene que codifica a proteína M já foi utilizado com sucesso para estreptococos, incluindo os grupos C e G de Lancefield. Assim como para estreptococos do grupo A, a proteína M é responsável pela resistência a fagocitose para os estreptococos do grupo C e sua tipagem molecular é utilizada em estudos epidemiológicos (MCDONALD *et al.*, 2007).

Estudos recentes revelam uma alta prevalência de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, do Grupo C de Lancefield, em pacientes internados no Hospital

de Dermatologia Sanitária do Paraná (HDSPR). No período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004 foi verificada a prevalência de 32,37% das amostras de secreção de lesão enviadas ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR). No ano de 2004 foi observado um aumento significativo na prevalência deste microrganismo nas secreções de lesão, 42% em 2004 enquanto que em 2002 a prevalência era de 11%. Em seis amostras o *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* cresceu como cultura pura (TORRES *et al.*, 2007).

Animais (eqüinos) confinados no CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos), nas proximidades do hospital, foram identificados como portadores do *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* e, no local há livre circulação de pacientes. Sendo assim, das amostras de fezes destes animais foram isolados *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* e estes foram comparados com isolados provenientes dos pacientes, visando o entendimento da rota de transmissão e epidemiologia da infecção.

Dentro deste contexto, o objetivo do presente estudo foi o de utilizar marcadores moleculares, RAPD e sequenciamento parcial do gene da proteína M (gene *emm*) para caracterização molecular de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolados de amostras de secreção de lesões ulceradas de pacientes internados no HDSPR, além de isolados de amostras de fezes de animais que circulam próximos ao hospital, de ambiente e de funcionários do hospital.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar molecularmente isolados de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* obtidos de lesões ulceradas de pacientes do Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná (HDSPR), de secreção de orofaringe de funcionários, do ambiente hospitalar e de fezes de animais do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI).

2.2 Objetivos específicos

- Contribuir para estudos epidemiológicos de estreptococos do grupo C.
- Utilizar o marcador molecular, RAPD para verificar variabilidade genética entre as amostras de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isoladas de pacientes, funcionários (médicos, enfermeiros e demais funcionários) e ambiente do HDSPR e de fezes de animais do CPPI.
- Determinar os tipos-M dos isolados através do sequenciamento do gene parcial que codifica a proteína M (gene *emm*), visando à detecção de uma possível relação entre os isolados.
- Analisar a relação genética entre os *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolados de pacientes, funcionários, animais e ambiente, visando o entendimento da rota de disseminação deste microrganismo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A descoberta dos estreptococos por Billroth ocorreu há mais de um século e desde então vem fascinando e desafiando cientistas do mundo todo. Louis Pasteur, em 1879, após identificar cocos em cadeia a partir do útero e no sangue de mulheres que morriam de sepse puerperal, relacionou os estreptococos com as doenças supurativas (QUIE, 1991).

Schottmüller (1903, citado por Brown, 1919), classificou os estreptococos em hemolíticos e não hemolíticos, com a utilização de placas de ágar sangue. Esta classificação só ganhou a denominação de alfa, beta e gama quando Brown (1919), definiu tal terminologia com base em seu comportamento em ágar sangue. A prova da hemólise em ágar sangue é uma das provas mais importantes para identificação de estreptococos, pois dá subsídios para chegar até o nível de espécie (BROWN, 1919).

Em 1932, Rebecca Lancefield classificou os estreptococos beta-hemolíticos através da sorogrupagem baseada nos carboidratos de parede celular específicos, criando a primeira divisão sorológica dos estreptococos em grupos (A, B, C, D, e E) (LANCEFIELD, 1932). Este componente antigênico específico (carboidrato C) possibilitou a atual classificação em vinte grupos sorológicos (A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, e V). Além disso, o antígeno de superfície foi reconhecido como sendo responsável pela resistência à fagocitose, identificando-o, desta maneira, como o fator de virulência mais importante deste microrganismo. Atualmente os estreptococos podem ser sorogrupados utilizando-se anti-soros específicos e a espécie pode ser identificada através de testes fenotípicos (FACKLAM, 2002).

Sherman, em 1937, propôs um esquema de agrupamento para os estreptococos em quatro categorias, baseadas na hemólise em ágar sangue; sorogrupagem através dos carboidratos de parede celular e testes fenotípicos. Os grupos definidos por ele foram estreptococos piogênicos, viridans, lácticos e os enterococos. No grupo dos piogênicos já estavam incluídos os grupos A, B, C, E, F e G de Lancefield.

Em estudos recentes, observa-se que os principais estreptococos beta-hemolíticos, envolvidos em doença humana, são os pertencentes aos grupos A, B, C, e G de Lancefield. Mudanças na nomenclatura e taxonomia continuam ocorrendo, o que torna as técnicas de caracterização molecular essenciais na identificação, principalmente de estreptococos não beta-hemolíticos. Com relação aos beta-hemolíticos, que podem ser sorogrupados por Lancefield e ter sua espécie definida através de poucos testes fenotípicos, atualmente são conhecidas 11 espécies e 4 subespécies de estreptococos (FACKLAM, 2002).

3.1 Características gerais e identificação

Os membros do gênero *Streptococcus* são bactérias gram-positivas, catalase-negativas e oxidase-negativas, pertencentes a família Streptococcaceae. São esféricas e tendem a crescer aos pares e em cadeias. A maioria dos estreptococos é anaeróbia facultativa, mas alguns são anaeróbios obrigatórios. Os estreptococos são agrupados entre as bactérias ácido-láticas porque fermentam glicose, produzindo lactose (KONEMAN *et al.*, 2001).

O sangue desfibrinado de carneiro é o suplemento para meio de cultura mais aceito na rotina laboratorial, sendo utilizado como padrão por definir as reações hemolíticas dos estreptococos (ANAND *et al.*, 2000). Os estreptococos beta-hemolíticos crescem formando colônias beta-hemolíticas branco-acizentadas, convexas e com bordas contínuas, translúcidas ou transparentes e sua superfície é brilhante ou fosca, de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro após 24 horas de incubação. O halo de hemólise é geralmente igual a duas a quatro vezes o diâmetro da colônia (KONEMAN *et al.*, 2001).

A composição da parede celular dos estreptococos é similar a de outras bactérias gram-positivas, sendo formada por glicopeptídeo, no qual estão inseridos diversos carboidratos, ácidos teicóicos, lipoproteínas e proteínas antigênicas de superfície (KONEMAN *et al.*, 2001).

O sistema de classificação de Lancefield diferencia, principalmente, os estreptococos beta-hemolíticos com base no antígeno de carboidrato encontrado no interior de suas paredes celulares. Os carboidratos C, são em sua maioria, ácidos teicóicos que podem ser identificados utilizando-se anticorpos tipo-específicos. O antígeno carboidrato específico de grupo existente na parede celular é extraído por meio de extração ácida ou enzimática, e solubilizado. A maioria dos sistemas compactos comerciais utiliza métodos de aglutinação com látex ou ensaios imunoenzimáticos (KONEMAN *et al.*, 2001).

3.2 Estreptococos beta-hemolíticos de importância clínica

Os estreptococos do grupo A foram os mais extensivamente pesquisados, e têm o *Streptococcus pyogenes* seu principal representante. São os mais frequentemente encontrados em infecções de orofaringe, sendo a doença geralmente auto limitada, mas seu progresso pode causar abscessos, linfadenite cervical, sinusite, otite média e, às vezes, meningite (KAPLAN, 1980; BISNO, 1996; DAJANI *et al.*, 1995). As infecções por estreptococo do grupo A sempre precedem o desenvolvimento de febre reumática, que é uma seqüela inflamatória e não supurativa, que afeta principalmente o coração. A febre reumática apresenta marcada tendência a recorrência e a lesão cardíaca pode levar à morte (WHO STUDY GROUP, 1988).

O termo “estreptococos do grupo A”, acabou sendo usado como sinônimo de *Streptococcus pyogenes*, apesar de que os *Streptococcus anginosus* formadores de colônia diminuta e os *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (*S. equisimilis*) também possam apresentar o antígeno de parede A de Lancefield (JACOBS *et al.*, 1995; PISCITELLI *et al.*, 1992; FACKLAM, 2002).

Os estreptococos do grupo B são importante causa de morbi-mortalidade materna e neonatal em todo o mundo, desde a década de 70. Antes disso, acreditava-se tratar de um microrganismo comensal. O *Streptococcus agalactiae* é a

espécie do grupo mais diretamente envolvida nestes casos (SHET; FERRIERI, 2004).

Os estreptococos do grupo G, por envolverem um grande número de microrganismos, podem ser diferenciados em três grupos principais: (i) estreptococos beta-hemolíticos do grupo G isolados do homem; (ii) estreptococos beta-hemolíticos do grupo G isolados de animais designados *S. canis*, que diferem do isolado humano pela sua atividade fibrinolítica (LAMMLER *et al.*, 1988), e (iii) estreptococos com colônia beta-hemolítica do grupo G diminuta isolada do homem. O isolado humano com colônia não diminuta é associada com faringite, infecções de pele e tecidos, septicemia, endocardite e artrite (LAM; BAYER, 1984).

Os estreptococos do grupo C foram descritos em 1932 e, desde então, sofreram mudanças em relação à compreensão de sua patogenicidade. Atualmente este microrganismo tem demonstrado importante papel como agente oportunista, estando envolvidos em infecções e surtos hospitalares (FARROW; COLLINS, 1984). O nível de atenção para as infecções causadas por este microrganismo aumentou nos últimos anos, o que pode ser explicado pela mudança na virulência das linhagens, pelo aumento do número de indivíduos apresentando fatores de risco, ou ainda, pela melhoria das técnicas de identificação microbiológicas (GONZALEZ *et al.*, 2001; PINHO *et al.*, 2006).

Rebecca Lancefield estudou estreptococos do grupo C de origem animal (LANCEFIELD, 1932). Nesta época, eram mais associados a infecções em animais, porém, ultimamente tem aumentado o relato de casos de infecções no homem (SALATA *et al.*, 1989). Estes microrganismos podem ser parte da microbiota normal da nasofaringe, pele e trato gastrointestinal e genital humano. Infecções causadas por estes microrganismos foram descritas principalmente em pacientes imunocomprometidos ou apresentando alguma doença subjacente como uma enfermidade cardíaca ou oncológica (OJUKWU *et al.*, 2001).

Os estreptococos do grupo C de Lancefield são caracterizados por suas reações sorológicas contra o grupo específico do carboidrato (ramnose-N-acetilgalactosamina) localizado na parede celular (STAMM; COBBS, 1980).

Segundo Pinho (2006), a classificação taxonômica dos estreptococos do grupo C está em constante modificação, porém Facklam (2002), descreve quatro espécies

de estreptococos do grupo C: *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. equi* subsp. *equi* and *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, sendo que o último não apresenta beta-hemólise.

As duas espécies mais isoladas a partir de infecções humanas são os *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* e *S. equi* subsp. *zooepidemicus* que podem ser diferenciadas através de suas propriedades bioquímicas (STAMM; COBBS, 1980).

As infecções no homem, envolvendo os *S. equi* subsp. *zooepidemicus* são quase que restritos a indivíduos em contato com animais ou que ingeriram leite não pasteurizado (BARNHAM *et al.*, 1987). Estas infecções podem ser fatais, como pneumonia, septicemia, endocardite, meningite e nefrite (BALTER *et al.*, 2000). Este microrganismo normalmente pode ser isolado da pele e trato respiratório de cavalos e pode vir a desencadear a doença do estrangulamento em cavalos e abscessos em suínos (DOWNAR *et al.*, 2001; GOLDMAN; BRETON, 1978).

Em 1936, o *S. equisimilis* foi primeiramente descrito (FROST; ENGELBRECHT, 1940). No homem, pode colonizar a pele, garganta e trato genital. Os *S. equisimilis* são comumente isolados de culturas de orofaringe, especialmente em regiões tropicais, e têm a capacidade de trocar elementos genéticos, inclusive os relacionados à virulência, com os estreptococos beta-hemolíticos do grupo A (MCDONALD *et al.*, 2006).

Em animais, principalmente equinos, o *S. equisimilis* é normalmente encontrado na pele e mucosas (BONE *et al.*, 1963). Foi relatado como causa de linfadenite e placentite, mas não é observado com tanta frequência (TIMONEY, 2004). Em suínos, o *S. equisimilis* causa artrite supurativa, proliferativa e erosiva (SCANLAN, 1989).

Bone (1963), relatou em seus estudos que o *S. equisimilis* é geneticamente distinto do *S. equi* e do *S. zooepidemicus*, com os quais compartilha baixa homologia no DNA (BONE *et al.*, 1963). Deibel (1974), afirmou que o *S. equisimilis* é a única espécie do grupo a produzir estreptolisina O e estreptoquinase (DEIBEL; SEELEY, 1974). Ambos são produtos extracelulares que estimulam a produção de anticorpos e cuja medida laboratorial é útil para evidenciar uma infecção recente por estreptococos.

Os *S. equisimilis*, são, em geral, resistentes à bacitracina, apresentam prova negativa para pirrolidonorilamidase, CAMP-test negativo, reação de Voges-Proskauer negativa, arginina positiva, hidrolisam a esculina, fermentam a trealose e a ribose mas não o sorbitol (FACKLAM, 2002).

A prova de sensibilidade a bacitracina foi amplamente realizada como triagem para presença de *S. pyogenes*, o que deixou, na década de 70, os estreptococos do grupo C (bacitracina resistentes) esquecidos (ROSS *et al.*, 1971). Goldman e Breton (1978), relataram um surto que enfatiza a importância da identificação precisa dos estreptococos beta hemolíticos, através da técnica de sorogrupagem, já que em seus estudos o autor concluiu que 6% dos estreptococos do grupo C são sensíveis a bacitracina, o que pode levar à confusão com os estreptococos do grupo A (POLLOCK; DAHLGREN, 1974).

Devido a diversas mudanças e confusões na nomenclatura e classificação dos *S. equisimilis* relatadas na literatura, os dados epidemiológicos das infecções causadas por este microrganismo estão subestimados (VIEIRA *et al.*, 1998). Pinho *et al.*, (2006) relatou que dados epidemiológicos sobre infecção causada por espécies de estreptococos do grupo C de Lancefield no homem, em diferentes regiões geográficas, são na grande maioria desconhecidos.

O primeiro surto de febre puerperal causada pelo *S. equisimilis* foi relatada em 1989 por Teare. Em seu estudo, o *S. equisimilis* foi isolado da secreção de orofaringe de funcionários do hospital, entre médicos e enfermeiras, o que contribuiu para a disseminação do microrganismo através do ambiente hospitalar, além da transmissão paciente para paciente.

Barnum (1989), mencionou em seu trabalho que os estreptococos penetram no corpo através de feridas. Kristensen (1995), analisando bacteremias causadas por estreptococos beta-hemolíticos durante 13 anos, observou que a pele foi o foco principal nas bacteremias causadas por estreptococos dos grupos A, C e G e, ainda, que pacientes idosos ou que passaram por procedimento cirúrgico foram, em geral, mais acometidos por infecções causadas pelo grupo C (KRISTENSEN; SCHONHEYDER, 1995).

Bisno, Collins e Turner (1996), observou que os estreptococos dos grupos C e G isolados do homem formavam grandes colônias em meio de cultura e que

apresentavam cápsula de ácido hialurônico. Estes autores também relataram que os estreptococos dos grupos C e G produzem proteína M, e que esta tem estrutura, características bioquímicas e imunológicas semelhante à proteína M dos estreptococos do grupo A, linhagens que não expressam proteína M são avirulentas. A proteína M é uma proteína de superfície e é o fator primário de virulência nos estreptococos, pois confere a estes microrganismos a capacidade de resistir a fagocitose (SCHNITZLER *et al.*, 1995). As seqüências variáveis da porção amino-terminal das proteínas M podem ser determinadas pelo sequenciamento do gene codificante de proteína M o *emm* (ALBERTI *et al.*, 2005).

É conhecido, para os estreptococos do grupo A, a proteína M, que inibe a ativação da via alternativa do sistema complemento e impede a fagocitose pelos leucócitos polimorfonucleares (CUNNINGHAM, 2000). Hashikawa *et al.* (2004), demonstraram que estreptococos dos grupos C e G também expressam proteínas M que apresentam alta homologia com a do grupo A, sendo possível que as proteínas M dos grupos C e G também possuam atividade antifagocítica. Segundo Williams (2003), os estreptococos dos grupos C e G possuem a proteína M e são capazes de causar faringite. A proteína M é importante na patogênese dos estreptococos grupos C e G de Lancefield, apesar de seu papel ainda não ser totalmente conhecido (PINHO *et al.*, 2006).

Nos estreptococos do grupo A, a proteína M e tipo-M formam fimbrias de superfície e exibem um importante polimorfismo que são a base para a identificação sorológica de mais de 80 tipos-M diferentes (ENRIGHT *et al.*, 2001; SCHNITZLER *et al.*, 1995). Para estreptococos do grupo A, M-tipos tem sido sugerido como sinalizadores da tendência de ligação do microrganismo a um determinado sítio anatômico (MCGREGOR *et al.*, 2004).

Atualmente a caracterização molecular dos estreptococos é baseada no sequenciamento do gene *emm* que codificam as proteínas M e “M-like” (semelhante a proteína M, termo utilizado para estreptococos dos grupos C e G de Lancefield), é uma ferramenta amplamente utilizada (ENRIGHT *et al.*, 2001). Existe uma extensa homologia na seqüência entre os genes para proteína M dos grupos C e G e a seqüência do gene *emm* do grupo A (MCDONALD *et al.*, 2007). Porém o papel da proteína M ainda não está bem definido na patogênese de estreptococos dos grupos C e G (PINHO *et al.*, 2006).

Kalia e Bessen (2003), demonstraram a aquisição de genes de virulência pelos estreptococos do grupo G, a partir de isolados do grupo A, o que corresponde com a hipótese de que estreptococos dos grupos C e G anteriormente apenas comensais para o homem, podem estar surgindo como patógenos com potencial de virulência aumentado.

O trabalho de McDonald *et al.*, (2006) investigou de agosto de 2003 a junho de 2005, a prevalência estreptocócica dos grupos A, C e G na colonização e infecção de garganta e pele em 3 comunidades isoladas ao norte da Austrália, e a taxa de isolamento do grupo C foi relativamente alta em uma das comunidades (75%). Os autores concluíram que os estreptococos dos grupos C e G são comumente encontrados na orofaringe, mas não na pele.

Tanaka *et al.*, (2008), relataram o primeiro caso de síndrome do choque tóxico causada por um *S. equisimilis* do grupo A de Lancefield. Entre 2000 a 2004, observou-se que um clone conservado de *S. equisimilis*, persistia espalhado pelo Japão. Foi demonstrado através do sequenciamento da região 16S e MLST que os 13 isolados incluídos no estudo apontavam para uma origem comum.

A rota de transmissão precisa de uma infecção estreptocócica é desconhecida. Os estreptococos podem ser carreados pelas mãos, nariz ou em aerossóis, como foi relatado para o grupo A (GOLDMAN; BRETON, 1978). As fezes de animais podem ser consideradas fontes de disseminação da infecção para o homem, pois permanecem no solo expostas ao ar livre, sendo veiculadas através da poeira e/ou aerossóis (TORRES *et al.*, 2007).

3.3 Caracterização molecular de sorotipos de estreptococos beta-hemolíticos

Os estreptococos beta-hemolíticos causam surtos em hospitais e em comunidades com uma velocidade tão grande que, muitas vezes, são necessárias técnicas de tipagem molecular eficientes para identificar a origem da linhagem responsável pelo surto (BERT *et al.*, 1996). O reconhecimento de uma linhagem

epidêmica e sua comparação com isolados de contatos próximos e com isolados do meio ambiente é muito útil na determinação do modo de transmissão da infecção e medidas de controle e prevenção adequadas (RAYMOND *et al.*, 2005).

O objetivo da tipagem molecular de um microrganismo é fornecer evidências de que isolados epidemiologicamente relacionados, ou seja, obtidos durante um surto de uma doença, são também geneticamente relacionados e, além disso, representam a mesma linhagem. Essa informação pode ajudar a entender e controlar a disseminação de uma infecção em um hospital ou em uma comunidade (TENOVER *et al.*, 1995).

Para que o método de tipagem molecular escolhido seja mais efetivo, as amostras devem ser obtidas de fontes de pacientes, fômites e meio ambiente que estejam relacionadas com (i) o espaço no qual a infecção está ocorrendo, (ii) o período no qual a infecção ocorreu, e (iii) uma fonte comum de infecção. Além disso, os dados obtidos com a tipagem molecular devem ser analisados em conjunto com os dados epidemiológicos (TENOVER *et al.*, 1995).

Surtos de doenças infecciosas geralmente resultam da exposição a uma fonte comum do agente etiológico, que geralmente é derivado de uma única célula, cuja progênie é geneticamente idêntica ou proximamente relacionada ao microrganismo de origem. Em termos epidemiológicos, microrganismos envolvidos em um surto são clonalmente relacionados, ou seja, são membros de uma mesma espécie que tem em comum fatores de virulência, características bioquímicas e genéticas. Entretanto, existe diversidade suficiente dentro de uma mesma espécie, para que microrganismos isolados de diferentes fontes, em diferentes tempos e diferentes regiões geográficas possam ser classificados dentro de sorotipos (OLIVE; BEAN, 1999).

Um método que permita chegar até esses subtipos dentro de uma espécie deve apresentar alto poder discriminatório (ARBEIT, 1995). A metodologia utilizada deve ser capaz de diferenciar isolados não-relacionados e, ao mesmo tempo, demonstrar a relação entre os microrganismos isolados de indivíduos infectados de uma mesma fonte. A reprodutibilidade do método também tem muita importância para a construção de uma base de dados confiável (OLIVE; BEAN, 1999).

Métodos moleculares são reconhecidos atualmente como mais efetivos que os métodos fenotípicos tradicionais para a tipagem de diferentes microrganismos (PEREIRA *et al.*, 2002). Muitas técnicas moleculares utilizadas baseiam-se na separação eletroforética de fragmentos de DNA de diferentes comprimentos moleculares. O resultado é representado por um padrão de bandas em um gel. A facilidade com a qual os padrões são interpretados e relacionados é um fator que deve ser levado em conta na escolha de um método de tipagem, bem como sua praticidade, facilidade técnica, custo e tempo (OLIVE; BEAN, 1999).

A diferenciação fenotípica das subespécies de estreptococos do grupo C pode ser confusa. Devido a isso, são conhecidos vários métodos moleculares de caracterização, como sequenciamento de regiões intergênicas do gene 16S-23S (CHANTER *et al.*, 1997), sequenciamento de proteína M (MCDONALD *et al.*, 2007), polimorfismo de DNA através de RAPD-PCR (DUARTE *et al.*, 2004), e PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) associada ao RAPD (GONZALEZ-REY *et al.*, 2003).

O RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA Analysis*), análise do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, é uma técnica baseada no uso de uma seqüência curta (9 a 10 bases) e aleatória de um único oligonucleotídeo iniciador que hibridiza com afinidade suficiente a uma seqüência de DNA cromossômico, que pode ser utilizado para iniciar a amplificação de regiões do genoma bacteriano. O número e o local de ligação desse oligonucleotídeo iniciador varia em diferentes linhagens de uma espécie bacteriana e o padrão de produtos de amplificação obtidos por separação em eletroforese em gel de agarose é característico de uma linhagem bacteriana específica (CAETANO-ANOLLES *et al.*, 1991; MEUNIER; GRIMONT, 1993; WELSH; MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990).

O uso de técnicas de biologia molecular como o RAPD, é importante para discriminar isolados bacterianos intra e interespecíficos. Os oligonucleotídeos iniciadores aleatórios geram um padrão de segmentos amplificados que exibem relação entre isolados relacionados geneticamente. Geralmente, é aceito que qualquer polimorfismo observado entre isolados relacionados é devido a mutações na seqüência de nucleotídeos. Com esta técnica é possível estabelecer a similaridade entre isolados bacterianos, o que gera dados muito importantes (SPOLIDORIO *et al.*, 2003).

Willians *et al.* (1990), foram os primeiros a descrever este tipo de marcador. Welsh e McClelland (1990), na mesma época publicaram um trabalho utilizando o mesmo princípio do RAPD e denominaram técnica de AP-PCR (Arbitrarily-Prime-Polimerase Chain Reaction). Porém, esta técnica utilizando oligonucleotídeos arbitrários, ficou mais conhecida como RAPD (WELSH; MCCLELLAND, 1990). Inúmeras são as vantagens oferecidas por estes marcadores, como exemplo: a técnica não utiliza radioatividade, não requer o conhecimento prévio da seqüência alvo a ser amplificada, necessita de pequenas quantidades de DNA, além de ser aplicável a qualquer espécie.

A utilização de RAPD em conjunto com PFGE demonstrou ser uma importante ferramenta epidemiológica em estudos com estreptococos do grupo A, como pode ser observado em um estudo de González-Rey *et al.* (2003). Este trabalho foi realizado com um surto de estreptococos do grupo A em duas alas diferentes de uma maternidade. Os isolados de pacientes e funcionários do hospital mostraram o mesmo padrão de RAPD, porém, no PFGE um dos isolados mostrou um padrão diferente, o que não significou um clone distinto, sugerindo uma fonte de contaminação durante o surto.

A análise de endonuclease de restrição (REA) já foi comprovadamente capaz de diferenciar entre isolados de estreptococos do grupo A de Lancefield, porém, Seppala *et al.* (1994), demonstrou que a análise de marcadores RAPD tem melhor poder discriminatório do que o REA para a caracterização molecular do grupo A. Os dois métodos foram comparados utilizando-se 160 isolados de estreptococos do grupo A de Lancefield epidemiologicamente não-relacionados. Os resultados obtidos com os dois métodos estavam em concordância, mas com o RAPD foi possível identificar mais linhagens do que com o REA, possivelmente porque o RAPD é capaz de detectar pequenas mutações, inserções ou deleções no DNA.

Bert *et al.* (1997), relataram que o polimorfismo obtido para estreptococos do grupo C de Lancefield foi semelhante utilizando-se 3 técnicas de tipagem molecular: RAPD, PFGE e MLEE (eletroforese de enzima multiloco). A escolha de um método de tipagem padrão deve levar em conta sua simplicidade de execução e sua capacidade de distinguir linhagens não-relacionadas. Ainda não existe um método de tipagem molecular padronizado para estreptococos do grupo C; para os estreptococos beta-hemolíticos do grupo A, o método que já foi utilizado é a

sorotipagem dos antígenos M e T (COLMAN *et al.*, 1993; SEPPALA *et al.*, 1994), mas esta é uma técnica que se limita a uns poucos centros de referência em todo o mundo e muitos isolados não podem ser tipados (BERT *et al.*, 1997).

O trabalho de Gruteke *et al.* (1996), utilizou métodos moleculares, genotipagem M, sorotipagem T, e RAPD para caracterizar um surto por estreptococos do grupo A em um centro de tratamento para queimados. O surto envolveu 13 pacientes e dois funcionários da equipe médica. Os resultados revelaram que o surto foi causado por dois tipos distintos de estreptococos do grupo A. O RAPD, assim como relatado em estudo anterior (SEPPALA *et al.*, 1994), permitiu a caracterização de subtipos de estreptococos do grupo A e mostrou ser uma ferramenta importante na elucidação de questões epidemiológicas.

Duarte *et al.* (2004), investigaram a diversidade genética de *Streptococcus agalactiae* isolados de mastites em rebanhos brasileiros, utilizando duas técnicas de tipagem molecular. O dendrograma gerado pelo RAPD e pelo PFGE foi comparado e observou-se que, apesar de poucas exceções, os isolados obtidos dentro de um mesmo rebanho apresentaram perfis de genotipagem idênticos ou altamente relacionados e formavam o mesmo grupo de similaridade. Ambas as técnicas demonstraram ter um bom poder discriminatório para os estreptococos do grupo B. A utilização do RAPD e do PFGE permite a detecção de importantes dados epidemiológicos, incluindo clones relacionados com a virulência da espécie.

Raymond *et al.* (2005), descreveram características epidemiológicas de um surto de sepse puerperal por *Streptococcus pyogenes* utilizando, entre outras técnicas, o RAPD e PFGE. Além das amostras de cinco pacientes, foram incluídos no estudo amostras de funcionários do hospital para a investigação da rota de transmissão da infecção. Através dos métodos de tipagem molecular, observou-se que os isolados de três pacientes estavam diretamente relacionados, indicando se tratar da linhagem responsável pelo surto. Além disso, foi observada uma transmissão indireta do microrganismo, já que um isolado foi encontrado em um funcionário que não esteve em contato direto com nenhum dos pacientes envolvidos. A linhagem responsável pelo surto pode persistir no meio ambiente por vários meses.

Pinho *et al.* (2006), utilizaram o PFGE para caracterizar isolados invasivos e não-invasivos de estreptococos dos grupos C e G de Lancefield e comparou-os com

a tipagem *emm*. Todos os 116 isolados envolvidos no estudo foram identificados como sendo *S. equisimilis*, apesar da diferença fenotípica observada, através do sequenciamento do gene rRNA 16S. A análise pelo PFGE revelou uma considerável variabilidade genética entre os isolados, indicando que existem vários tipos de clones de células causando a infecção no homem; e que M-tipos específicos estão associados com o aumento do poder invasivo da linhagem. Além disso, fatores do hospedeiro e da bactéria, contribuem com a frequência de doença invasiva.

Nandi *et al.* (2008), realizaram a análise genotípica de 60 isolados de estreptococos do grupo A de Lancefield no norte da Índia. Métodos de genotipagem foram utilizados como: análise por enzima de restrição (REA), ribotipagem, PCR-ribotipagem e RAPD. Com a utilização concomitante de cinco oligonucleotídeos iniciadores, o RAPD demonstrou ser a técnica mais discriminatória para a genotipagem do grupo A, exibindo natureza polimórfica dos isolados que apresentaram marcada heterogeneidade com cada um dos 5 oligonucleotídeos iniciadores. Essas conclusões indicam a utilidade desse marcador na detecção de um surto de infecção, assim como outros autores já relataram a capacidade do RAPD em reproduzir o poder discriminatório do PFGE em análises epidemiológicas de infecção por estreptococos do grupo A (GONZALEZ-REY *et al.*, 2003).

Há três décadas, Carl Woese e cols. começaram a sequenciar o DNA de várias bactérias, e através das análises das sequências 16S do rDNA realizaram estudos filogenéticos (FOX *et al.*, 1977; GUPTA *et al.*, 1983). Com o advento da PCR e do sequenciamento automatizado, a análise bacteriana da região 16S do rDNA já acumulou uma imensa quantidade de dados referentes à subunidade ribossomal de diversos organismos. A comparação dessas sequências demonstrou que as sequências dos genes do rDNA são altamente conservadas entre diferentes organismos do mesmo gênero e espécie, mas diferem entre organismos de espécies diferentes. O sequenciamento da região 16S do rDNA é atualmente uma técnica molecular importante, utilizada na identificação bacteriana, na classificação de novas espécies e na determinação do relacionamento filogenético entre indivíduos (WOO *et al.*, 2008).

Em seu estudo Mignard e Flandrois (2006), constataram que o sequenciamento de regiões intergênicas 16S-23S do rDNA fornecia uma melhor identificação de cocos gram-positivos, já que 90,3% dos 83 isolados foram identificados até o nível de espécie. O objetivo do estudo foi avaliar a utilização do

sequenciamento de regiões intergênicas 16S-23S para a identificação bacteriana de microrganismos difíceis de identificar fenotipicamente na prática clínica.

Em 1989, Efstratiou *et al.*, utilizou métodos microbiológicos convencionais como a resistência a fagocitose e métodos imunológicos como precipitação para identificar a proteína M em isolados de *S. equisimilis* obtidos em três surtos, sendo que em um deles o microrganismo foi isolado em pacientes, funcionários do hospital e no meio ambiente.

Collins (1992), descreveu o primeiro gene *emm* (*emmG1*) a ser amplificado e seqüenciado de um isolado de estreptococos do grupo G do homem; Horii (2006), caracterizou um isolado clínico de estreptococo do grupo G (*S. equisimilis*) que causou peritonite e salpingite com progressão para síndrome do choque tóxico estreptocócico, o tipo-M do isolado foi descrito como *stc36*, que já havia sido identificado em um isolado causando síndrome do choque tóxico estreptocócico em um paciente no Japão (HASHIKAWA *et al.*, 2004). Hashikawa *et al.* propôs em 2004, que superantígenos podem ser responsáveis pelo desencadeamento da síndrome do choque tóxico estreptocócico pelos grupos C e G.

Em 1996, Bisno relatou pela primeira vez a proteína M em *S. equisimilis* isolados de casos de faringite. Os isolados resistiam a fagocitose e possuíam genes codificantes para a porção carboxi-terminal da molécula de proteína M, porção que é fixa na membrana celular e atravessa a parede celular, que é altamente conservada entre os estreptococos A e G. A porção N-terminal, a qual está em contato com o ambiente externo, é altamente variável de linhagem para linhagem e determina o tipo-M. Atualmente existem mais de 150 sorotipos de proteína M conhecidos para os estreptococos do grupo A e os anticorpos formados contra eles acredita-se que sejam responsáveis pela imunidade adquirida pelo homem.

Em seu estudo Bisno (1996), descreveu que as seqüências do gene *emm* de isolados de orofaringe de estreptococos do grupo C foram altamente semelhantes à aqueles encontrados nos estreptococos do grupo G. Segundo Schnitzler *et al.* (1995), os genes tipo-M dos grupos C e G compartilham características estruturais como importantes polimorfismos na porção final.

Os diferentes sorotipos de estreptococos do grupo A estão associadas a duas classes de proteína M principais, classes I e II, que possuem dois domínios diferentes de prolina-glicina-treonina-serina, a expressão de uma das classes está associada com propriedades patogênicas dos estreptococos do grupo A (BESSEN

JONES e FISCHETTI, 1989; SCHNITZLER *et al.*, 1995). Tem sido demonstrado que isolados do homem de estreptococos dos grupos C e G podem expressar proteínas M com alta homologia de seqüência na região conservada (C-terminal) com a proteína M, classe I, de estreptococos do grupo A (SCHNITZLER *et al.*, 1995).

Os estreptococos dos grupos C e G possuem apenas a proteína M de classe I, com uma região conservada bastante similar a proteína M de linhagens reumatogênicas conhecidas de estreptococos do grupo A (BISNO, 1996). O uso de técnicas moleculares permite a diferenciação da proteína M em classes, sendo que a classe I contém sorotipos associados com febre reumática aguda (MCDONALD *et al.*, 2007).

Em seu estudo, Schnitzler *et al.* (1995), observou que todos os isolados humanos de estreptococos do grupo G geraram seqüências tipo-M fortemente associadas com o gene *emm* de classe I dos estreptococos do grupo A. O polimorfismo observado nos genes tipo-M contribui para estudos epidemiológicos desses patógenos.

Alberti *et al.* (2005), observou que 76% dos seus isolados de estreptococos do grupo C possuíam sequências para os genes *emm* amplificáveis por PCR, sendo todos *S. equisimilis*, os isolados não-tipificáveis eram de outra espécie, *S. anginosus*. Seus resultados sugerem que existe uma transferência horizontal de genes *emm* entre estreptococos beta-hemolíticos, devido a existência de cinco tipos-*emm* prevalentes na Espanha.

Siljander *et al.*, (2009), descreveu na Finlândia um rápido aumento na incidência de doença invasiva causada por *S. pyogenes* do tipo *emm84*, entre os anos de 2005 e 2007, indicando uma mudança na prevalência do genótipo do isolado que estava circulando na população, este estudo enfatiza a importância de um sistema de vigilância de tipagem M em todo o mundo.

De acordo com Metzgar *et al.*, (2009), existe uma forte correlação entre a genotipagem do gene *emm* e a virulência da linhagem, já que determinados tipos-M de estreptococos do grupo A (M3, M118, M5) apresentaram maior prevalência nos sete surtos estudados.

As infecções hospitalares são tema de grande preocupação em todo o mundo, com altas taxas de morbi-mortalidade. Pacientes hospitalizados estão normalmente sob risco de infecção. A prevenção de infecções nosocomiais, baseada no sistema

de vigilância como controle de infecção, é o único caminho para reduzir a morbidade e a mortalidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de coleta e isolados utilizados

Para este estudo foram utilizados 92 isolados de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (*S. equisimilis*) obtidos de amostras de lesões ulceradas de pacientes internados no Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná (HDSPR), entre o período de janeiro de 2002, até julho de 2007. Foram incluídos também isolados de secreção de orofaringe de funcionários do hospital e do ambiente hospitalar; e isolados de fezes de animais do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI).

O hospital está localizado em Piraquara, região metropolitana de Curitiba-PR, tem 84 leitos, dividido em ala masculina e feminina. É uma referência para o tratamento da hanseníase no estado do Paraná, recebendo pacientes de todo o estado. Nas proximidades do hospital, no mesmo terreno, está localizado o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI).

O presente trabalho está de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos (HPP/CEP – 0285/06).

4.2 Meios de cultura, reagentes e soluções

4.2.1 Solução Salina

NaCl	8,5 g
Água destilada	1000ML

4.2.2 Meio de Stuart (Newprov)

Tioglicolato de Sódio	1,0 g
Glicerofosfato de Sódio	10,0 g
Cloreto de Cálcio	0,1 g
Azul de Metileno	0,002 g
Agar	3,0 g
pH final: 7,4	
Dissolver em 1000 mL de água destilada.	

4.2.3 Ágar Sangue (Merck)

Ágar de infusão de cérebro e coração	52g
Água Destilada	1000mL

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 1N.

Após o resfriamento do meio a 50°C, acrescentou-se sangue desfibrinado de carneiro para uma concentração final de 5%.

4.2.4 Meio Todd – Hewit (Merck)

Infusão de coração	500g
Neopeptona (difco)	20g
Bacto-dextrose	2g
Cloreto de sódio	2g
Fosfato dissódio	0,4g
Carbono de sódio	2,5g
Dissolver 30g em 1000 mL de água destilada.	

4.2.5 Clorofórmio-álcool isoamílico (CIA)

Clorofórmio	98ml
Álcool isoamílico	2ml

4.2.6 DNA Polimerase (Invitrogen)

A Taq DNA polimerase foi utilizada nas reações de amplificação na concentração de 5 U/ μ L.

4.2.7 dNTP (Invitrogen)

Os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) estoques (100 mM), foram diluídos em água ultrapura permanecendo na concentração de 2,5mM (solução de uso). Nas reações de amplificação, a concentração final utilizada foi de 0,2 mM de cada dNTP.

4.2.8 Gel de Agarose (0,8%)

Agarose	0,8 g
Tampão TEB 1X	100mL

4.2.9 Gel de Agarose (1,4%)

Agarose	1,4 g
Tampão TEB 1X	100mL

4.2.10 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores foram diluídos em água ultrapura autoclavada (solução 4 mM), usando o peso molecular do primer individual dado pelo fornecedor. Os oligonucleotídeos diluídos foram mantidos a -20°C.

4.2.11 Tampão CTAB

Tris-base	2,42 g
Cloreto de sódio	8,2g
Na-EDTA	0,74g
CTAB	2,0g
Água ultrapura	80mL

pH 7,5

A solução foi aquecida para que o Na-EDTA e o CTAB fossem dissolvidos e o volume completado para 100mL com água Ultrapura autoclavada.

4.2.12 Tampão de Corrida para Gel de Agarose (TBE 10X – pH 8,0)

Tris-base	54g
Ácido bórico	27,5g
EDTA 0,5M	20mL
Água ultrapura	p/500mL

4.2.13 Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris-HCL (pH: 8,0)	20mM
EDTA	20mM

4.2.14 Solução de Brometo de Etídio

Foram dissolvidos 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água destilada, agitando-se por várias horas (SAMBROOK *et al.*, 1989). A solução foi armazenada à temperatura ambiente. Para a revelação do gel, foram diluídos 3 µL de brometo em 1000mL de água destilada.

4.3 Isolamento

Para o isolamento de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (*S. equisimilis*) foram utilizadas amostras de lesões ulceradas de 52 pacientes internados no HDSPP, sendo que alguns pacientes permanecem internados no hospital por vários anos e se infectam mais de uma vez (Tabela 2). Foram utilizados 63 isolados obtidos de pacientes do sexo masculino e 20 isolados obtidos de pacientes do sexo feminino. Os pacientes incluídos no estudo estavam

hospitalizados no momento de análise, mas eram livres para transitar pela parte interna e externa do hospital.

Também foram analisadas amostras de fezes de cavalos do CPPI. Um número de 10 amostras de fezes de cavalo foram coletadas pelo veterinário do CPPI (coleta intrarectal), de modo a evitar contaminação cruzada. Uma alíquota das fezes foi retirada e transportada em meio de Stuart para o processamento no Laboratório Central do estado do PR (LACEN-PR). O Centro situa-se nos arredores do hospital, num mesmo terreno, e os animais são livres para transitar pelo terreno.

A coleta de ambiente foi realizada em 30 diferentes locais do hospital, utilizando *swab* esterilizado embebido em solução salina o qual era friccionado no local de coleta.

Amostras de secreção de orofaringe com *swab* estéril foram coletadas de 150 funcionários do hospital, (médicos, enfermeiros e auxiliares), além disso 100 amostras obtidas a partir das mãos dos funcionários do hospital foram coletadas, com o auxílio de um *swab* esterilizado embebido de solução salina, o qual era friccionado nas superfícies das duas mãos de cada indivíduo analisado.

As amostras foram transportadas em meio de Stuart para posterior isolamento e identificação fenotípica, realizado no Laboratório Central do estado do PR (LACEN-PR).

Um número de 8 isolados de *Streptococcus* (grupos A, B, C de Lancefield) não relacionados com o hospital foram incluídos no estudo, os quais foram utilizados como grupo externo na análise por marcador RAPD. Estes isolados são de diversos surtos, e estão armazenados em freezer -70°C no Laboratório Central do estado do PR (LACEN-PR).

4.4 Identificação fenotípica

A identificação presuntiva dos isolados de *S. equisimilis* foi baseada nas características fenotípicas evidenciadas a partir do crescimento em ágar sangue. Os meios de cultura foram incubados à 35°C por 18-24h em aerobiose. As colônias beta-hemolíticas, catalase-negativas representadas por cocos Gram positivos arranjados em cadeia que apresentaram aglutinação frente ao anti-soro do grupo C de Lancefield (Streptococcal Grouping Kit, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), foram caracterizadas até espécie por meio de provas bioquímicas: desaminação da arginina, hidrólise da esculina, produção de ácido a partir do sorbitol, trealose, lactose e ribose e teste de Voges-Proskauer (FACKLAM, 2002). Após a identificação fenotípica, as amostras foram armazenadas em freezer (-70°C) em tubos tipo eppendorf, acrescentados de sangue de carneiro desfibrinado.

4.5 Extração do DNA total

A extração de DNA dos isolados foi realizada de acordo com Moreira (2006). Após incubação das amostras em meio de cultura líquido THB (Todd Hewitt Broth) por 24h a 36°C, as culturas foram centrifugadas a 49000 x g por 2 min e o sedimento foi transferido a um tubo contendo uma mistura de sílica em pó e celite 2:1 em 600µL do detergente tamponado CTAB.

Em seguida foram aplicados 3 pulsos (30 seg) de ultrassom (desruptor de célula ultrassônico – marca Unique) na potência 70, sob banho de gelo, e com intervalos de 30 seg entre cada pulso. Após esta etapa, foram adicionados mais 400µL de CTAB e as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 10 min. Depois que as amostras atingiram temperatura ambiente, foram adicionados 1000µL de clorofórmio e os tubos foram centrifugados a 49000 x g por 7 min. O sobrenadante foi transferido a outro tubo, ao qual foram adicionados 1000µL de clorofórmio e foi centrifugado novamente. Depois de transferir o sobrenadante para outro tubo foram adicionados cerca de 1000µL de álcool 96% gelado e os tubos foram incubados “overnight” a -4°C para precipitação dos ácidos nucléicos. Após esse período, foram centrifugados a 49000 x g por 7 min e o sobrenadante foi

desprezado. O precipitado foi lavado com álcool 70% gelado e foi centrifugado a 49000 x g por 7 min. O álcool foi retirado e os tubos foram vertidos em fluxo laminar até a secagem completa do precipitado. Após esse período o DNA foi ressuspenso com 100µL de água ultrapura. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 24h e então foram armazenados a -4°C.

A quantificação do DNA, e sua integridade foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 0,8%, e visualizada com brometo de etídio em luz UV.

4.6 RAPD

As reações de RAPD seguiram metodologia descrita por Pereira *et al.* (2002), com modificações. Cada reação consistiu de 7,4 µL de água ultrapura, 1,5 µL de tampão de Taq, 0,9 µL de cloreto de magnésio, 1,5 µL de dNTP, 1,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,3 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1,9 µL de DNA. O volume final de cada reação foi de 15 µL. As reações foram realizadas em termociclador da marca Eppendorf, segundo SPOLIDORIO *et al.*, 2003 com modificações: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 40 ciclos de 30s a 94°C, anelamento a 36°C por 30s e extensão a 72°C por 1 min, com uma única extensão final a 72°C por 3 min.

Foram utilizados os oligonucleotídeos OPA 1, OPA 2, OPA 9, OPA 10 e OPA 13 (Invitrogen) (Tabela 1).

Após a amplificação, os produtos de PCR foram separados por eletroforese por três horas em gel de agarose a 1,4% (110V). O marcador molecular utilizado foi DNA *ladder* de 1 kb. O gel foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV.

TABELA 1 – SEQÜÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS EM CADA REAÇÃO DE RAPD.

Primer	Seqüência
OPA - 1	5' CAGGCCCTTC3'
OPA - 2	5' TGCCGAGCTG 3'
OPA - 9	5' GGGTAACGCC3'
OPA - 10	5' GTGATCGCAG 3'
OPA - 13	5' CAGCACCCAC 3'

FONTE: O autor (2009).

4.6.1 Análise do polimorfismo obtido por marcadores RAPD

Para a análise da variabilidade genética foi utilizado o software NTSYSpc 2.1 (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*) (ROHLF, 1988). Foi construída uma matriz binária, atribuindo-se valor 1 para presença e 0 para ausência de bandas. Com base na matriz binária foi construída uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard (J), que permite calcular similaridades a partir de variáveis binárias. O método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) foi utilizado para agrupar as unidades e construir os dendrogramas. A análise *bootstrap* foi feita utilizando-se o *software* Winboot, a fim de verificar a confiabilidade dos agrupamentos dos dendrogramas gerados (COELHO, 2005).

Foram considerados consistentes os agrupamentos com valor de *bootstrap* acima de 70%.

A análise dos resultados obtidos por marcador RAPD, pode indicar uma separação dos isolados em sub-grupos bem delimitados. Isolados pertencentes a sub-grupos podem ser usados para outras análises moleculares, como o sequenciamento parcial do gene *emm*.

4.7 Reações de sequenciamento do gene *emm*

4.7.1 Extração do DNA total

Para esta etapa foi necessário refazer as extrações de DNA dos isolados, pois todo o procedimento de sequenciamento parcial do gene *emm* foi realizado de acordo com protocolo do CDC “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC, 2009). Após incubação das amostras em meio sólido ágar sangue por 24h a 36°C,

foi retirada uma quantidade grande de colônias e colocadas em 300µL de solução salina a 0,85%. Em seguida as culturas foram aquecidas por 15min a 70°C.

As amostras foram colocadas em spin por 2min e foi retirado o sobrenadante. O sedimento (*pellet*) formado foi ressuspensionado em 50µL de TE, foram adicionadas as enzimas de extração: 10µL de mutanolisina e 2µL de hialuronidase. Os tubos foram colocados a 37°C por 30min.

Após esse tempo, as amostras foram aquecidas a 100°C por 10min.

4.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Cada reação de PCR constitui de 10µL de tampão 10X contendo 15mM de MgCl₂ (*Applied Biosystems* B07332), 2µL de dNTP (10mM), 2µL de cada oligonucleotídeo iniciador preconizado pelo CDC (CDC, 2009), (*emm1*: 5'-TATTCGCTTAGAAAATTAA- 3' *emm2*: 3'-GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT- 5'), 0,5µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 82µL de água ultrapura. O volume final de cada reação foi de 20µL.

As reações foram realizadas em termociclador da marca Eppendorf: desnaturação inicial a 94°C por 1min; 10 ciclos de 15s a 94°C, anelamento a 46,5°C por 30s e extensão a 72°C por 1 min e 15s, 20 ciclos de 15s a 94°C, anelamento a 46,5°C por 30s e extensão a 72°C por 1 min e 15s com 10s extras para cada 19 ciclos seguidos.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram observados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (110V). O marcador molecular utilizado foi DNA *ladder* de 100 pb. O gel foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV.

4.7.3 Reação de Sequenciamento

Após a purificação como descrito pelo fabricante (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel), o “mix” de reação foi preparado utilizando o produto da reação de PCR, *BygDye Terminator*, o oligonucleotídeo iniciador para sequenciamento seq 2 (5'- TATTCGCTTAGAAAATTAAAAACAGG- 3'), tampão e água ultrapura autoclavada, como descrito pelo fabricante (*Applied Biosystems*). Para o sequenciamento foram utilizados os seguintes ciclos: 25 ciclos de 10s a 96°C, 5s a 55°C, 4min a 60°C e estocar a 4°C.

As sequências foram analisadas e enviadas ao CDC BLAST-*emm* (CDC, 2009) para a obtenção do tipo-M da linhagem.

4.7.4. Análises das Sequências

As sequências foram analisadas e corrigidas com o programa STADEN Package (STADEN; JUDGE; BONFIELD, 2001) e alinhadas com o programa MEGA 3 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004).

4.7.5. Análises Filogenéticas

Para as inferências filogenéticas foi utilizado o programa MEGA 3 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004).

5. RESULTADOS

Um total de 92 isolados de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (*S. equisimilis*), do grupo C de Lancefield, foram obtidos a partir de diferentes amostras. A maioria dos isolados (83) são procedentes de lesões ulceradas de pacientes internados no hospital, entre o período de janeiro de 2002, até julho de 2007. As lesões ocorrem principalmente nos membros inferiores como consequência da hanseníase, que diminui a sensibilidade nesses pacientes.

Um número de 10 amostras de fezes de cavalo do CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológico) foram coletadas, destas 10 amostras, foram obtidos quatro isolados de *S. equisimilis*.

A coleta de ambiente foi realizada em 30 diferentes locais do Hospital de Dermatologia Sanitária (HDSPR), das 30 amostras foram obtidos três isolados de *S. equisimilis*.

Amostras de secreção de orofaringe foram coletadas de 150 funcionários do hospital, (médicos, enfermeiros e auxiliares), e 100 amostras obtidas a partir das mãos dos funcionários do hospital foram coletadas. Dentre as amostras de orofaringe, foram obtidos dois isolados de *S. equisimilis*, e dentre as amostras das mãos, não foi obtido nenhum isolado de *S. equisimilis*.

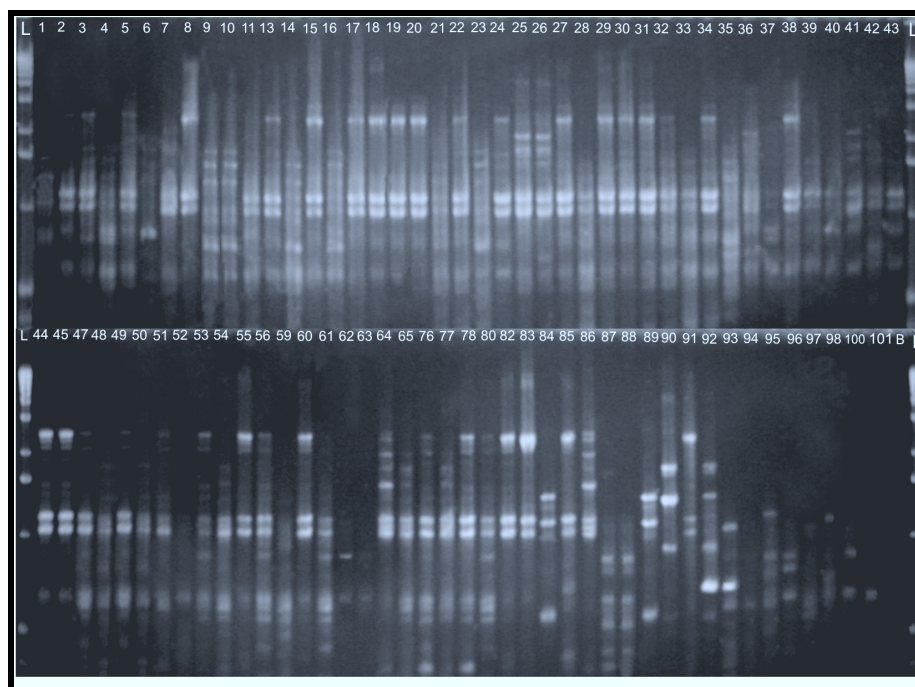
Dos 92 isolados foi possível a obtenção de DNA de 76 isolados através do método descrito por Moreira (2006), os quais foram utilizados para os estudos genéticos.

A partir da análise por meio de marcadores RAPD foi observada a existência de polimorfismo entre os isolados de *S. equisimilis*, na qual foi utilizado cinco oligonucleotídeos iniciadores, descritos na Tabela 1, os quais geraram 67 marcadores. O perfil de amplificação com o oligonucleotídeo iniciador OPA 13 pode ser visualizado na Figura 1.

Após a análise do dendrograma gerado (Figura 2), os isolados incluídos no estudo foram divididos em quatro grupos principais. Os grupos II e III foram formados exclusivamente por isolados de pacientes, e dentro deles houve a formação de subgrupos com altos índices de similaridade genética entre si.

Os isolados de orofaringe de funcionários do hospital, fezes de cavalo e

amostras de ambiente agruparam-se no grupo IV, juntamente com amostras de pacientes. As amostras 87 e 91 foram isoladas de orofaringe de funcionários do hospital, e sugerem ter similaridade genética com amostras isoladas de pacientes e ainda com isolados do ambiente (85, 86 e 88). As amostras 84, 89, 90 e 92 isoladas de fezes de cavalo, encontram-se no mesmo grupo (IV).



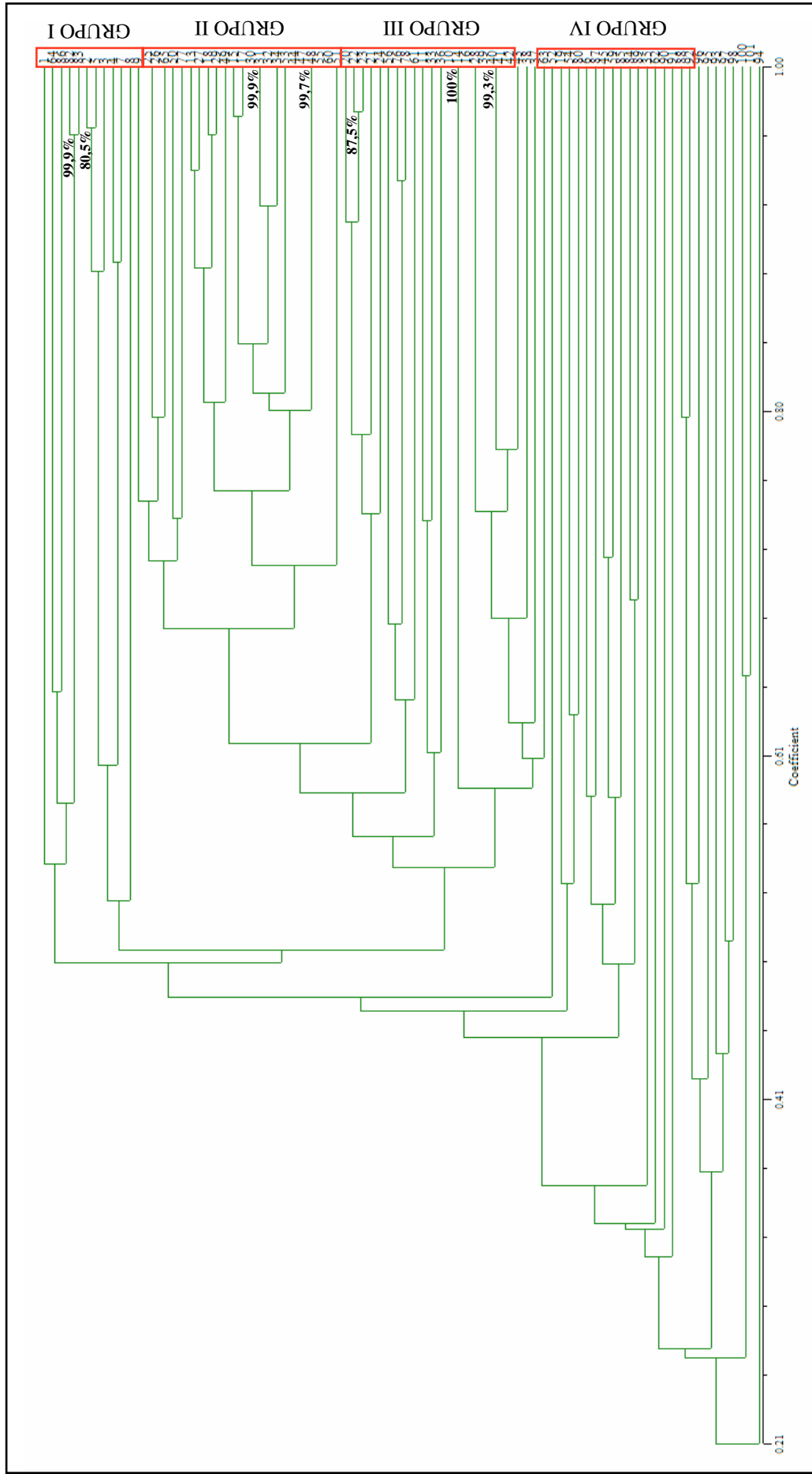
Eletroforese em gel de agarose 1,4 % das linhagens estudadas; L: Ladder (marcador molecular de 1 kb); B: Branco (controle negativo da reação). Amostras 1 a 7: isolados de amostras de pacientes de 2002; amostras 8 a 11: isolados de amostras de pacientes de 2003; amostras 13 a 40: isolados de amostras de pacientes de 2004; amostras 41 a 56: isolados de amostras de pacientes de 2005; amostras 59 a 65: isolados de amostras de pacientes de 2006; amostras 76 a 83: isolados de amostras de pacientes de 2007; amostras 84, 89, 90 e 92: fezes de cavalos; amostras 85, 86, 88: ambiente; amostras 87 e 91: orofaringe de funcionários; amostras 93 a 101: grupo externo.

FIGURA 1 – PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *S. equisimilis* UTILIZANDO O OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR OPA 13

FONTE: O autor (2009)

Não houve a formação de grupos bem definidos pelo RAPD, com suporte de *bootstrap*, entretanto verificou-se a partir destes marcadores a existência de polimorfismo entre os isolados analisados.

Os isolados foram então caracterizados por meio de sequenciamento. Dos 92 isolados, 87 foram sequenciados, a partir do sequenciamento parcial do gene *emm*.



Dendrograma gerado a partir de similaridade genética obtida por marcadores RAPD das linhagens de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, utilizando-se o coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA. Os valores de bootstrap (%) estão representados na figura. As linhagens 84, 89, 90 e 92 (Grupo IV) são isoladas de cavalo; as linhagens 85 (GrupolV), 86 (Grupo I), 88 (Grupo IV), 88 (Grupo I), 88 (Grupo IV) são do ambiente; as linhagens 87 e 91 (Grupo IV) são de orofaringe de funcionários.

FIGURA 2 – DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS GRUPOS DE *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

As sequências nucleotídicas obtidas para os 87 isolados resultaram em nove diferentes haplotipos que foram denominados com letras maiúsculas de A a I (tabela 2). Estes haplotipos tiveram uma variação nucleotídica entre 563 a 690 pares de base (pb). Devido à diferença entre os tamanhos dos haplotipos, no alinhamento de todos os isolados foi obtido um comprimento total de 707 pb.

A árvore filogenética (Figura 3) dos diferentes haplotipos nucleotídicos do *S. equisimilis* demonstrou uma evidente separação do haplotipo G o qual foi isolado a partir da amostra de secreção de lesão de um paciente do sexo feminino. O haplotipo F e I foram reunidos em um único grupo, sendo que o F era procedente de fezes de cavalo e o I proveniente de pacientes (seis isolados de lesão de paciente do sexo feminino e três do sexo masculino) e um de fonte ambiental (de um banco da sala de curativos da ala feminina do hospital). O grupo acima contém duas subdivisões nas quais os haplotipos A, B e C aparecem separados do H, D e E.

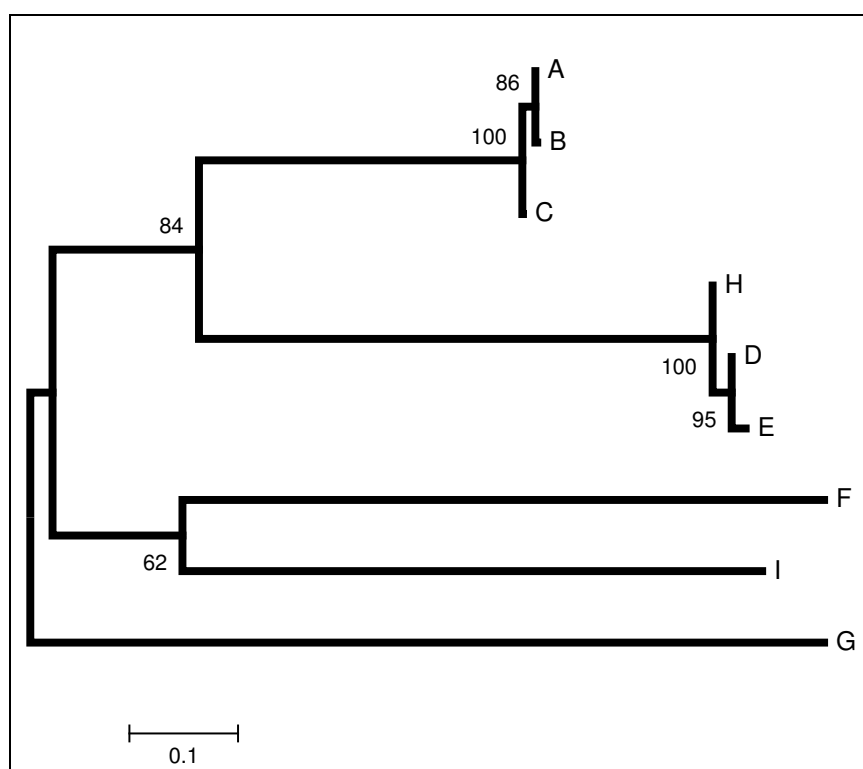


FIGURA 3 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS HAPLOTIPOS NUCLEOTÍDICOS DO GENE PARCIAL *emm* DE ISOLADOS DE *S. EQUISIMILIS*. MÉTODO DE NEIGHBOR-JOINING COM DELEÇÃO PAR-A-PAR, UTILIZANDO O MODELO DE DIFERENÇAS NUCLEOTÍDICAS. BOOTSTRAP : 1000.

Os isolados depois de editados e analisados foram submetidos ao CDC BLAST-*emm* (CDC, 2009) conferindo aos nove diferentes haplotipos, seis tipos-M. De acordo com os resultados os três tipos-M (stG6792, stC1400 e stG211) foram

prevalentes. Os isolados 85 e 88 procedentes de ambiente hospitalar são do tipo-M stG6792, enquanto que o isolado 86, também procedente do ambiente é do tipo-M stG211. Os isolados 87 e 91 obtidos de orofaringe de funcionários do hospital são do tipo-M stG6792, o mesmo tipo-M encontrado para os isolados 85 e 88 procedentes do ambiente hospitalar.

O isolado 84 obtido de fezes de cavalo em 2004 é do tipo-M stC839, não coincidindo com nenhum dos outros tipos-M encontrados nos outros isolados investigados. No entanto o isolado 90 procedente de fezes de cavalo coletada no ano de 2005 é do tipo-M stG6792, o tipo-M mais prevalente entre as secreções de pacientes, e também, do mesmo tipo-M de alguns isolados encontrados em determinados locais do hospital e daqueles obtidos a partir da secreção orofaríngea de funcionários.

TABELA 2 – RESULTADOS OBTIDOS PELO RAPD E SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO PARCIAL DO GENE *emm* PARA OS ISOLADOS DE *S. equisimilis* DE PACIENTES **continua**

PACIENTES	SEXO	DATA	RAPD	TIPO-M	HAPLOTIPO	COMPRIMENTO SEQUENCIAS NUCLEOTÍDICAS (pb)
1 ^a	M	16/4/2002	I	stC1400	A	573
2 ^h	M	29/5/2002	I	stG6792	E	658
3 ^h	M	29/5/2002	I	stG6792	E	658
4	M	15/8/2002	I	stC1400	B	573
5	M	3/12/2002	I	stG6792	E	658
6	M	9/12/2002	IV	stC1400	B	573
7 ^f	M	16/12/2002	I	stG211	I	563
8	M	9/6/2003	I	stG6792	E	658
9 ^j	F	18/8/2003	I	stG211	I	563
10k	M	20/8/2003	III	stG6792	D	690
11 ^a	M	25/11/2003	III	stG6792	E	658
12 ^f	M	12/2/2004	*	**	**	
13	F	18/3/2004	II	stG6792	E	658
14 ^p	M	18/3/2004	III	stG6792	E	658
15	M	25/3/2004	II	stG6792	E	658
16	M	31/3/2004	III	stG6792	E	658
17	F	7/4/2004	II	stG6792	E	658
18k	M	16/4/2004	II	**	**	
19	F	28/4/2004	IV	stG6792	E	658
20 ^o	F	28/4/2004	III	stG6792	E	658
21 ^k	M	18/5/2004	III	stG6792	E	658
22 ^p	M	28/6/2004	III	stG6792	E	658
23	F	8/7/2004	*	stG6792	E	658
24	F	4/8/2004	III	stG211	E	658
25 ⁿ	F	4/8/2004	II	stG6792	I	563
26 ^g	M	11/8/2004	II	stC1400	C	591

TABELA 2 – RESULTADOS OBTIDOS PELO RAPD E SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO PARCIAL DO GENE *emm* PARA OS ISOLADOS DE *S. equisimilis* DE PACIENTES **continuação**

PACIENTES	SEXO	DATA	RAPD	TIPO-M	HAPLOTIPO	COMPRIMENTO SEQUENCIAS NUCLEOTÍDICAS (pb)
27 ^e	M	12/8/2004	II	stG6792	E	658
28 ^c	M	31/8/2004	III	stG6792	E	658
29	M	15/9/2004	II	stG6792	E	658
30	F	21/9/2004	II	stG6792	E	658
31 ^e	M	29/9/2004	II	stG6792	E	658
32 ^d	M	5/10/2004	II	stG6792	E	658
33 ^m	M	7/10/2004	III	stG6792	E	658
34	M	22/10/2004	II	stG6792	E	658
35 ^l	M	22/10/2004	IV	st3343	H	578
36	M	5/11/2004	III	stC1400	C	591
37 ^m	M	8/12/2004	*	stG6792	E	658
38 ^g	M	15/12/2004	*	stG6792	E	658
39 ^c	M	16/12/2004	III	stG6792	E	658
40	M	20/12/2004	III	stG6792	E	658
41	M	16/2/2005	III	stG211	I	563
42 ^j	F	23/2/2005	III	stG211	I	563
43	M	14/4/2005	*	stG6792	E	658
44 ^c	M	6/5/2005	II	stG6792	E	658
45 ^m	M	10/5/2005	IV	stC1400	C	591
46 ^g	M	18/5/2005	*	stG6792	E	658
47 ^b	M	31/5/2005	II	stG6792	E	658
48 ^o	F	1/6/2005	II	stG211	I	563
49 ^m	M	28/7/2005	II	stC1400	C	591
50	M	1/8/2005	II	stC1400	C	591
51	F	8/8/2005	II	stG6	G	617
52 ⁿ	F	16/8/2005	IV	stG6792	E	658
53 ^c	M	15/9/2005	II	stG6792	E	658
54 ^j	F	25/11/2005	IV	stG211	I	563
55	F	28/11/2005	II	stG6792	E	658
56	M	1/12/2005	III	stG6792	E	658
57 ^j	F	7/12/2005	*	stG211	I	563
58	M	15/12/2005	*	stC1400	C	591
59 ^m	M	13/2/2006	IV	stC1400	C	591
60 ⁱ	M	2006	II	stG6792	E	658
61 ^b	M	2006	III	stG6792	E	658
62	F	2006	IV	stG211	I	563
63	M	7/3/2006	IV	stG6792	E	658
64 ^d	M	6/4/2006	I	stC1400	C	591
65 ^k	M	6/4/2006	II	**	**	
66	M	27/4/2006	*	stC1400	C	591
67	M	9/5/2006	*	stC1400	C	591
68	M	17/5/2006	*	stC1400	C	591
69 ⁱ	M	31/7/2006	*	stC1400	C	591
70 ^k	M	31/7/2006	*	stC1400	C	591
71	F	2/8/2006	*	stG6792	E	658
72 ^d	M	21/8/2006	*	stC1400	C	591
73	M	21/8/2006	*	stC1400	C	591
74	F	8/2/2007	*	stG6792	E	658

TABELA 2 – RESULTADOS OBTIDOS PELO RAPD E SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO PARCIAL DO GENE *emm* PARA OS ISOLADOS DE *S. equisimilis* DE PACIENTES **conclusão**

PACIENTES	SEXO	DATA	RAPD	TIPO-M	HAPLOTIPO	COMPRIMENTO SEQUENCIAS NUCLEOTÍDICAS (pb)
75	M	2/3/2007	*	stC1400	C	591
76	M	21/3/2007	*	stC1400	C	591
77 ^c	M	12/4/2007	II	stC1400	C	591
78	F	7/5/2007	III	stG6792	E	658
79	M	16/5/2007	*	stG6792	E	658
80 ^b	M	30/5/2007	IV	stG6792	E	658
81 ^k	M	4/7/2007	*	stG6792	E	658
82	M	2/8/2007	I	stG6792	E	658
83 ^l	M	6/8/2007	I	stG6792	E	658

FONTE: O autor (2009)

NOTA: * ISOLADO SEM AMPLIFICAÇÃO NO RAPD. ** ISOLADOS QUE NÃO RESULTARAM SEQUENCIAS PASSÍVEIS DE SEREM ANALISADAS.

LETRAS IGUAIS NA PRIMEIRA COLUNA REPRESENTAM O MESMO PACIENTE.

TABELA 3 – RESULTADOS OBTIDOS PARA OS ISOLADOS DE ANIMAIS, FUNCIONÁRIOS E AMBIENTE

ISOLADO	FONTE	ANO	RAPD	TIPO-M	HAPLOTIPO	COMPRIMENTO SEQUENCIAS NUCLEOTÍDICAS (pb)
84	FEZES CAVALO CPPI	2004	IV	StC839	F	621
85	TORNEIRA BANHEIRO	2005	IV	stG6792	E	658
86	BANQUINHO SALA CURATIVO	2005	*	stG211	I	563
87	Orofaringe Funcionário Enf.	2005	IV	stG6792	E	658
88	CADEIRA AMBIENTE DE CIRCULAÇÃO	2005	IV	stG6792	E	658
89	FEZES CAVALO CPPI	2005	IV	**	**	
90	FEZES CAVALO CPPI	2005	IV	stG6792	E	658
91	Orofaringe Funcionário Enf.	2005	IV	stG6792	E	658
92	FEZES CAVALO CPPI	2005	IV	**	**	

FONTE: O autor (2009)

NOTA: * ISOLADO SEM AMPLIFICAÇÃO NO RAPD. ** ISOLADOS QUE NÃO RESULTARAM SEQUENCIAS PASSÍVEIS DE SEREM ANALISADAS.

6. DISCUSSÃO

Um total de 92 isolados de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (*S. equisimilis*) foram obtidos a partir de diferentes amostras (secreção de lesão ulcerada de pacientes do hospital, ambiente, orofaringe de funcionários do hospital e animais do CPPI). A maioria dos isolados (83) eram procedentes de lesões ulceradas de pacientes internados no Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná, entre o período de janeiro de 2002, até julho de 2007. Os pacientes incluídos no estudo estavam hospitalizados no momento de análise, mas eram livres para transitar pela parte interna e externa do hospital, e é importante ressaltar que as lesões ocorriam principalmente nos membros inferiores provavelmente como consequência da hanseníase a qual diminui a sensibilidade nesses pacientes.

Na literatura, não é conhecido o isolamento de número tão significativo de *S. equisimilis* de um mesmo ambiente. Teare *et al.* (1989), relatou um surto de febre puerperal por *S. equisimilis* e envolveu em seu estudo 33 isolados de 3 hospitais diferentes; Bisno (1996), utilizando técnicas genéticas e microbiológicas demonstrou a presença de proteína M em 20 isolados de *S. equisimilis* obtidos de secreção de orofaringe em um centro de saúde na Carolina do Sul; Pinho *et al.* (2006), utilizou 26 isolados de *S. equisimilis* para caracterização molecular de isolados invasivos e não-invasivos, em Portugal de 1998 a 2004; McDonald *et al.* (2007), utilizou 80 isolados de estreptococos do grupo C obtidos de isolados de infecções de pele, faringite e secreção de orofaringe de três comunidades Australianas diferentes; Tanaka *et al.* (2008), caracterizou geneticamente 13 isolados de *S. equisimilis* do grupo A de Lancefield no Japão de 2000 a 2004.

A partir da análise dos diferentes locais (30) do hospital foram obtidos três isolados de *S. equisimilis* sendo um isolado obtido da torneira do banheiro, um isolado a partir de um banco da sala de curativo e um isolado obtido de uma cadeira de um corredor o que pode sugerir a ocorrência ambiental destes agentes e ainda demonstrar a existência de infecção a partir destas fontes.

Existem poucos relatos sobre isolamento de estreptococos em superfície, sabe-se que estreptococos patogênicos não sobrevivem durante muito tempo em superfícies (BARNUM *et al.*, 1989). Teare *et al.* (1989), relataram um caso de surto

hospitalar por estreptococos do grupo C de Lancefield, no qual fômites desempenharam um papel fundamental na transmissão do microrganismo, além da transmissão paciente-paciente.

Das 10 amostras de fezes de cavalo analisadas foram obtidos quatro isolados de *S. equisimilis*. O CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos) situa-se nos arredores do hospital, num mesmo terreno, e os animais são livres para transitar por toda a área. As fezes de animais podem ser consideradas fontes de disseminação da infecção para o homem, pois permanecem no solo expostas ao ar livre, sendo veiculadas através da poeira e/ou aerossóis (TORRES *et al.*, 2007).

O isolamento realizado a partir das amostras coletadas de secreção de orofaringe (150) e mãos dos funcionários do hospital (100) resultou em dois isolados de *S. equisimilis* procedentes de secreção orofaríngea. Isso é esperado pois de acordo com Stamm e Cobbs (1980), aproximadamente 3% da população saudável pode ser colonizada por estreptococos do grupo C. Este agente faz parte da flora da orofaringe e da pele do homem (EFSTRATIOU, 1989), porém neste estudo não foram isolados estreptococos do grupo C das mãos dos funcionários provavelmente devido ao hábito de lavagem das mãos dos funcionários dentro do hospital.

Apesar da rota de transmissão exata de uma infecção estreptocócica ser desconhecida, sabe-se que os estreptococos podem ser carreados pelas mãos, nariz ou em aerossóis (GOLDMAN; BRETON, 1978).

Gruteke *et al.* (1996), relataram a transmissão de estreptococos do grupo A de Lancefield de um membro da equipe médica para um paciente durante um surto em um hospital da Holanda, apesar da baixa incidência de isolados de orofaringe entre os funcionários, alertando para a importância deste tipo de transmissão.

De acordo com Greenstein *et al.* (1994), os estreptococos podem ser carreados pela pele e mucosas de indivíduos saudáveis; trata-se de um microrganismo oportunista que geralmente penetra no corpo através de injúrias (TORRES *et al.*, 2007).

Como foram obtidos isolados de diferentes procedências para o presente estudo, estes foram caracterizados molecularmente visando o entendimento da epidemiologia destes agentes.

Os marcadores RAPD, utilizados neste estudo, sugerem a existência de variabilidade genética entre os isolados, porém a análise utilizando esse marcador não foi sustentada por valores de *bootstrap* confiáveis. Dentro de cada grupo houve uma grande variabilidade, relatada pela existência de sub-grupos. A presença de polimorfismo entre os isolados, indicada pelos marcadores RAPD foi confirmada com o sequenciamento parcial do gene *emm*.

Nandi *et al.*, em 2008, verificando a natureza polimórfica dos isolados de estreptococos de grupo A de Lancefield, observaram que estes apresentaram marcada heterogeneidade com cada um dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo. Também foi encontrada heterogeneidade genética em estreptococos, dentro de sorotipos, com marcadores RAPD, por Seppala *et al.*, em 1994.

O resultado das análises nucleotídicas do sequenciamento do gene *emm* parcial foi submetido ao CDC BLAST-*emm* (CDC, 2009) para a busca de homologia de tipos-M de *S. equisimilis*. Foram obtidos seis tipos-M (Tabela 2).

Na literatura não são comparados os tipos-M com diferentes sequencias nucleotídicas, na forma de haplotipos. Desta forma não é possível comparar os resultados obtidos com os da literatura.

Dos seis tipos-M encontrados, três foram os mais prevalentes para os 87 isolados sequenciados (stG6792, stC1400 e stG211). O tipo-M stG6792, é o mais prevalente entre os isolados (53/87), ele foi isolado durante todos os anos de coleta de amostras procedentes de pacientes. Foram encontrados outros isolados deste mesmo tipo-M, dois procedentes do ambiente hospitalar, dois obtidos a partir da orofaringe de funcionários do hospital e em um proveniente de fezes de cavalo do CPPI. No ano de 2004, o qual ocorreu um surto de *S. equisimilis* no hospital o tipo-M stG6792 era o mais freqüente e provável responsável por aquele surto, apenas quatro amostras eram de outros tipos-M (stC1400, stG211, st3343) durante esse período.

Tais resultados indicaram uma expressiva circulação deste tipo-M (stG6792) entre os diferentes nichos analisados. Isto é justificável, pois estreptococos são facilmente transmitidos pelo ar e podem causar surtos, uma vez que o risco de

contágio é maior em aglomerações e quando o indivíduo é sintomático (SHET *et al.*, 2004).

O tipo-M stC1400 é o segundo mais encontrado entre os isolados do presente estudo (22/87), e foi identificado em todos os anos do estudo, no ano de 2006 foi o tipo-M identificado em 10 isolados de um total de 15 isolados de pacientes indicando uma possível transmissibilidade paciente para paciente desta linhagem neste determinado período.

Lopardo *et al.* (2005) em um estudo que teve duração de seis meses, em 40 centros argentinos de controle de infecção invasiva, e envolveu 95 infecções invasivas por estreptococos beta-hemolíticos, sendo 20 por *S. equisimilis* do grupo G e seis por *S. equisimilis* do grupo C, identificou o tipo-M stC1400 em apenas um de seus isolados de uma amostra de sangue de um adulto. No presente estudo este tipo-M foi encontrado em número mais alto de infecções de lesão ulcerada.

O tipo-M stG211 é o terceiro mais prevalente (10/87) no presente estudo, e só não foi encontrado no ano de 2007, 10 isolados apresentaram esse tipo-M durante todo o período.

Existem pacientes que permaneceram internados no hospital por vários anos, e se infectam novamente com o mesmo tipo-M de isolado ou com outro isolado envolvido na rota da infecção. Demonstrando uma evidente circulação dos três principais tipos-M envolvidos com as lesões dos pacientes (stG6792, stC1400, stG211).

Os tipos-M st3343, stG6 e stC839 foram identificados cada um, uma única vez entre os isolados do presente estudo. O isolado do tipo-M st3343 foi obtido a partir de um paciente do sexo masculino em 2004, o stG6, procedente de uma lesão ocorrida em paciente do sexo feminino, obtido em 2005 e o isolado de fezes de cavalo em 2004 caracterizado como tipo-M stC839. Estes isolados não apresentam relação direta com os outros isolados do estudo. Futuros estudos, abrangendo uma anamnese do paciente e/ou novas coletas do ambiente podem elucidar se os pacientes se contaminaram no hospital ou em outra localidade.

Lopardo *et al.* (2005), obtiveram através da tipagem do gene *emm*, quatro isolados do tipo-M stG6 de infecção invasiva, sendo que um deles era de um *S. equisimilis* do grupo A de Lancefield.

Pinho *et al.* (2006), em seu estudo, identificou o tipo-M stC839 em 9 isolados de estreptococos do grupo C e em 1 isolado de estreptococo do grupo G de fontes

de infecções clínicas invasivas e não-invasivas.

Sendo o Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná dividido em ala masculina e ala feminina foi observado que houve predominância de determinados tipos-M em cada ala. Entre os isolados obtidos de pacientes do sexo feminino, o tipo-M prevalente foi o stG6792, porém é importante ressaltar que o tipo-M stG211 foi encontrado somente em dois pacientes do sexo masculino. O tipo-M stG211 também foi isolado a partir de fontes ambientais em um banco da sala de curativos da ala feminina.

Dentre os 63 isolados obtidos de pacientes do sexo masculino, os tipos-M que prevaleceram foram os stC1400 (22/63) e stG6792 (36/63). Entre os isolados de pacientes do sexo masculino, o tipo-M prevalente foi o stG6792, porém o tipo-M stC1400 foi encontrado exclusivamente em isolados de pacientes do gênero masculino provavelmente devido a uma rotina diária diferente daquela executada entre as pacientes da ala feminina.

O tipo-M tem forte correlação com o potencial de causar doença invasiva. Pinho *et al.* (2006), através da tipagem do gene *emm*, sequenciou a proteína M de 116 isolados de *S. equisimilis* dos grupos C (26) e G (90) de amostras clínicas de 1998 a 2004, e obteve 22 tipos-M diferentes, o stG6792 apareceu em 14 isolados do grupo G e foi encontrado apenas em isolados de infecção não-invasiva.

Os tipos-M prevalentes stG6792, stC1400 e stG211 foram representativos em todos os grupos formados pelo RAPD, o que reforça a variabilidade encontrada por meio deste marcador.

Os isolados obtidos de fezes de cavalo se agruparam no grupo IV, dois isolados deste grupo foram sequenciados, sendo que o obtido no ano de 2005 era do tipo-M stG6792, o tipo-M prevalente, o qual apareceu em todos os anos do estudo. Pode haver uma indicação de uma origem zoonótica da infecção, o que deve ser confirmado com posteriores análises e mais coletas de fezes de animais que circulam próximos ao hospital.

Yuen *et al.* (1990), identificou *S. zooepidemicus* de casos de bacteremia no homem, causada por estreptococos do grupo C, os mesmos isolados foram encontrados no homem e em suínos, através de características bioquímicas e moleculares como extração de DNA cromossômico por enzima de restrição; foi sugerida uma origem zoonótica da infecção.

O estudo de Vandamme *et al.* (1996), concluiu através da eletroforese de

proteína, que do ponto de vista epidemiológico, o homem é raramente infectado por linhagens de *S. dysgalactiae* de origem animal. Seus resultados indicaram a formação de dois grandes grupos no dendrograma que representavam perfis eletroforéticos diferentes dependendo da sua origem, se humana ou animal.

Através da implementação de coletas adicionais, será possível diagnosticar áreas de maior risco de contaminação para os pacientes e propor ações que visam minimizar o problema com o desenvolvimento de medidas profiláticas.

Observando que alguns tipos-M apresentaram diferenças em suas sequências nucleotídicas, foi convencionada uma nomenclatura, neste trabalho, para cada sequência homóloga, e assim, foram descritos nove haplotipos, de A a I (Tabela 2). As diferenças encontradas entre cada haplotipo foram ocasionadas por mutações que muitas vezes não foram suficientes para mudar o tipo-M da linhagem.

Na análise relacionando os tipos-M com os haplotipos nucleotídicos, descritos para este estudo, foi verificado que o tipo-M stC1400 apresentou os haplotipos A, B e C; o tipo-M stG6792 apresentou os haplotipos D e E; o tipo-M stG211 corresponde ao haplotipo I; o tipo-M st3343 corresponde ao haplotipo H; o tipo-M stG6.0 corresponde ao tipo-M G; o tipo-M stC839 corresponde ao haplotipo F (tabela 2).

Pinho *et al.* (2006), relatou que é necessário aumentar os dados referentes a epidemiologia de infecções estreptocócicas pelo grupo C em diferentes localidades geográficas, até então desconhecidos. Para as infecções estreptocócicas do grupo C, a determinação dos diferentes tipos-M, pode fornecer ferramentas para a implementação de um sistema eficaz de vigilância epidemiológica dos *S. equisimilis*.

Os resultados obtidos apontaram três principais tipos-M de *S. equisimilis* se disseminando no hospital, e diferentes fontes de infecção, sendo que estas fontes eram diferentes entre os pacientes masculinos e femininos os quais participavam de atividades própria de cada gênero em áreas separadas do hospital.

A partir destes resultados poderão ser padronizadas coletas no ambiente hospitalar e ao seu redor para detectar as fontes de infecção e desta forma poder atuar no controle de futuras infecções e desta forma melhorar significativamente as condições de vida dos pacientes afetados fisicamente e psicologicamente pela hanseníase.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho pode-se concluir que:

- O presente estudo caracterizou um número expressivo (83) de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* obtidos a partir de secreção de lesão ulcerada de pacientes internados no Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná.
- A partir de 290 amostras de ambiente, secreção de orofaringe, e mãos de funcionários do Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná e fezes de cavalos do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos foram isolados nove *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.
- Três isolados incluídos no estudo são do meio ambiente, sendo que este tipo de isolamento para estreptococos é raramente descrito na literatura.
- Através dos marcadores RAPD, observa-se variabilidade genética entre os isolados de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* analisados.
- A partir da análise das seqüências nucleotídicas foram descritos nove haplotipos diferentes entre os isolados de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.
- Os isolados de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* foram caracterizados em seis tipos-M diferentes a partir do sequenciamento parcial do gene *emm* dos quais três tipos-M principais (stG6792, stC1400 e stG211) circulam entre os pacientes internados no hospital, provenientes de diferentes fontes de infecção, evidenciando uma importante disseminação do agente pelo ambiente hospitalar.
- O tipo-M stC1400 foi encontrado somente em isolados provenientes de secreção de lesão ulcerada de pacientes do sexo masculino, o que pode estar

relacionado com o deslocamento para áreas específicas do hospital ou com atividades específicas realizadas pelos pacientes do sexo masculino.

- A padronização de coletas no ambiente pode detectar fontes de infecção o que pode auxiliar no estabelecimento de protocolos para os profissionais da saúde no sentido de minimizar os riscos para a ocorrência de infecção hospitalar.
- A determinação dos tipos-M envolvidos com as infecções no Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná, contribuiu com dados para estudos epidemiológicos de estreptococos do grupo C.

REFERÊNCIAS

ALBERTI, S.; GARCA-REY, C.; GARCIA-LAORDEN, I.; DAL-RE, R.; GARCIA-DE-LOMAS, J. Survey of emm-like gene sequences from pharyngeal isolates of group C and group G streptococci collected in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, Spain, v. 43, n. 3, p. 1433-1436, Oct 2005.

ANAND, C.; GORDON, R.; SHAW, H.; FONSECA, K.; OLSEN, M. Pig and goat blood as substitutes for sheep blood in blood-supplemented agar media. **Journal of Clinical Microbiology**, Canada, v. 38 n. 2, p. 591-594, Feb 2000.

ARBEIT, R. D. **Manual of clinical microbiology**. 6. ed. Washington: ASM Press, 1995.

BALTER, S.; BENIN, A.; PINTO, S. W. L.; TEIXEIRA, L.M.; ALVIM G.G.; LUNA, E.; JACKSON, E.; LACLAIRE, L.; ELLIOT, J.; FACKLAM, R.; SCHUCHAT, A. Epidemic nephritis in Nova serrana, Brazil. **Lancet**, Brazil, v. 355, n. 921, p. 1776-1780, Mai 2000.

BARNHAM, M.; COLE, G.; EFSTRATIOU, A.; TAQQ, J. R.; SKJOLD, S. A. Characterization of *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C) from human and selected animal infections. **Epidemiology and Infection**, v. 98, n. 2, p. 171–82, Abr 1987.

BARNUM, D. A. *Streptococcus*. In: Pathogenesis of bacterial infeccions in animals. C. L. Gyles and G. O. Thoen (eds) Iowa State University Press, Ames, Iowa, 227pp, 1989.

BESSEN, D.; JONES, K. F.; FISCHETTI, V. A. Evidence for two distinct classes of streptococcal M protein and their relationship to rheumatic fever. **Jounal of Experiment Medicine**, New York, v. 169, n. 1, p. 269-283, Jan 1989.

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**, France, v. 34, n. 4, p. 226-229, Aug 1997.

BERT, F.; PICARD, B.; BRANGER, C.; LAMBERT-ZECHOVSKY. Analysis of genetic relationships among strains of groups A, C and G streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Medical Microbiology**, France, v. 45, n. 4, p. 278-284, Out 1996.

BISNO, A. L. Acute pharyngitis: etiology and diagnosis. **Pediatrics**, American Academy of Pediatrics, v. 97, n. 6, p. 949-953, 1996.

BISNO, A. L.; COLLINS, C. M.; TURNER, J. C. M proteins of group C streptococci isolated from patients with acute pharyngitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Florida, v. 34, n. 10, p. 2511-2515, Oct 1996.

BONE J. F.; CATCOTT, E. J.; GABEL, A. A.; JOHNSON, L. E.; RILEY, W. F. Strangles (Distemper) in Equine Medicine and Surgery, 1. ed., **American Veterinary Publications**, Wheaton, Illinois, p. 173, 1963.

BROWN, J. H. The use of Agar for the study of streptococci. Monograph 9. **The Rockefeller Institute for the Medical Research**, New York, 1919.

CAETANO-ANOLLES, G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, Tennessee, v. 9, n. 6, p. 553-557, Jun 1991.

CDC. *Streptococcus pyogenes emm* Sequence Database. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emm-type.htm>. Acesso em: 10/11/2009.

CHANTER, N.; COLLIN, N.; HOLMES, N.; BINNS, M.; MUMFORD, J. Characterization of the Lancefield group C *Streptococcus* 16S-23S RNA gene intergenic spacer and its potential for identification and sub-specific typing. **Epidemiology and Infection**, UK, v. 118, n. 2, p. 125-135, Apr 1997.

COELHO, A. S. G. *Software Bood* 3.03, 2005.

COLMAN, G.; TANNA, A.; EFSTRATIOU, A.; GAWORZEWSKA, E. T. The serotypes of *Streptococcus pyogenes* present in Britain during 1980-1990 and their association with disease. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 39, n. 3, p. 165-178, Sep 1993.

COLLINS, C. M.; KIMURA, A.; BISNO, A. L. Group G streptococcal M protein exhibits structural features analogous to those of class I M protein of group A streptococci. **Infection and Immunity**, Florida, v. 60, n. 9, p. 3689-3696, Sep 1992.

CUNNINGHAM, M. W. Pathogenesis of group A streptococcal infections. **Clinical Microbiology**, v. 13, p. 470-811, 2000.

DAJANI, A.; TAUBERT, K.; FERRIERI, P.; PETER, G.; SHULMAN, S. Treatment of Acute streptococcal pharyngitis and prevention of rheumatic fever: a statement for health professionals. **Pediatrics**, USA, v. 96, n. 4, p. 758-764, Oct 1995.

DEIBEL, R. H.; SEELEY, H. W. Streptococcaceae fam. In R E Buchanan and NE Gibbons (ed). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8. ed. The Williams Wilkins Co Baltimore. p. 490-517, Nov 1974.

DOWNAR, J.; WILLEY, B. M.; SUTHERLAND, J. W.; MATHEW, K.; LOW, D. E. Streptococcal meningitis resulting from contact with an infected horse. **Journal of Clinical Microbiology**, Canada, v. 39, n. 6, p. 2358-2359, Jun 2001.

DUARTE, R.S.; MIRANDA, O. P.; BELLEI B. C.; BRITO, M. A. TEIXEIRA, L. M. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Brazil, v. 42, n. 9, p. 4214-4222, Sep 2004.

DUCA, E.; TEODOROVICI, G.; RADU, C.; VITA, A.; TALASMAN-NICULESCU, P.; BERNESCU, E.; FELDI, C.; ROSCA, V. A new nephritogenic *Streptococcus*. **The Journal of hygiene**, London, v. 64, n. 4, p. 691-698, Dec 1969.

EFSTRATIOU, A. Outbreaks of human infections caused by pyogenic streptococci of Lancefield groups C and G. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 29, n. 3, p. 207-219, Jul 1989.

EFSTRATIOU, A.; TEARE, E.L.; MACGHIE, D.; COLMAN, G. The presence of M proteins in outbreak strains of *Streptococcus equisimilis* T-type 204. **Journal of Infection**, London, v. 19, n. 2, p. 105-111, Sep 1989.

ENRIGHT, M. C.; SPRATT, B. G.; KALIA, A.; CROSS, J. H.; BESSEN, D. E. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between emm type and clone. **Infection and Immunity**, UK, v. 69, n. 4, p. 2416-2427, Apr 2001.

FACKLAM, R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clinical Microbiology Reviews**, Atlanta, v. 15, n. 4, p. 613-630, Oct 2002.

FARROW, J. A. E.; COLLINS, M. D. Taxonomic studies on streptococci of serological groups C, G and L and possibly related taxes. **Systematic and Applied Microbiology**, 5:483-493, 1984.

FOX, G. E.; MAGRUM, L. J.; BALCH, W. E.; WOLFE, R. S.; WOESE, C. R. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. **Proceedings of the National Academy of Science**, Illinois, v. 74, n. 10, p. 4537-4541, Oct 1977.

FROST, W. D.; ENGELBRECHT, M. A. The streptococci. Willdorf Book Co., Madison, Wis. 1940.

GOLDMAN, D. A.; BRETON, S. J. Group C streptococcal surgical wound infections transmitted by an anorectal carrier. **Pediatrics**, v. 61, n. 2, p. 235-237, Feb 1978.

GONZALEZ, T. B.; ROIZ, M. P.; RUIZ JIMENO, T.; ROSAS J.; CALVO-ALEN, J. Acute bacterial arthritis caused by group C streptococci. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, Spain, v. 31, n. 1, p. 43-51, Aug 2001.

GONZÁLEZ-REY, C.; BELIN, A. M.; JOSRBECK, H.; NORMAN, M.; KROVACEK, K.; HENRIQUES, B.; KALLENIOUS, G.; SVENSON, S. B. RAPD-PCR and PFGE as tools in the investigation of an outbreak of beta-hemolytic *Streptococcus* group A in a Swedish hospital. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Disease**, Sweden, v. 26, n. 1, p. 25-35, Jan 2003.

GREENSTEIN, G.; DROZDOWITZ, C. K.; NEBIAB, F.; BOZIK, R. Isolation of *Streptococcus equisimilis* from abscess detected in specific pathogen-free mice. **Laboratory Animal Science**, Nutley, v. 44, n. 4, p. 374-376, Aug 1994.

GRUTEKE, P.; BELKUM, A.; SCHOULS, L.M.; HENDRIKS, W.D.H.; REUBSAET, F.A.G.; DOKTER, J.; BOXMA, H.; VERGBRUH, H.A. Outbreak of group A streptococci in a burn center: use of pheno- and genotypic procedures for strain tracking. **Journal of Clinical Microbiology**, Netherlands, v. 34, n. 1, p. 114-118, Jan 1996.

GUPTA, R.; LANTER, J. M.; WOESE, C. R. Sequence of the 16S ribosomal RNA from *Halobacterium volcanii*, an Archaeobacterium. **Science**, v. 221 n, 4611, p. 656-659, Aug 1983.

GUPTA, N.; LOVVORN, J.; CENTOR, R. M. Peritonsillar abscess requiring intensive care unit admission caused by group C and G Streptococcus: a case report. **Cases Journal**, USA, v. 2, p. 6808, Sep 2009.

HASHIKAWA, S.; LINUMA, Y.; FURUSHITA, M.; OHKURA, T.; NADA, T.; TORII, K.; HASEGAWA, T.; OHTA, M. Characterization of group C and G Streptococcal strains

that cause streptococcal toxic shock syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Japan, v. 42, n. 1, p. 186-192, Jan 2004.

HORII, T.; IZUMIDA, S.; TAKEUCHI, K.; TADA, T.; ISHIKAWA, J.; TSUBOI, K. Acute peritonitis and salpingitis associated with streptococcal toxic shock syndrome caused by Lancefield group G α -haemolytic *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. **Journal of Medical Microbiology**, Japan, v. 55, p. 953-956, Jul 2006.

JACOBS, J. A.; PIETERSEN, H. G.; STOBBERINGH, E. E.; SOETERS, P. B. *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus intermedius*. Clinical relevance, hemolytic and serologic characteristics. **American Journal of Clinical Pathology**, Netherlands, v. 104, n. 5, p. 547-553, Nov 1995.

KALIA, A.; BESSEN, D. E. Presence of streptococcal pyrogenic exotoxin A and C genes in human isolates of group G streptococci. **FEMS Microbiology Letters**, USA, v. 219, n. 2, p. 291-295, Feb 2003.

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

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2001.

KRISTENSEN, B.; SCHONHEYDER, H.C. A 13-year survey of bacteraemia due to beta-haemolytic streptococci in a Danish county. **Journal of Medical Microbiology**, Denmark, v. 43, n. 1, p. 63-67, Jul 1995.

KUMAR, A.; SANDOE, J.; KUMAR, N. Three cases of vertebral osteomyelitis caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. **Journal of Medical Microbiology**, UK, v. 54, p. 1103-1105, Nov 2005.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, n. 2, p.150-163, 2004.

LAM, K.; BAYER, A. S. In vitro bactericidal synergy of gentamicin combined with penicillin G, vancomycin, or cefotaxime against group G streptococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 26, n. 2, p. 260-262, Aug 1984.

LAMMLER, C.; FREDE, C.; GURTURK, K.; HILDEBRAND, A.; BLOBEL, H. Binding activity of *Streptococcus canis* for albumin and other plasma proteins. **Journal of General Microbiology**, Germany, v.134, n. 8, p. 2317-2323, Aug 1988.

LANCEFIELD, R. C. A. Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 57, n. 4, p. 571-595, 1932.

LOPARDO, H.A.; VIDAL, P.; SPARO, M.; JERIC, P.; CENTRON, D.; FACKLAM, R. R.; PAGANINI, H.; PAGNIEZ, N. G.; LOVGREN, M.; BEALL, B.; ARGENTINIAN STREPTOCOCCUS STUDY GROUP. Six-month multicenter study on invasive infections due to *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in Argentina. **Journal of Clinical Microbiology**, Argentina, v. 43, n. 2, p. 802-807, Feb 2005.

MCDONALD, M. I.; TOWERS, R. J.; ANDREWS, R. M.; BENGER, N.; CURRIE, B. J.; CARAPETIS, J. R. Low rates of streptococcal pharyngitis and high rates of pyoderma in Australian aboriginal communities where acute rheumatic fever is hyperendemic. **Clinical Infectious Diseases**, Australia, v. 43, n. 6, p. 683-689, Sep 2006.

MCDONALD, M.; TOWERS, R. J.; ANDREWS, R. M.; CARAPETIS, J. R.; CURRIE, B.J. Epidemiology of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in tropical communities northern Australia. **Emerging Infectious Diseases**, Australia, v. 13, n. 11, p. 1694-1700, Nov 2007.

MCGREGOR, K. F.; SPRATT, B. G.; KALIA, A.; BENNETT, A.; BILEK, N.; BEALL, B.; BESSEN, D. E. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* representing most known *emm* types and distinctions among subpopulation genetic structures. **Journal of Bacteriology**, UK, v. 186, n. 13, p. 4285-4294, Jul 2004.

MEUNIER, J. R.; GRIMONT, P. A. D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Research in Microbiology**, France, v. 144, n. 5, p. 373-379, Jun 1993.

METZGAR, D.; BAYNES, D.; HANSEN, C.J.; MACDONOUGH, E.A.; CABRERA, D.R.; ELLORIN, M.M.; BLAIR, P.J.; RUSSELL, K.L.; FAIX, D.J. Inference of antibiotic resistance and virulence among diverse group A *Streptococcus* strains using *emm* sequencing and multilocus genotyping methods. **PlosOne**, USA, v. 4, n. 9, p. e6897, Sep 2009.

MIGNARD, S.; FLANDROIS, J. P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**, France, v. 67, n. 3, p. 574-581, Jul 2006.

MOREIRA, M. **Variabilidade genética de *Streptococcus mutans* em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

NANDI, S.; GANGULY, N. K.; KUMAR, R.; DAPINDER, B. K.; SAGAR, V.; CHAKRABORTI, A. Genotyping of group A streptococcus by various molecular methods. **Indian Journal of Medical Research**, India, v. 127, n. 1, p. 71-77, Jan 2008.

OJUKWU, I. C.; NEWTON, D. W.; LUQUE, A. E.; KOTB, M. Y. S.; MENEGUS, M. Group C *Streptococcus* infection associated with rhabdomyolysis and disseminated intravascular coagulation in a previously healthy adult. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, New York, v. 33, n. 3, p. 227-229, 2001.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, USA, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, Jun 1999.

PEREIRA, M. S. V.; LEAL, N. C.; SOBREIRA, M.; ALMEIDA, A. M. P.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Typing of human bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Brazil, v. 35, n. 1, p. 32-36, 2002.

PINHO, M.D.; MELO-CRISTINO, J.; RAMIREZ, M. Clonal relationships between invasive and noninvasive Lancefield group C and G Streptococci and emm-specific differences in invasiveness. **Journal of Clinical Microbiology**, Portugal, v. 44, n. 3, p. 841-846, Mar 2006.

PISCITELLI, S. C.; SHWED, J.; SCHRECKENBERGER, P.; DANZIGER, L. H. *Streptococcus milleri* group: renewed interest in an elusive pathogen. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, Chicago, v. 11, n. 6, p. 491-498, Jun 1992.

POLLOCK, H. M.; DAHLGREN, B.J. Distribution of streptococcal groups in clinical specimens with evaluation of bacitracin screening. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 27, n. 1, p. 141-143, Jan 1974.

QUIE, P.G. Development of effective programs for control of epidemic streptococcal infections. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Minnesota, v. 10, n. 10, p. 7-10, Oct 1991.

RAYMOND, J.; SCHLEGEL, L.; GARNIER, F.; BOUVET, A. Molecular Characterization of *Streptococcus pyogenes* isolates to investigate an outbreak of puerperal sepsis. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, France, v. 26, n. 5, p. 455-461, May 2005.

ROHLF, F. J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, Exeter Publishing, 1988.

ROSS, P.W.; CHRISTY, S. M. K.; KNOX, J. D. E. Sore throat in children: its causation and incidence. **British Medical Journal**, Edinburgh, v. 2, n. 5762, p. 624-626, Jun 1971.

SALATA, R. A.; LERNER, F. I.; SHLAES, D. M.; GOPALAKRISHNA, K. V.; WOLINSKY, E. Infections due to Lancefield group C streptococci. **Medicine (Baltimore)**, Ohio, v. 68, n. 4, p. 225-239, Jul 1989.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. CSH Press, 1989.

SCANLAN, C. M. Introduction to veterinary bacteriology. Iowa State University Press, Ames, Iowa, p. 457. 1989.

SCHNITZLER, N.; PODBIELSKI, A.; BAUMGARTEN, G.; MIGNON, M.; KAUFHOLD, A. M or M-like protein gene polymorphisms in human group G streptococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Germany, v. 33, n. 2, p. 356-363, Feb 1995.

SEPPALA, H.; VUOPIO-VARKILA, J.; OSTERBLAD, M.; JAHKOLA, M.; RUMMUKAINEN, M.; HOLM S.E.; HUOVINEN, P. Evaluation of methods for epidemiologic typing of group A streptococci. **Journal of Infectious Disease**, Finland, v. 169, n. 3, p. 519-525, 1994.

SEPPALA, H.; QIUSHUI, H.E.; OSTERBLAD, M.; HUOVINEN, P. Typing of group A streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Finland, v. 32, n. 8, p. 1945-1948, Aug 1994.

SHERMAN, J. M. The streptococci. **Bacteriology Reviews**, New York, v. 1, n. 1, p. 3-97, Dec 1937.

SHET, A.; FERRIERI, P. Neonatal & maternal group B streptococcal infections: A comprehensive review. **The Indian Journal of Medical Research**, USA, v. 120, n. 3, p. 141-150, Set 2004.

SILJANDER, T.; LYYTIKAINEN, O.; VAHAKUOPUS, S.; SAILA, P.; JALAVA, J.; VUOPIO-VARKILA, J. Emergence of *emm84* among Invasive *Streptococcus pyogenes* Infections in Finland. **Journal of Clinical Microbiology**, Finland, v. 47, n. 2, p. 477-480, Feb 2009.

SPOLIDORIO, D. M. P.; HÖFLING, J. F.; PIZZOLITTO, A. C.; ROSA, E. A.; NEGRINI, T. C.; SPOLIDORIO, L. C. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in brazilian family members. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil, v. 34, n. 3, p. 213-217, Ago 2003.

STADEN, R, JUDGE D P.; BONFIELD, J.K. Sequence assembly and finishing methods. **Methods of biochemical Analysis**, v. 43, p.303-322, 2001.

STAMM, A. M.; COBBS, C. G. Group C streptococcal pneumonia: report of a fatal case and review of the literature. **Reviews of infectious disease**, v. 2, n. 6, p. 889-898, Nov 1980.

TANAKA, D.; ISOBE, J.; WATAHIKI, M.; NAGAI, Y.; KATSUKAWA, C.; KAWAHARA, R.; ENDOH, M.; OKUNO, R.; KUMAGAI, N.; MATSUMOTO, M.; MORIKAWA, Y.; IKEBE, T.; WATANABE, H. Genetic features of clinical isolates os *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* possessing Lancefield's group A antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, Japan, v. 46, n. 4, p. 1526-1529, Apr 2008.

TEARE, E. L.; SMITHSON, R. D.; EFSTRATIOU, A.; DEVENISH, W. R.; NOAH, N. D. An outbreak of puerperal fever caused by group C streptococci. **Journal of Hospital Infection**, UK, v. 13, n. 4, p. 337-347, Mai 1989.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, USA, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, Sep 1995.

TIMONEY, J. F. The pathogenic equine streptococci. **Veterinary Research**, USA, v. 35, n. 4, p. 397-409, Jul 2004.

TORRES, R. S. L. A.; PAULA, C. C.; PILONETTO, M.; FONTANA, C. K.; MINOZZO, J. C.; TORRES, R. A. An outbreak of *Streptococcus dysgalactiae* subsp *equisimilis* in

a hospital, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil, v. 38, p. 417-420, Jul 2007.

VAN BELKUM, A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. **Clinical Microbiology Reviews**, Netherlands, v. 7, n. 2, p. 174-184, Apr 1994.

VANDAMME, P.; POT, B.; FALSEN, E.; KERSTERS, K.; DEVRIESE, L. A. Taxonomic study of Lancefield streptococcal groups C, G and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Belgium, v. 46, n. 3, p. 774-781, Jul 1996.

VIEIRA, V. V.; TEIXEIRA, L. M.; ZAHNER, V.; MOMEN, H.; FACKLAM, R. R.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J.; CASTRO A. C. Genetic relationships among the different phenotypes of *Streptococcus dysgalactiae* strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Brazil, v. 48, n. 4, p. 1231-1243, Oct 1998.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, California, v. 18, n. 24, p. 6531-6535, Dec 1990.

WHO STUDY GROUP. Report of a WHO Study Group. **Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease**. Geneva, n.764, 1988.

WILLIAMS, G. S. Group C and G streptococci infections: emerging challenges. **Clinical Laboratory Science**, USA, v. 16, n. 4 p. 209-213, 2003.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Wilmington, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov 1990.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; TENG, J. L. L.; TSE, H.; YUEN, K. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infectious Disease**, China, v. 14, n. 10, p. 908-934, Jun 2008.

YUEN, K.Y.; SETO, W. H.; CHOI, C. H.; NG, W.; HO, S. W.; CHAU, P.Y. *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C) septicaemia in Hong Kong. **The Journal of Infection**, Hong Kong, v. 21, n. 3, p. 241-250, Nov 1990.