

THAÍS TAVARES DE AMORIM

COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS
DE *Streptococcus dysgalactiae* SUBSP. *equisimilis* PERTENCENTES AO
MESMO CLONE E *sequence type* ISOLADAS DE HOSPEDEIRO
HUMANO E EQUINO.



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
MAIO/2021

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho e coorientação de Victor Lima dos Santos

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

T524c Tavares de Amorim, Thais
COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE
AMOSTRAS DE *Streptococcus dysgalactiae* SUBSP.
equisimilis PERTENCENTES AO MESMO CLONE E sequence
type ISOLADAS DE HOSPEDEIRO HUMANO E EQUINO. / Thais
Tavares de Amorim. -- Rio de Janeiro, 2021.
84 f.

Orientadora: Bernadete Teixeira Ferreira
Carvalho.
Coorientador: Victor Lima dos Santos.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2021.

1. *Streptococcus dysgalactiae* subsp.
equisimilis. 2. zoonose. 3. equinos. 4. virulência.
5. *Caenorhabditis elegans*. I. Teixeira Ferreira
Carvalho, Bernadete, orient. II. Lima dos Santos,
Victor, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO: **Thaís Tavares de Amorim**

DRE: 117092166

BANCA EXAMINADORA: Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)
Prof. Leonardo Rocchetto Coelho
Dra. Caroline Lopes Martini
Msc. Isis Hazelman Vieira dos Anjos (Suplente)

Título da Monografia: **“Comparação do potencial de virulência de amostras de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* pertencentes ao mesmo clone e *sequence type* isoladas de hospedeiro humano e equino”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/vhk-nqbu-nbv>

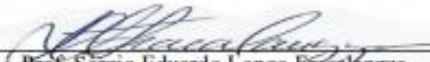
Data e hora de início: **24 de maio de 2021 às 9:30h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.


Rio de Janeiro, 24 de maio de 2021.

NOTA	Banca Examinadora:
10,0	Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza
10,0	Prof. Leonardo Rocchetto Coelho
10,0	Dra. Caroline Lopes Martini
	Msc. Isis Hazelman Vieira dos Anjos


Presidente da banca


Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza

Aluno


Thaís Tavares de Amorim

Orientador


Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho / Coorientador: M.Sc. Victor Lima dos Santos

Coordenador de TCC


Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, gostaria de agradecer a Deus por todos os caminhos que me trouxeram até aqui, pois sei que sem ele nada disso teria sido possível. Bem como agradecer a minha família por todo amor e apoio que me proporcionaram nesses quase 5 anos de graduação e durante a vida inteira. Obrigada, pai, por ter se esforçado ao máximo para proporcionar o melhor para mim e para minha irmã desde o nosso primeiro segundo de vida. Todos os ensinamentos que me passou e tem passado sempre terão um lugar mais relevante no meu coração. Obrigada, mãe, por além de ter me dado mitocôndrias incríveis, também ter fornecido o suporte necessário em todos os momentos da minha vida, por ter acreditado no meu potencial quando eu mesma nem acreditava e ter me feito entender que não importa o que aconteça, sempre teremos uma à outra. Obrigada, irmã, por ter surgido em minha vida e tê-la tornado muito mais leve e divertida, acredite ou não, eu aprendo muito mais com você do que você comigo. Obrigada, vó, por todas as histórias antigas que me trouxeram muita sabedoria. Também gostaria de agradecer aos meus bichinhos de estimação, que definitivamente fazem parte da minha família. Obrigada Sofia, Aurora, Daenerys, Azula, Mai e Hope por me ajudarem a manter a calma mesmo em momentos turbulentos, e às minhas filhas emprestadas Julietta e Olga, por me encherem de energias positivas mesmo sem muita convivência. É um privilégio tê-los como minha família, eu amo infinitamente cada um de vocês com todo o meu coração.

Além disso, gostaria de agradecer aos meus tios e tias, primos e primas. Principalmente as minhas tias Alisete, Ally, Olimpia e Alerte, que são grandes exemplos de mulheres independentes, fortes e guerreiras. Em especial, a tia Arlete, que sempre dá um jeitinho para corroborar com os meus planos malucos. As minhas primas Carol, Priscilla e Rafaella, que me aguentaram por anos falando de biologia e bactérias sem parar. Não posso me esquecer da minha família do Espírito Santo, que são minha válvula de escape do mundo real. Obrigada, Iago, meu irmão de outra mãe, Felipe, Fábio, Luziane, Luciane, Fabiana, Aparecida, Ogenilton, Ismael e tantos outros que me trazem uma imensa alegria.

Com certeza, também devo agradecer a minha segunda família, os meus amigos. Obrigada, Giovanna, por todo conselho e apoio que me proporcionou durante e antes dessa saga, por cada puxão de orelha e abraço, cada correção ortográfica, crítica e ajuda, você tem muita contribuição nesse trabalho. Obrigada, Matheus, meu grande duo, por todos os filmes, séries e desenhos que me fizeram esquecer um pouco da tensão do momento em que vivemos. Isabelle, obrigada pela imensa ajuda que me deu em diversos momentos dentro e fora da faculdade. Anna, minha parceira de microcombate, os seus momentos de calma sempre me trouxeram paz, mas também era reconfortante surtarmos um pouquinho juntas. Mariana, a Selena Gomez da gente, guardarei todos os nossos momentos com muito carinho no meu coração. Ariane, minha companhia de trânsito, muito obrigada por ter me ouvido e aconselhado em diversos momentos durante a minha trajetória na faculdade, e, claro, por ter aperfeiçoado o meu gosto musical. Lucas Magalhães, obrigada pela companhia e por ser uma ótima dupla de trabalhos. Lucas Giovanini, obrigada pelas conversas viajadas sobre tempo e espaço. Obrigada, Gabriela e Edson por sempre acompanharem as minhas presepadas, mesmo que existam alguns pedágios que não aceitam cartões pelo caminho. Cada um de vocês são extremamente importantes para mim e espero ter sempre o privilégio de tê-los em minha vida.

Aos meus amigos de Nova Iguaçu: Júlia, Brenda, Aloisio, Ramon e Letícia. Vocês estiveram presentes desde a minha primeira aula de biologia, me ajudaram a descobrir a minha vocação, sendo essenciais para que eu tomasse esse caminho. Muito obrigada.

Gostaria também de agradecer as pessoas incríveis que tive o prazer de trabalhar no laboratório BMB. Isis, a minha primeira co-orientadora, que teve uma participação gigantesca na minha formação profissional e acadêmica, além de ser uma ótima companhia em todos os momentos. Úrsula, que foi muito mais do que uma parceira de laboratório, e sempre veio ao meu socorro quando precisei, fosse para contar *C. elegans* ou comer hambúrguer ao som de “Coldplay”. Ao meu co-orientador Victor por ter se desdobrado para conseguir me ajudar nessa reta final, mesmo com toda a adversidade de uma pandemia. A Carol, vulgo Frida, pelas madrugadas de intensos diálogos e por ter me passado muito mais do que ensinamentos comunistas. A professora Agnes, por todo o conhecimento compartilhado, que se diga de passagem realmente não estavam presentes em livros. Além de toda equipe BMB: Alice, Cristiane, Deborah, Cícera, Fernanda (minha IC de férias), Laís, Yan e professor Leonardo. Em especial, um muito obrigado a Lígia Guedes, uma grande cientista que foi indispensável para a realização desse trabalho, descanse em paz.

É claro que eu tive que deixar um parágrafo exclusivo para a melhor orientadora que alguém poderia ter: Bernadete, Rainha dos *Streptococcus*. Diversas vezes você ultrapassou a posição de orientadora, foi minha psicóloga, médica, conselheira, melhor amiga e mãe emprestada, esse trabalho definitivamente nunca teria sido possível sem suas intervenções. Você foi o meu anjo da guarda mesmo sem saber, a gratidão que tenho por ti é de transbordar o peito. Desde a primeira aula em Treinamento Científico I, tive grande admiração pela pesquisadora e professora extraordinária que a senhora é, mas ao conhecer seu lado humano passei a admirar também a grande mulher que existe em seu interior. Eu amo você, obrigada por além de me orientar, ter me inspirado a continuar em diversos momentos, sempre terei enorme orgulho em dizer que fui orientada por: Ferreira-Carvalho, B. T.

Por fim, agradeço a CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro na pesquisa e na educação.

– Se você pudesse ver toda a sua vida do início ao fim, mudaria alguma coisa?

– Eu talvez diria o que sinto com mais frequência.

(A Chegada, 2016)

RESUMO

THAÍS TAVARES DE AMORIM

COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE *Streptococcus dysgalactiae* SUBSP. *equisimilis* PERTENCENTES AO MESMO CLONE E *sequence type* ISOLADAS DE HOSPEDEIRO HUMANO E EQUINO.

Orientador: Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Dentre os estreptococos do grupo C (EGC) a espécie inicialmente classificada como *S. equisimilis* foi dividida em duas subespécies, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE; beta-hemolítica e causadora de infecções em humanos) e *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (alfa-hemolítica e causadora de infecções em outros animais). Em estudo anterior realizado pelo nosso grupo 115 amostras de SDSE foram analisadas e dois clones prevalentes detectados (A e B). Entre as amostras pertencentes ao clone B (B₂), três foram isoladas de equinos e apresentavam o mesmo perfil de PFGE e ST (ST129) idênticos a duas amostras isoladas de humanos, demonstrando pela primeira vez na literatura, uma relação zoonótica na espécie SDSE. Este trabalho teve por objetivo avaliar quatro dessas amostras de SDSE geneticamente relacionadas, isoladas de humanos (2) e equinos (2), através da investigação da resistência e de mecanismos de virulência envolvidos nos processos de aderência, invasão, produção de biofilme, de fatores de virulência e sobrevivência frente a *C. elegans*, buscando entender sua adaptação aos dois hospedeiros. Todas as amostras apresentaram o mesmo perfil de susceptibilidade, sendo sensíveis a penicilina e clindamicina, mas resistentes a eritromicina e, devido a isso, foram caracterizadas como fenótipo M. Ademais, todas as amostras apresentavam o gene *mef* e duas (uma oriunda de humano e outra de equino), o gene *ermA*. Todas as amostras apresentavam importantes fatores de virulência, sendo constatada a presença dos seguintes genes: *emm*, *brpA*, *fbp*, *gapA*, *hyl*, *inlA*, *lmb*, *sagA*, *scpB*, *ska*, *slo* e *spgG*. Em contrapartida, não foram detectados os genes: *spdI*, *speC*, *speK*, *speL* e *speM*. Adicionalmente, o gene de uma subunidade do pilus não foi detectado em apenas uma amostra, 84-030 (isolada de equino). Foi avaliada a aptidão das cepas em formar biofilme em superfície de vidro, onde 81-681 (isolada de humano) e 83-060 (isolada de equino) foram classificadas como não produtoras. As demais, como produtoras de biofilme fraco. Duas amostras de cada hospedeiro foram escolhidas ao acaso para avaliação da capacidade de adesão e invasão às células brônquicas humanas (16HBE14o-). A amostra isolada de humano (81-681), única que demonstrou capacidade de invasão, apresentou uma capacidade de adesão 31x maior que a de equino (84-030). A sobrevivência de *C. elegans* na ausência ou presença de NAC e BSO foram testadas frente as quatro amostras de SDSE e as alterações morfológicas em apenas duas (81-681 e 84-030). Todas foram capazes de matar os nematoides, porém as isoladas de humanos demonstraram maior virulência por promoverem menor percentual de sobrevivência e alterações

morfológicas mais significativas. As mesmas amostras selecionadas para o estudo da morfologia celular foram utilizadas nos estudos de preferência olfativa. Em todas as situações em que a amostra controle (*E. coli* OP50) esteve presente os nematoides optaram por ela. Quando as opções eram as cepas de SDSE isolada de humano e a de equino, cerca de 99% dos animais optaram por nenhuma delas e, aproximadamente, 1% escolheu a cepa proveniente de equino, demonstrando que ambas as amostras eram virulentas, porém a de humano se destacava. Por fim, amostras de SDSE das diferentes origens se mostraram aptos a causar infecções em ambos os hospedeiros. No entanto, as isoladas de humanos demonstraram maior potencial de patogenicidade em vários dos aspectos analisados. Entretanto, outros estudos são necessários para melhor entender o potencial patogênico destas amostras e a sua evolução para se adaptar aos dois hospedeiros.

Palavras-chave: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, zoonose, equinos, virulência, *Caenorhabditis elegans*.

ABSTRACT

THAÍS TAVARES DE AMORIM

COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE *Streptococcus dysgalactiae* SUBSP. *equisimilis* PERTENCENTES AO MESMO CLONE E *sequence type* ISOLADAS DE HOSPEDEIRO HUMANO E EQUINO.

Orientador: Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Among the group C of streptococci (GCS), the species initially classified as *S. equisimilis* was divided into two subspecies, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE; beta-hemolytic, causing infections in humans) and *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (alpha-hemolytic, causing infections in other animals). In a previous study carried out by our group, 115 samples of SDSE were analyzed and two prevalent clones were detected (A and B). Among the samples belonging to clone B (B₂), three of them were isolated from horses and had the same profile of PFGE and ST (ST129) identical to two other samples isolated from humans, demonstrating for the first time a zoonotic relationship in the SDSE species. This study aimed to evaluate four of these genetically related SDSE samples, isolated from humans (2) and equines (2), by investigating the resistance and virulence mechanisms involved in the process of adhesion, invasion, biofilm production, virulence factors and survival against *C. elegans*, seeking to understand its adaptation in both hosts. All samples had the same susceptibility profile, being sensitive to penicillin and clindamycin, but resistant to erythromycin and, because of this, were characterized as phenotype M. In addition, the gene *mef* was present in all samples while the gene *ermA* was detected in one sample derived from human and the other from equine. All samples presented important virulence factors, and the following genes were found: *emm*, *brpA*, *fbp*, *gapA*, *hyl*, *inlA*, *lmb*, *sagA*, *scpB*, *ska*, *slo* and *speG*. On the other hand, the following genes were not detected: *spdI*, *speC*, *speK*, *speL* and *speM*. In addition, the gene for a pilus subunit was detected in all samples, except for one, 84-030 (isolated from equine). The capacity of the strains to form biofilm on a glass surface was evaluated, where 81-681 (isolated from human) and 83-060 (isolated from equine) were classified as non-producers of biofilm. The others produced weak biofilm. Two samples from each host were chosen at random in order to assess the profile of adhesion and invasion to human bronchial cells (16HBE14o-). Only one sample demonstrated invasive behavior (81-681, isolated from human), showing an ability to adhere 31x greater than that of equine sample tested (84-030). The survival of *C. elegans* in the absence or presence of NAC and BSO was tested against four samples of SDSE. The morphological changes were valued in two samples, 81-681 and 84-030. All samples were able to promote death in the nematodes, however, those isolated from humans showed greater virulence, promoting a lower percentage of survival and more significant morphological changes. The same samples selected for the study of cell morphology were used in studies of olfactory preference. All

nematodes showed preference for the control sample (*E. coli* OP50) in all scenarios tested in which it was present. When the nematodes were tested against both human and equine SDSE samples, 99% of them opted for neither and 1% of the nematodes tested opted for the equine sample, suggesting that both samples were virulent, but the human sample stood out. Finally, samples of SDSE from different sources proved to be able to cause infections in both hosts. However, those isolated from humans showed greater potential for pathogenicity in several of the aspects analyzed. Although, further studies are needed to better understand the pathogenic potential of these samples and their evolutionary adaptability in the two hosts.

Keywords: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, zoonosis, horses, virulence, *Caenorhabditis elegans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fatores de virulência putativos em SDSE e suas respectivas funções.	8
Figura 2 - Esquema demonstrativo de <i>Caenorhabditis elegans</i> .	12
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i> .	14
Figura 4 - Esquema representativo dos cinco estágios pelos quais os patógenos causadores de infecções em animais evoluem para causar doenças restritas aos humanos.	17
Figura 5 - Gel de PFGE das amostras brasileiras de <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> classificadas no subclone B ₂	19
Figura 6 - Esquema representativo dos fenótipos de resistência e sensibilidade à eritromicina e clindamicina em SDSE.	23
Figura 7 - Esquema de ensaio de escolha binária com nematoides treinados, exposto a duas diferentes cepas de SDSE.	37
Figura 8 - Esquema de ensaio de escolha binária com vermes não treinados e vermes treinados, expostos a cepa controle de <i>E. coli</i> OP50 e a uma cepa de SDSE.	37
Figura 9 - Percentagem de adesão e invasão de SDSE de origem humana e equina às células 16HBE14o-.	41
Figura 10 - Curva de sobrevivência de <i>C. elegans</i> frente a amostras de <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> .	43
Figura 11 - Curva de sobrevivência de <i>C. elegans</i> na presença de N-acetilcisteína (NAC) frente a amostras de SDSE.	44
Figura 12 - Curva de sobrevivência de <i>C. elegans</i> na presença de butionina sulfoximina (BSO) frente a amostras de SDSE.	45
Figura 13 - Microscopia óptica de <i>C. elegans</i> crescidos na presença da cepa controle <i>E. coli</i> OP50.	46
Figura 14 - Microscopia óptica de <i>C. elegans</i> crescidos na presença de SDSE isolada de hospedeiro humano (amostra 81-681).	47
Figura 15 - Microscopia óptica de <i>C. elegans</i> crescidos na presença de SDSE isolada de hospedeiro equino (84-030).	48
Figura 16 - Ensaio de escolha binária de <i>C. elegans</i> entre amostras de <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> isoladas de humano (81-681) ou equino (84-030) e <i>E. coli</i> OP50.	49
Figura 17 - Ensaio de escolha binária de <i>C. elegans</i> entre amostras de <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> isoladas de humano (81-681) e <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> isoladas de equinos (84-030).	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras de <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> utilizadas nesse estudo.	21
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados para detecção de genes de resistência por reação em cadeia da polimerase.	24
Tabela 3 - Conteúdos utilizados na reação em cadeia da polimerase para pesquisa de genes de resistência.	25
Tabela 4 - Genes associados a fatores de virulência em <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> avaliados por reação de PCR	28
Tabela 5 - Fenótipo de resistência e perfil de susceptibilidade das amostras de SDSE quanto a susceptibilidade à penicilina, clindamicina e eritromicina.	38
Tabela 6 - Pesquisa nas amostras de SDSE de genes envolvidos com a resistência aos macrolídeos e /ou lincosaminas.	38
Tabela 7 - Genes de virulência nas amostras de SDSE de origem humana e equina.	40
Tabela 8 - Avaliação da produção de biofilme por SDSE isolados de humanos e equinos.	41
Tabela 9 - Ensaio de <i>killing</i> de <i>C. elegans</i> frente a amostras de SDSE de origem humana e bovina.	42
Tabela 10 - Ensaio de <i>killing</i> de <i>C. elegans</i> frente amostras de SDSE na presença de N-acetilcisteína (NAC).	44
Tabela 11 - Ensaio de <i>killing</i> de <i>C. elegans</i> frente a amostras de SDSE na presença de butionina sulfoximina (BSO).	45

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Streptococcus</i> spp.....	1
1.2 <i>Streptococcus</i> dos grupos C de Lancefield.....	4
1.3 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	5
1.3.1 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> como agente causal de infecção.....	6
1.3.2 Fatores de virulência.....	7
1.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo experimental.....	11
1.5 Zoonoses.....	16
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Amostras bacterianas de <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	21
4.2 Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	21
4.3 Tipagem <i>emm</i>	25
4.4 Pesquisa de genes de virulência.....	26
4.5 Avaliação da produção de biofilme.....	30
4.6 Adesão e invasão às células 16HBE14o-.....	30
4.7 Estudos com <i>Caenorhabditis elegans</i>	32
4.7.1 Cultivo de <i>Caenorhabditis elegans</i>	32
4.7.2 Sincronização de <i>Caenorhabditis elegans</i>	32
4.7.3 Ensaio de sobrevivência dos nematoides.....	33
4.7.4 Ensaio de sobrevivência na presença de N-acetilcisteína (NAC) ou butionina sulfoximina (BSO).....	34
4.7.5 Microscopia ótica de Contraste de Interferência Diferencial (CID) de <i>C. elegans</i> mantido na presença de SDSE.....	35
4.7.6 Teste de escolha binária.....	35
5 RESULTADOS	38
5.1 Susceptibilidade aos antimicrobianos e pesquisa de genes envolvidos com fenótipos de resistência.....	38
5.2 Tipagem <i>emm</i> e pesquisa de genes de virulência através do método de reação em cadeia da polimerase.....	39
5.3 Capacidade das amostras de SDSE de formar biofilme.....	40
5.4 Adesão e invasão às células 16HBE14o-.....	41
5.5 Sobrevivência de <i>C. elegans</i> frente a amostras de SDSE isoladas de humanos e equinos.....	42
5.6 Sobrevivência de <i>C. elegans</i> frente a SDSE isoladas de humanos e equinos na presença de N-acetilcisteína (NAC) e de butionina sulfoximina (BSO).....	43
5.7 Microscopia ótica de Contraste de Interferência Diferencial (CID) de <i>C. elegans</i> mantido na presença de SDSE.....	46
5.8 Preferência olfativa de <i>Caenorhabditis elegans</i>	48
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Streptococcus* spp.

Em 1674, Antony Van Leeuwenhoek observou pela primeira vez os microrganismos presentes em uma amostra da sua microbiota oral através de um microscópio primitivo de autoria própria (Van Leeuwenhoek, 1674 *apud* Dobell, 1932). Tal fato deu início a Era Dourada da Microbiologia, período em que ocorreram descobertas de diversos agentes etiológicos de infecções. Dentre esses, os microrganismos do gênero *Streptococcus*, pertencentes à família *Streptococcaceae*, que englobam cerca de 160 espécies e 29 subespécies (Ferretti e Köhler, 2006; LPSN, 2021).

Os microrganismos pertencentes a esse gênero bacteriano são comumente encontrados colonizando a microbiota humana e animal, principalmente nariz, faringe, trato genital e gastrointestinal (Spratt *et al.*, 2003). Porém, *Streptococcus* também estão entre as principais causas de infecções bacterianas no mundo e atingem desde neonatos até idosos (Dermer *et al.*, 2004), estando a espécie *Streptococcus pyogenes* entre as dez principais causas de morbidade e mortalidade por doenças infecciosas (Ralph e Carapetis, 2013). As espécies desse gênero podem causar desde infecções brandas, como otite média e faringite, a complicações mais sérias, como infecções ósseas, articulares, de pele e de tecidos moles, escarlatina, sepse, síndrome do choque tóxico, meningite, pneumonia, fascite necrosante, dentre outros. Sendo *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* capazes de desencadear também sequelas pós-estreptocócicas, como febre reumática e glomerulonefrite (Carapetis *et al.*, 2005; Ralph e Carapetis, 2013; <https://www.cdc.gov/groupbstrep/about/infection.html>, acesso em 02/03/2020).

Streptococcus trata-se de um gênero que envolve microrganismos nutricionalmente exigentes e complexos que, por conta disso, devem ser semeados em meios de cultura sólidos acrescidos de sangue ou soro. Em sua grande maioria são microrganismos anaeróbios facultativos, porém algumas espécies apresentam crescimento capnofílico, ou seja, apenas se desenvolvem em atmosferas suplementadas com 5% de CO₂. O gênero se apresenta como cocos gram-positivos ordenados em pares ou em cadeias, sendo essas curtas, quando os microrganismos são semeados em meios de cultura sólidos, ou longas, quando semeados em meios líquidos. Tais microrganismos não são dotados de motilidade, não são formadores de esporos e são desprovidos das enzimas

oxidase e catalase, sendo esta última fundamental para diferenciação com o gênero *Staphylococcus* (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2017).

Em 1903, trabalhos de Schottmuller e, posteriormente, de Rosenow propuseram que determinadas espécies de *Streptococcus* apresentavam diferentes colorações ao redor de suas colônias quando semeadas em meio suplementados com sangue, com base em seu padrão hemolítico (Ruediger, 1906). Atualmente, o padrão hemolítico ainda é uma das características fenotípicas primordiais para iniciar a identificação das espécies deste gênero. Assim, as amostras classificadas como β -hemolíticas são capazes de ocasionar hemólise total no ágar suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro, α -hemolíticas - as que promovem hemólise parcial, e γ -hemolíticas - as que não realizam hemólise (Facklam, 2002).

Em 1933, os estudos de Rebeca Lancefield levaram ao desenvolvimento de uma técnica sorológica para classificação e diferenciação de espécies de *Streptococcus*. Essas espécies apresentam antígenos grupo-específicos (carboidrato C), que são polissacarídeos presentes na parede celular, que se diferenciam quimicamente e podem classificá-las em grupos sorológicos de Lancefield, que vão de A-H e de K-V. O antígeno grupo-específico nos grupos D e N é o ácido teicóico e no grupo H, o ácido lipoteicóico, constituindo exceções (Lancefield, 1933). A grande maioria das espécies α -hemolíticas e γ -hemolíticas de *Streptococcus* não apresentam o antígeno grupo-específico na composição de sua parede celular, impossibilitando sua classificação em um dos grupos sorológicos de Lancefield. Em vista disso, tais microrganismos devem ser identificados por uma bateria de testes bioquímicos. A identificação posterior da(s) espécie(s) contidas em cada grupo de Lancefield também pode ser realizada através de testes bioquímicos.

Em 1937, Sherman propôs uma nova classificação, baseada essencialmente nos padrões hemolíticos e nos grupos sorológicos de Lancefield. Tal feito dividiu o gênero em piogênicos que, em sua grande maioria, era composto por espécies β -hemolíticas isoladas tanto de humanos quanto de outros animais, e víridans, que englobava espécies essencialmente α -hemolíticas (Sherman, 1937 *apud* Richards *et al.*, 2014). Subsequentemente, em 1995, os *Streptococcus* foram classificados com base no rRNA 16S em seis novos grupos, sendo que o grupo piogênico foi mantido, mas o víridans foi subdividido em cinco grupos: *anginosus*, *mitis*, *salivarius*, *bovis* e *mutans* (Kawamura *et al.*, 1995).

Atualmente, com o avanço da biologia molecular, outras técnicas de classificação molecular têm sido incorporadas. Inicialmente, para tipificar *S. pyogenes*, foi

desenvolvida a tipagem da proteína M, por reação antígeno-anticorpo. Essa é uma importante técnica de classificação que também pode ser utilizada em *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Atualmente, para a determinação do tipo *emm*, os últimos 180 nucleotídeos da porção N terminal (região hipervariável) do gene *emm*, que codifica para a proteína M, são sequenciados e comparados no banco de dados fornecido pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC *Streptococcus* Laboratory, <https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/emm-background.html>, acessado em 15/12/2019). Outro método frequentemente utilizado para estudos genéticos e epidemiológicos de espécies de *Streptococcus* é a técnica de *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE), que se baseia na mobilidade de enzimas intracelulares em uma corrida de eletroforese. Porém, devido ao fato de o código genético ser degenerado, diversas alterações nucleotídicas não acarretam alteração na carga eletroforética do aminoácido e, conseqüentemente, não alteram a proteína a ser formada. Por isso, o MLEE apresenta uma capacidade limitada para avaliar alterações microevolutivas (Tahmourespour *et al.*, 2013; <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/multilocus-enzyme-electrophoresis> acessado em 02/03/2020). Sendo assim, a técnica de *multilocus sequence typing* (MLST) é a mais utilizada. Essa se assemelha ao MLEE, porém distancia-se ao diferenciar alelos em diferentes *locus* de genes *housekeeping*. Estes são genes conservados nas células procarióticas. Dessa forma, são selecionados para cada espécie sete genes *housekeeping*, que são amplificados e, posteriormente, sequenciados. Os resultados dos sequenciamentos podem ser comparados em um banco de dados fornecido pelo site PubMLST, e, então, as amostras classificadas em um *sequence type* (ST). Esses STs podem ou não se agrupar formando um complexo clonal (CC) (www.pubmlst.org/general.shtml, acessado em 02/03/2020).

O MALDI-TOF MS é uma outra importante ferramenta que também tem sido utilizada para identificação e estudos epidemiológicos (Anjos, 2019). Os peptídeos presentes nos microrganismos são ionizados através de uma matriz de ácido orgânico. Ao ser submetida no aparelho, um laser incide sobre esses peptídeos protonados, realizando sua volatilização. Assim, os peptídeos são acelerados em um campo eletrostático, passando por um tubo de vácuo e, no fim do percurso, as moléculas se chocam com um detector de íons, gerando espectros que são comparados com outros de microrganismos já devidamente identificados, presentes no banco de dados do MALDI-TOF MS. Tal comparação fornecerá um *score*, que varia de 0 a 3,0. Quanto maior o *score*, maior será a confiabilidade da identificação (Wieser *et al.*, 2012). É importante ressaltar que estudos

recentes utilizando 255 amostras de *Streptococcus*, pertencentes ao grupo C e G de Lancefield, mostraram uma maior eficácia do MALDI-TOF MS na identificação de microrganismos pertencentes a tal gênero bacteriano quando comparados aos métodos convencionais, se um banco de dados satisfatório estiver presente no aparelho (Anjos, 2019).

Em síntese, pode-se dizer que a diferenciação das espécies e subespécies pertencentes ao gênero *Streptococcus* é extremamente complexa e, devido a isso, devem sempre ser observados aspectos em conjunto, nunca isolados, pois os métodos de identificação se complementam.

1.2. *Streptococcus* do grupo sorológico C de Lancefield

Inicialmente, as espécies de *Streptococcus* classificadas no grupo sorológico C de Lancefield (EGC) eram descritas como parte da microbiota normal da pele, da nasofaringe e do trato genital de humanos e outros animais, sendo incomum o relato de infecções graves como bacteremia, endocardite e meningite em humanos (Ghoneim e Cooke, 1980; Berenguer *et al.*, 1992). Esses microrganismos eram descritos, primordialmente, como patógenos comuns em animais, tais quais porquinhos-da-índia, bovinos, suínos, equinos, entre outros (Efstratiou, 1989; Salata *et al.*, 1989).

Todavia, nas últimas décadas, relatos de infecções causadas por algumas espécies deste grupo de patógenos em humanos tornaram-se mais frequentes, crescendo também os relatos de infecções invasivas, principalmente em idosos e naqueles que apresentam condições preexistentes, como abuso de álcool, diabetes *mellitus*, malignidades e doenças vasculares (Ekelund *et al.*, 2005).

As espécies de EGC são assim classificadas por possuírem o carboidrato C grupo-específico formado por uma cadeia central de ramnose, na qual se ligam resíduos de N-acetilgalactosamina (Fung, Wicher e McCarty, 1982). A classificação taxonômica deste grupo de microrganismos tem se mostrado uma questão complexa e, em consequência, tem sofrido muita alteração. Atualmente, o grupo C de Lancefield engloba as seguintes espécies: *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equi*, o grupo de *Streptococcus anginosus* (*Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* e *Streptococcus anginosus*), *Streptococcus phocae*, *Streptococcus marimammalium*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus parasanguinis*. É importante ressaltar que a espécie *S. equi* é dividida em três subespécies: *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Streptococcus equi* subsp.

zooepidemicus e *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum*. Por outro lado, a espécie *S. dysgalactiae* se divide em duas subespécies: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, sendo o último um patógeno emergente que tem sido cada vez mais isolado em humanos, causando uma gama de infecções que variam de assintomáticas à invasivas (Köhler, 2007; Silva *et al.*, 2015; Baracco, 2019; Turner, Bubba e Efstratiou, 2019).

1.3. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

Em 1940, Frost e Engelbrecht nomearam a espécie bacteriana *Streptococcus equisimilis*. Tal espécie, a princípio, era isolada de animais domésticos e frequentemente encontrada em humanos, principalmente como microbiota na cavidade nasal, garganta, vagina e pele. Em meados de 1950, foi descrito que um microrganismo, já conhecido como *Streptococcus dysgalactiae* e comumente isolados de bovinos, possuía um perfil de fermentação de carboidratos idêntico a *S. equisimilis*, sendo a distinção entre eles realizada pela ausência de β -hemólise na espécie oriunda de animal. Além disso, em 1984, estudos de hibridização de DNA revelaram que essas duas espécies eram geneticamente relacionadas. Tais fatos sugeriram que esses dois grupos de microrganismos pertenciam de fato a mesma espécie, mas possuíam diferenças e, por isso, foram divididas em duas subespécies, sendo assim definidas como *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (SDSD) e *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) (Farrow e Collins, 1984). Em 1996, Vandamme e colaboradores sugeriram a diferenciação entre essas duas subespécies de *S. dysgalactiae*, sendo SDSD definida como amostras isoladas de animais e SDSE aquelas isoladas de humanos. Posteriormente, em 1998, Vieira sugeriu que a distinção fosse realizada com base no padrão hemolítico, sendo *S. dysgalactiae* γ -hemolíticos ou α -hemolíticos classificados como SDSD, e *S. dysgalactiae* β -hemolíticos como SDSE (Vieira *et al.*, 1998).

Porém, com o passar dos anos, muitas exceções a essa subdivisão proposta por Vandamme e Vieira têm sido reportadas, conflitando com as características hemolíticas e os hospedeiros de isolamento (Ciszewski, Zegarski, e Szewczyk, 2016). Tais incompatibilidades relacionadas a classificação talvez possam ser explicadas devido a evolução das espécies através da transferência horizontal de genes de outros *Streptococcus* β -hemolíticos, em particular a transferência que tem sido relatada entre *S. pyogenes* e SDSE. Esses microrganismos coincidem, inclusive, no espectro de infecções

que causam e nas propriedades de virulência, estando estritamente relacionados (Rato *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2011; Jensen e Kilian, 2012).

Quanto a sorologia de Lancefield, amostras de SDSE pertencem majoritariamente ao grupo G de Lancefield. Porém, uma quantidade significativa de amostras apresenta o carboidrato do grupo C e, mais raramente, tem sido relatadas amostras que carregam o carboidrato dos grupos A e L (Vieira *et al.*, 1998; Brandt e Spellerberg, 2009). É importante ressaltar que apenas o carboidrato grupo-específico diferencia os SDSE dos grupos C e G (Facklam, 2002; Davies *et al.*, 2007; McMillan *et al.*, 2010).

1.3.1 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* como agente causal de infecção

Como já relatamos, inicialmente *S. equisimilis*, antes da mudança da nomenclatura para SDSE, era um patógeno de importância veterinária, assim como outras espécies pertencentes ao gênero *Streptococcus*, tais quais *Streptococcus canis*, *S. equi* subespécie *zooepidemicus* e *S. equi* subespécie *equi* (Köhler, 2007). Era encontrado na microbiota de bovinos, suínos, equinos, cães, dentre outros, e responsável por diversas infecções (Bert *et al.*, 1997; Laus *et al.*, 2007; Houszka *et al.*, 2014). Em animais, algumas das infecções causadas por *S. equisimilis* eram: mastite bovina, pneumonia, endometrite, endocardite, sepsis, meningite e consequências como o aborto (Bridge e Sneath, 1983; Harrington *et al.*, 2000).

Acredita-se que a transferência horizontal de genes, codificantes para fatores de virulência de *Streptococcus* comuns em humanos para cepas de *S. dysgalactiae*, comuns em animais, permitiram a colonização de SDSE em seres humanos, tornando-os microrganismos comensais (Salata *et al.*, 1989; Ciszewski e Szewczyk, 2017). Porém, mesmo estando presentes na microbiota humana, SDSE se apresentaram capazes de causar diversos quadros de infecções no homem, inclusive invasivas e graves (Tartof *et al.*, 2011).

No final de 1970 e no início de 1980, tais microrganismos emergiram e tornaram-se importantes patógenos humanos (Efstratiou, 1997). SDSE é responsável por mais de 80% das infecções invasivas causadas por *Streptococcus* β -hemolíticos de outros grupos além de A e B no mundo (Broyles *et al.*, 2009). Na Noruega, a ocorrência de infecções invasivas por *Streptococcus* dos grupos C e G aumentou cerca de 4 vezes entre 1999 e 2013 (Oppegaard, Mylvaganam e Kittang, 2015). Além disso, um estudo epidemiológico

no Japão de infecções por *Streptococcus*, que foi realizado entre maio de 2013 e abril de 2018, identificou SDSE em 64% das 88 amostras coletadas de pacientes que apresentavam infecções invasivas (Ishihar *et al.*, 2020). Do mesmo modo, uma outra vigilância realizada na França de janeiro de 2006 a dezembro de 2010, observou 109 SDSE isolados de infecções invasivas dentre 181 pacientes analisados (Loubinoux *et al.*, 2013).

Deste modo, baseados na literatura podemos classificar o SDSE como importante patógeno humano. Seu modo de transmissão, na grande maioria das infecções, se dá por contato pessoa a pessoa, acometendo principalmente pacientes com idades mais avançadas e com condições subjacentes graves, como diabetes, disfunção hepática, renal, dentre outras (Sunaoshi *et al.*, 2010).

Normalmente SDSE causam infecções na faringe e na pele, mas também podem alcançar a corrente sanguínea e, através dela, se disseminar para outras regiões do corpo causando infecções invasivas (definidas como infecções onde temos o isolamento de SDSE em sítio normalmente estéril, como o sangue e o líquido cefalorraquidiano) (Takahashi, Ubukata e Watanabe, 2011). Dentre as graves infecções que causam, temos pneumonia, sepse, peritonite, endocardite, meningite, artrite séptica, síndrome do choque tóxico estreptocócico, fascite necrosante, além de sequelas não supurativas pós-estreptocócicas, tais como glomerulonefrite e febre reumática (Dierksen e Tagg, 2000; Haidan *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2007; Brandt e Spellerberg, 2009; Takahashi, Ubukata e Watanabe, 2011; Bruun *et al.*, 2013).

1.3.2 Fatores de virulência de SDSE

Para que sejam capazes de causar as diversas infecções citadas, os SDSE precisam ser capazes de expressar diversos fatores de virulência. Estes podem ser divididos em três conjuntos, sendo: aqueles que auxiliam na adesão, invasão e evasão do sistema imunológico do hospedeiro; toxinas e proteases; e fatores regulatórios que controlam a expressão desses produtos (Takahashi *et al.*, 2011). Devido ao fato dos SDSE serem muito relacionados geneticamente aos *S. pyogenes* (Shimomura *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2016), ambos apresentam inúmeros fatores de virulência em comum, tais como: proteína M, estreptolisina O, estreptolisina S, estreptoquinase, hialuronidase, C5a peptidase, dentre outros (Kalia e Bessen, 2004; Matsue *et al.*, 2020).

Alguns fatores que auxiliam na adesão celular e na evasão do sistema imunológico incluem a proteína M, um importante fator de virulência codificado pelo gene *emm*, estreptoquinase A (*ska*), C5a peptidase (*scpA*), hialuronidase (*hyl*) e proteína de ligação à fibronectina (*fbp*). Enquanto a estreptolisina S (*sagA*) e a estreptolisina O (*slo*) são exemplos do grupo das toxinas ou proteases (Humar *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2011). Dentre os fatores regulatórios temos o *multiple gene regulator of GAS (mga)*, CovR (*covR*)/CovS (*covS*), dentre alguns outros. O gene *mga* é um importante regulador na fase exponencial, regulando de forma positiva vários fatores de virulência, primordialmente, a proteína M. No entanto, esse gene pode ser regulado de diversas outras formas, como, por exemplo, pelo sistema de fosfotransferase dependente de fosfoenolpiruvato (PTS). Além disso, o *mga* tem participação na expressão da proteína de controle de catabólicos A (CcpA), que por sua vez atua na repressão de alguns fatores de virulência e genes envolvidos com o metabolismo (Geyer e Schmidt, 2000; Menschner *et al.*, 2019).

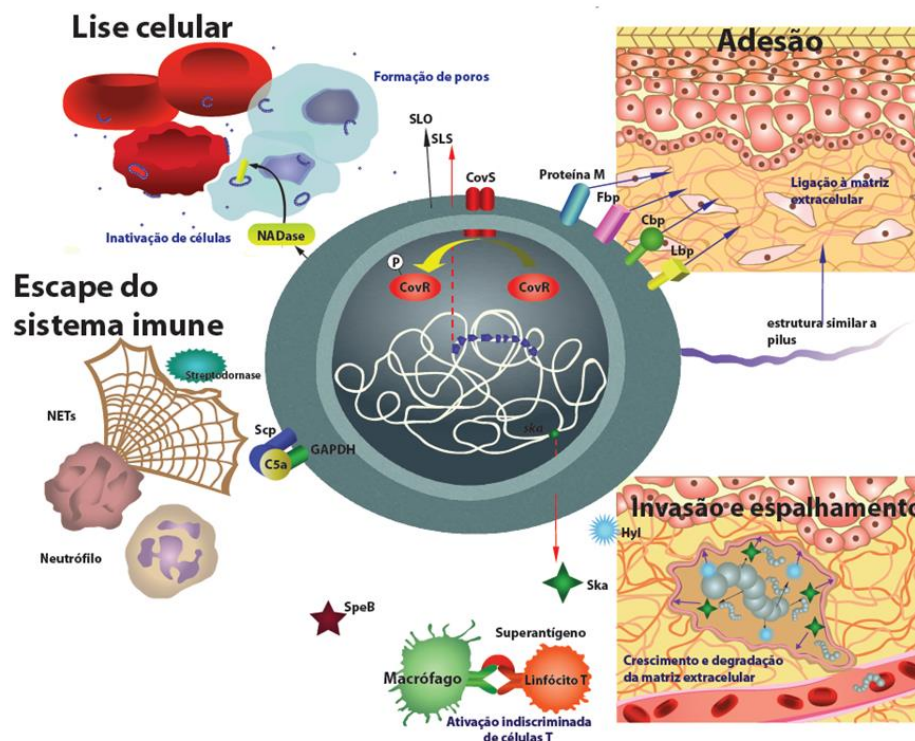


Figura 1 - Fatores de virulência putativos em SDSE e suas respectivas funções. Adaptado de Shimomura *et al.*, 2011 por Mariana Vinagre.

A proteína M, que está localizada na superfície celular de *S. pyogenes* e de SDSE, foi descrita pela primeira vez por Rebecca Lancefield, em 1928. Desde então, tem ganhado grande visibilidade por se tratar de um dos fatores de virulência mais

importantes, devido a sua função na aderência e invasão e sua propriedade antifagocítica (Lancefield, 1928; McNeilly e McMilan, 2014). Essa proteína é dividida em duas porções: a C-terminal, que é a porção ancorada na membrana citoplasmática com fração conservada, e a N-terminal, que possui uma região de hipervariabilidade e se estende acima da superfície celular (Fischetti, 1989). A proteína em questão tem a função de auxiliar na adesão e inibir a opsonização, através da capacidade de atuar como ligante em diversas matrizes extracelulares e proteínas sintetizadas pelo sistema imunológico, como a fibronectina, fibrinogênio, albumina, proteína de ligação ao colágeno, anticorpos e C4b (Horstmann *et al.*, 1988; Bessen *et al.*, 1989; Cunningham, 2000; Dinkla *et al.*, 2003). Além disso, também é capaz de impedir a ação do sistema complemento, pois ao se ligar ao fibrinogênio das células humanas acaba, conseqüentemente, impedindo a ligação de C3b (Horstmann *et al.*, 1992; Carlsson, Sandin e Lindahl, 2005). Em adição, algumas sequelas não supurativas, como febre reumática e a glomerulonefrite, estão relacionadas à proteína M, devido à forte semelhança de regiões da proteína com moléculas presentes no tecido conjuntivo e músculo cardíaco ou no glomérulo renal de humanos, acarretando uma importante reação cruzada que pode levar ao desencadeamento dessas sequelas pós-estreptocócicas (Metzgar e Zampolli, 2011). Outras proteínas também estão envolvidas com o processo de adesão à célula hospedeira, como as proteínas ligadoras de fibronectina (Fbp), colágeno (Cbp), laminina (Lbp) e plasminogênio (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; GAPDH) (Creti *et al.*, 2007; Nobbs, Lamont e Jenkinson, 2009).

Após a adesão bacteriana, os microrganismos podem se acumular e formarem uma estrutura complexa sobre superfícies, o biofilme. Tal fenótipo de virulência serve como uma proteção bacteriana contra substâncias externas, como os antibióticos, favorecendo sua sobrevivência e proliferações até mesmo em ambientes adversos (Hall-Stoodley, Costerton e Stoodley, 2004; Manetti *et al.*, 2007). Diversos microrganismos formam essa matriz durante infecções, principalmente aqueles capazes de realizarem infecções agudas e crônicas (Rantala e Touhinen., 2014; Alves-Barroco *et al.*, 2019). A produção dessa matriz por espécies de *Streptococcus* é muito bem estabelecida na literatura (Carvalho *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2012; Corcuera *et al.*, 2013). Porém, apenas em 2015 foi constatada por Genteluci e colaboradores a capacidade de SDSE em produzir biofilme, o que reforça a capacidade desses microrganismos em causar infecções invasivas, agudas e crônicas (Genteluci *et al.*, 2015).

Infecções invasivas por SDSE têm sido associadas à produção de estreptoquinase, que possui a habilidade de clivar o plasminogênio liberando a protease plasmina, a qual

cliva a fibrina e o fibrinogênio, podendo assim lisar coágulos sanguíneos e facilitar a disseminação do SDSE nos tecidos. Além da estreptoquinase outra proteína que contribui para a evasão do sistema imune é a C5a peptidase, que é uma proteína ancorada à parede celular e capaz de clivar o componente C5a do sistema complemento no seu sítio de ligação (Cunningham, 2000). Consequentemente, ambas impedem o recrutamento de neutrófilos e outras células fagocíticas para o sítio infeccioso (Yinduo *et al.*, 1996; Ikebe *et al.*, 2004). Outro fator de virulência relacionado ao recrutamento de neutrófilos é a estreptodornase D (*spd1*), uma DNase capaz de clivar as NETs secretadas pelos neutrófilos. As NETs são redes extracelulares formadas por DNA, histonas, proteases granulares e peptídeos antimicrobianos, que tem como objetivo aprisionar o agente etiológico e, subsequentemente, eliminá-lo (Cole *et al.*, 2011).

A hialuronidase também é outro importante fator de virulência dos SDSE, utilizada para modulação da cápsula protetora (Shimomura *et al.*, 2011). Da mesma forma que nos *S. pyogenes*, SDSE estão envolvidos por uma cápsula de ácido hialurônico, produzida na fase de crescimento exponencial. Tal cápsula é composta por um polímero linear, de alta massa molecular, o β -1,3-N-acetilglucosamina glucurônico, produzido por enzimas codificadas pelo operon *hasABC*. Tal polímero é idêntico ao presente no tecido conjuntivo humano (Crater, 1995). Devido à grande semelhança do polissacarídeo bacteriano com o presente nas células hospedeiras humanas, a cápsula acaba por conferir as células bacterianas uma maior facilidade de evasão à resposta imunológica e uma maior resistência à fagocitose. Além disso, a capacidade da cápsula se ligar ao CD44 presente nas células epiteliais representa um importante fator de aderência na faringe (Schrager *et al.*, 1998; Cunningham, 2000).

Quanto ao processo de invasão, as integrinas possuem papel fundamental. As integrinas são glicoproteínas do hospedeiro que atuam na promoção da fagocitose do microrganismo por células não profissionais, o que acaba preservando o patógeno contra defesas imunológicas e alguns antimicrobianos, aumentando sua sobrevivência (Tarone *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2003; Shimomura *et al.*, 2011). A proteína M tem importante atuação no processo de invasão das células hospedeiras. Para tal, ela ativa diretamente ou indiretamente a via de fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-K), que por sua vez gera produtos lipídicos fosforilados, os fosfoinosítídeos, os quais funcionam como mensageiros secundários que recrutam e ativam diversas proteínas de sinalização, o que leva a uma cascata acarretando à polimerização da actina e, subsequentemente, à invasão das células por *Streptococcus* (Purushothaman, Wang e Cleary, 2003).

Em adição, através da formação de poros membranares, a estreptolisina O será responsável pelo escape da célula bacteriana do endossoma e, após esse escape, o patógeno irá invadir outras células hospedeiras. Nesse momento, a NADase atuará acelerando o processo de apoptose. A estreptolisina S também terá participação no processo de lise celular, sendo responsável pela β -hemólise em placas de ágar sangue e, juntamente com a estreptoquinase, a C5a peptidase e aos superantígenos, colaboram nas infecções invasivas por SDSE (Nobbs, Lamont e Jenkinson, 2009; Abdelsalam, Chen e Yoshida, 2010).

Superantígenos são moléculas que não são previamente processadas pela célula apresentadora de antígeno. Essas moléculas se ligam diretamente e simultaneamente ao complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe II e ao TCR, receptor do linfócito T. Tal ligação ativa de forma inespecífica um número massivo de células T, o que ocasiona exacerbação da produção de interleucinas e citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral e o interferon gama, levando à febre nos casos mais leves e, nos mais graves, ao choque tóxico (Anand *et al.*, 2012). Grande parte dos superantígenos são exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (Spe), sendo SpeA, SpeC, SmeZ, SpeF, SpeI, SpeM, SpeH e SpeG já relatados em SDSE (Hashikawa, 2004; Behera, 2014).

1.4. *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental

Na segunda metade do século XX, especificamente em 1965, Sydney Brenner descreveu um novo modelo experimental para pesquisas envolvendo organismos multicelulares, os *Caenorhabditis elegans*. Atualmente, devido ao fato de possuir muitos componentes importantes relacionados ao metabolismo, estresse oxidativo e vias de sinalização de insulina, esse nematoide passou a ser utilizado para estudos de uma gigantesca variedade de processos celulares em células eucarióticas, tais como: apoptose, sinalização celular, ciclo celular, regulação de genes, metabolismo, envelhecimento e determinação sexual (Riddle *et al.* 1997). Tanto na biologia básica quanto em áreas clínicas foram feitas diversas descobertas importantes com auxílio desse animal, como na doença de Alzheimer, na diabetes tipo 2 e na depressão (Kaletta e Hengartner, 2006), incluindo também um estudo vencedor do prêmio Nobel de medicina e fisiologia em 2005, onde a classe dos microRNAs foi descrita por Andrew Fire (Fire *et al.*, 1998). Após 1990, com o sequenciamento do genoma total do helminto em questão, foi revelado que grande parte dos genes e vias de doenças humanas estão presentes em *C. elegans*, sendo

constatado, então, uma homologia de 60% a 80% entre o genoma do nematoide e de mamíferos (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

Esses nematoides de vida livre, com no máximo 1 milímetro de comprimento, são capazes de realizar a postura de até 300 ovos. Os vermes são extremamente sofisticados, apresentando músculos, hipoderme, intestino, sistema reprodutor, glândulas e sistema nervoso (Figura 2). Além disso, apresentam dimorfismo sexual, onde 99,9% da população é composta por hermafroditas (XX) e 0,01% composta por machos (XO) (Bargmann, 1998; Kaletta e Hengartner, 2006). As vantagens oferecidas por esse modelo animal são: apresentam ciclo de vida curto de 3 dias, podem ser cultivados em placas de Petri na presença de *Escherichia coli* como alimento, possuem fácil visualização em microscópio óptico, etc (Blaxter, 2011).

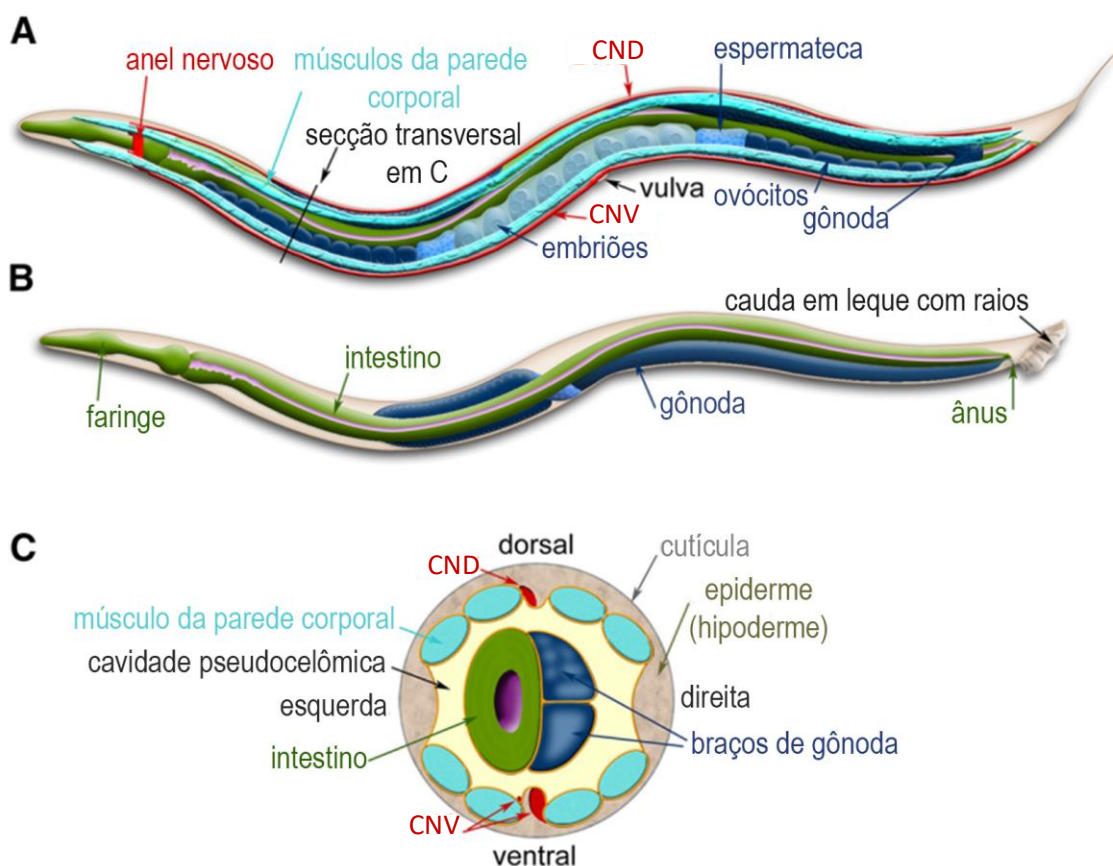


Figura 2 - Esquema demonstrativo de *Caenorhabditis elegans*. Principais características anatômicas do indivíduo hermafrodita (A) e do macho (B). (A) O cordão nervoso dorsal (CND) e o cordão nervoso ventral (CNV) percorrem o animal a partir do anel nervoso. Dois dos quatro quadrantes dos músculos da parede corporal são mostrados. (B) O sistema nervoso e os músculos são omitidos, revelando a faringe e o intestino. (C) Corte transversal da região anterior do hermafrodita mostrando os quatro quadrantes musculares circundados pela epiderme e cutícula com o intestino e gônada alojados na cavidade pseudocelômica. Imagens modificadas a partir das encontradas em www.wormatlas.org (Altun *et al.*, 2015). Adaptada por Thaís Tavares de Amorim.

O ciclo de vida do animal dura cerca de 3 dias, como citado anteriormente, e é formado por quatro estágios larvais (L1-L4) (Figura 3), o nematoide hermafrodita adulto, após ser fecundado ou se autofecundar, deposita os ovos no meio, os quais eclodem e dão origem a uma larva L1, que se desenvolve até o estágio L4. A variação de um estágio larval para outro é marcado pelo processo de muda, onde o nematoide substitui a cutícula antiga por uma recém-sintetizada. Entretanto, fatores externos como a quantidade de alimento e a temperatura, podem influenciar no tempo de vida do verme, mas ambas as condições ainda não se encontram bem compreendidas. Foi observado que a restrição calórica acaba aumentando o tempo de vida, todavia acarreta a diminuição da fecundidade, provavelmente devido ao fato de a reprodução perder importância em condições extremas, já que as larvas em estágio L1 terão pouquíssimas chances de sobrevivência. Um fator determinante da longevidade é a temperatura, pois *C. elegans* apresenta ciclo de vida mais longo em baixas temperaturas. Alguns estudos sugerem que as baixas temperaturas (20°C ou 15°C) diminuem a velocidade das reações químicas no nematoide e, por isso, retardam o envelhecimento (Lee e Kenyon, 2009; Back, Braeckman e Matthijssens, 2012; Xiao *et al.*, 2013). Finalmente, o estresse oxidativo também tem sido apontado como um fator limitante do ciclo de vida de *C. elegans* (Larsen, 1993; Finkel & Holbrook, 2000).

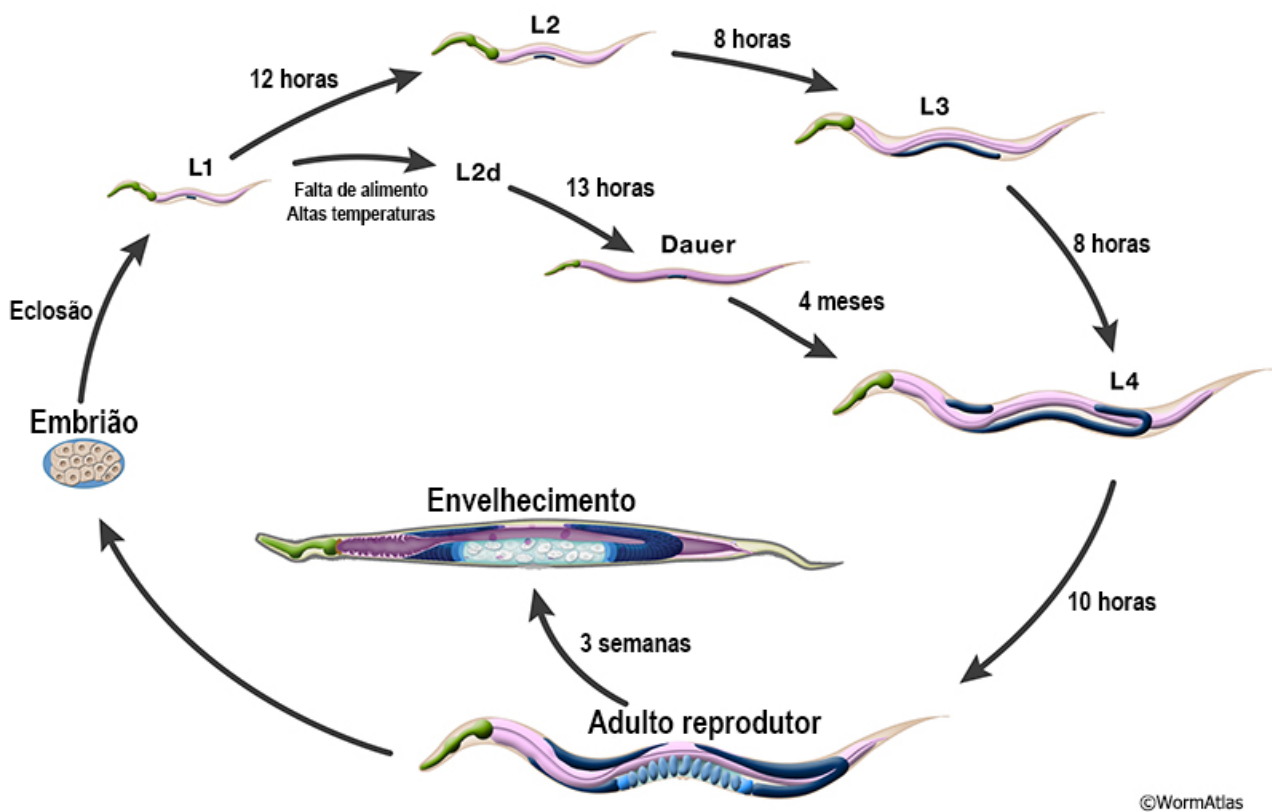


Figura 3 - Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*. Adaptado de WormAtlas, por Thaís Tavares de Amorim.

Tratando-se do gênero *Streptococcus*, *Streptococcus pneumoniae* foi uma das espécies pioneiras nos estudos com o nematoide. Esses estudos permitiram concluir que *S. pneumoniae* possui a habilidade de causar a morte do animal (Garsin *et al.*, 2001). Posteriormente, foi constatado que tal espécie bacteriana, do mesmo modo que *S. pyogenes*, é apta a causar a morte do nematoide pela ação de espécies reativas de oxigênio, especificamente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Jansen *et al.*, 2002). Em 2004, outro estudo utilizando algumas espécies de *Streptococcus*, incluindo 13 amostras do grupo C de Lancefield, observou, a partir de análise fotométrica utilizando a enzima peroxidase e vermelho de fenol como substrato, que existia uma relação proporcional entre a produção de peróxido de hidrogênio e a morte do nematoide (Bolm *et al.*, 2004). No entanto, o estudo de Menschner utilizando placas indicadoras com azul da Prússia para dosagem de H_2O_2 , detectou que apenas 5,4% das 611 amostras de *S. pyogenes* testadas produziam peróxido de hidrogênio à 37°C e que essa taxa aumentava para 16,4% quando as amostras foram incubadas a 20°C. Ademais, Menschner analisou a distribuição do gene *lctO* dentro da família *Streptococcaceae*. Tal gene é relacionado com a produção de peróxido de

hidrogênio e nesse estudo foi encontrado nas seguintes espécies: *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. iniae*, *S. anginosus*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. constellatus* subsp. *pharynais*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. porcinus*, *S. gordonii* (Menschner *et al.*, 2019).

A sugestão feita por Bolm e colaboradores (Bolm *et al.*, 2004) de que cepas de SDSE promoviam a morte do nematoide através da produção de peróxido de hidrogênio na verdade ainda necessita de mais estudos para ser confirmada. As reações bioquímicas que ocorrem nos organismos geram espécies reativas de oxigênio (ROS) através de redox, transferência de elétrons de uma espécie química para outra, nesse caso o O₂ (Halliwell, 1999). Todo esse processo gera a formação de um íon com carga negativa, o ânion superóxido (O₂⁻), mas também ocasiona a síntese de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de radicais do grupamento hidroxila (OH⁻). Basicamente, os ROS são moléculas que possuem oxigênio em sua composição, são extremamente reativas, instáveis e, ao colidirem com outras moléculas, são capazes de alterá-las. Dessa forma, em grandes quantidades podem causar danos celulares irreversíveis como danificar tecidos, organelas, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (Kinnula, Crapo e Raivio, 1995; Jomova *et al.*, 2017). Microrganismos são igualmente capazes de produzirem ROS e utilizam essa molécula principalmente na colonização de novos nichos para diminuir a competição (Pericone *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2007).

Em 2015, Martinez constatou que o tratamento do nematoide com glutatona (GSH) era eficiente para a proteção contra ROS. Porém, ao adicionar butionina sulfoxamina (BSO) no experimento, a produção de glutatona era interrompida e, conseqüentemente, a defesa do animal era desarmada (Martinez *et al.*, 2015). Do mesmo modo, um outro estudo foi realizado aprofundando sobre o efeito de N-acetilcisteína (NAC), um precursor de glutatona. O autor observou que o NAC aumentava a produção de glutatona, e assim o peróxido de hidrogênio era sequestrado, o que gerava um forte aumento da resistência ao estresse por *C. elegans* (Oh *et al.*, 2015).

Em 2020, Santos constatou a produção de peróxido de hidrogênio em apenas uma amostra de SDSE (0,9%) entre as 114 testadas. Em adição, foi estudada a expressão de genes relacionados à produção de espécies reativas de oxigênio (*sodA* e *nox*), e ainda os genes relacionados ao escape do sistema imune *ska* e *scpB* em amostras de SDSE recolhidas após interação com o *C. elegans*. O estudo observou um aumento na expressão de todos os quatro genes nas amostras do clone B testadas, quando comparada com a expressão *in vitro*. Dessa forma, Santos (2020) sugeriu que o mecanismo envolvido com a morte de *C. elegans* depende de múltiplos fatores de virulência e não apenas da

produção de espécies reativas de oxigênio, concluindo que o modelo é possível de ser utilizado para estudos envolvendo SDSE.

1.5. Zoonoses

As principais doenças infecciosas humanas das zonas temperadas supostamente surgiram, em sua grande maioria, de enfermidades a partir de animais silvestres e domésticos. Zoonoses são tidas como infecções naturalmente transmissíveis entre os animais e os seres humanos e representam uma ameaça à economia, à saúde e ao bem-estar da população (Diamond e Panosian, 2006). Portanto, devem ser monitoradas e estudadas. As zoonoses podem ser transmitidas por vários mecanismos, como: contato direto com animais ou materiais infectados por estes, mordidas e arranhões, transmissão por vetores artrópodes e consumo de alimentos contaminados (Chikeka e Dumler, 2015).

Em 2007, Wolfe sugeriu que a evolução da transmissão de doenças era dividida em 5 estágios, os quais levam ao surgimento das doenças humanas (Figura 4). O primeiro estágio é marcado por microrganismos presentes em animais, que não possuem a capacidade de ultrapassar a barreira interespecie e infectar humanos, por isso não são detectados nesse último hospedeiro, como por exemplo a maioria dos plasmódios causadores da malária. No segundo estágio, o patógeno ultrapassa a barreira interespecie e, por condições naturais, é capaz de infectar humanos (infecção primária), mas não há transmissão entre os hospedeiros humanos (infecção secundária), como por exemplo o bacilo antraz. O terceiro estágio ocorre quando os microrganismos conseguem alguns ciclos de transmissão entre humanos, mas esses ciclos não duram por muito tempo; um exemplo clássico é o vírus Ebola. No quarto estágio, a doença predomina em animais, mas tem um ciclo natural de transmissão primária e secundária em humanos. Esse estágio é dividido em 3 subestágios: a) o ciclo silvestre ainda é mais frequente do que a transmissão direta entre humanos; b) ambas as transmissões são igualmente frequentes; c) a transmissão entre humanos é a mais frequente. Por fim, o quinto estágio ocorre quando o patógeno se torna exclusivamente humano (Wolfe, Dunavan e Diamond, 2007).

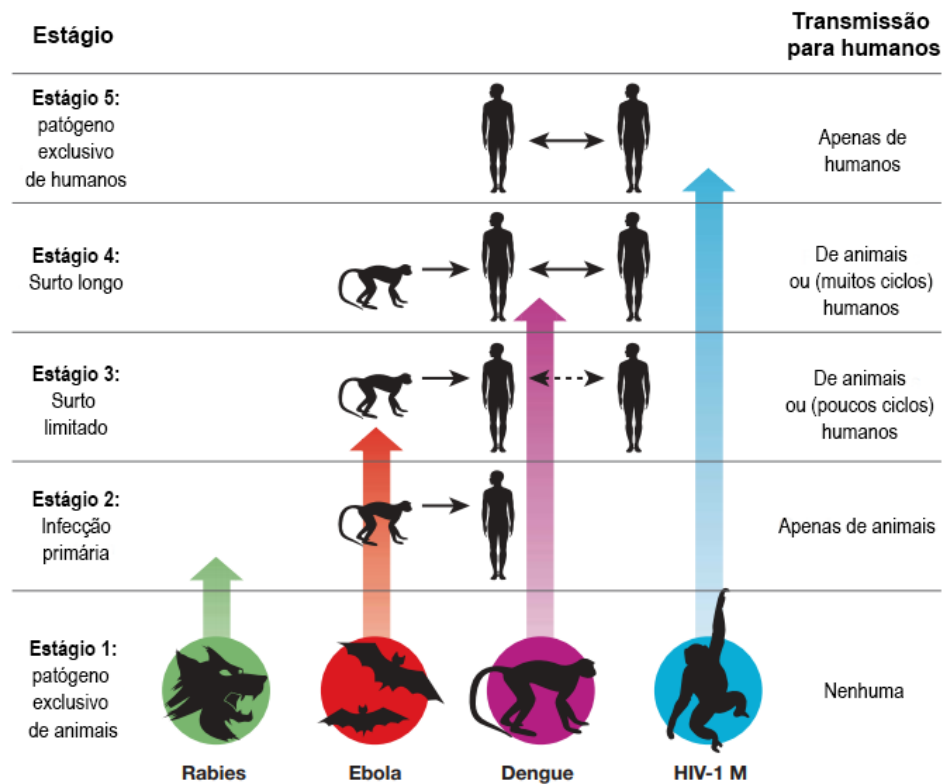


Figura 4 – Esquema representativo dos cinco estágios pelos quais os patógenos causadores de infecções em animais evoluem para causar doenças restritas aos humanos. Adaptado por Thaís Tavares de Amorim de Wolfe, Dunavan e Diamond, 2007.

A maioria dos patógenos de animais silvestres e domésticos não ultrapassam o primeiro estágio. A probabilidade de ocorrer a infecção interespecie aumenta de acordo com a abundância do hospedeiro natural, a morbidade da doença, frequência de oportunidades (encontros entre as espécies) e com a probabilidade de transmissão por evento de encontro. Além disso, a probabilidade da infecção de uma nova espécie também pode diminuir de acordo com o aumento da distância filogenética entre essas. Outros fatores que podem influenciar são: a gama taxonômica de hospedeiros que o agente microbiológico infecta, a capacidade do microrganismo em gerar variabilidade genética e sua capacidade de superar barreiras moleculares e imunológicas do hospedeiro (Taylor *et al.*, 2001; May, Gupta e McLean, 2001).

Podemos observar a atuação de todos esses fatores em muitas doenças, como: AIDS, Ebola, leptospirose, Covid-19, entre outras. Normalmente, os seres humanos possuem raros encontros com chimpanzés e a abundância de tais animais é muito baixa. Mesmo assim, devido a nossa estreita relação filogenética, inúmeras zoonoses partiram desses hospedeiros, como por exemplo, a AIDS. Muitas doenças humanas também foram adquiridas de ratos, já que, apesar da distância filogenética, temos muito contato com tal

animal, por ser uma praga amplamente disseminada pelo mundo (Wolfe, Dunavan e Diamond, 2007).

Os poucos patógenos que ultrapassam os estágios iniciais do processo evolutivo se estagnam no terceiro ou quarto estágio. Wolfe explica tal dificuldade em ultrapassar os diferentes estágios com base nos comportamentos humanos e dos demais animais que afetam diretamente a transmissão, como, por exemplo, animais mordem humanos, mas dificilmente humanos mordem outros humanos.

Doenças zoonóticas apresentam grande potencial de gerar pandemias, que ocasionam extremos prejuízos econômicos e perda de diversas vidas humanas. Assim, as zoonoses precisam ser monitoradas e estudadas. Dessa forma, destaca-se o conceito de *One Health* ou Saúde Única, onde não há separação entre a saúde humana, animal e ambiental, sendo necessário tratar de todas em conjunto para manutenção da vida na Terra (Morens, Folkers e Fauci, 2004; Weiss e McMichel, 2004; Wolfe, Dunavan e Diamond, 2007).

A possibilidade de transmissão interespecie de SDSE entre animais e humanos foi descrita pela primeira vez por Schrieber e colaboradores, em 2014, na Austrália, onde uma criança e seu cão de estimação estavam colonizados por cepas idênticas de SDSE que foram identificadas a partir do sistema de identificação API 20Strep, identificação do carboidrato C, sequenciamento do gene 16S *rRNA*, tipagem do gene *emm* e determinação do ST pela técnica de MLST. Tais cepas apresentavam os mesmos padrões em todos os testes, sendo classificadas como pertencentes ao grupo sorológico C de Lancefield, possuindo o tipo *emm stC839.5* e pertencendo ao ST-3. Como nem a criança nem o cão apresentavam sinais de infecção, foi sugerido que SDSE fazia parte da microbiota dos dois, provavelmente devido a convivência (Schrieber *et al.*, 2014).

Apenas em 2015, nosso grupo de pesquisa reportou pela primeira vez na literatura, SDSE isolados de secreção uterina de equinos sintomáticos que apresentavam padrão de *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) e ST idêntico ao de amostras isoladas da orofaringe de humanos assintomáticos. É importante ressaltar que o isolamento das amostras ocorreu em cidades e anos distintos, sem contato entre os hospedeiros, demonstrando pela primeira vez a capacidade zoonótica de SDSE, infectando tanto humanos (2 indivíduos) quanto equinos (3 animais) (Silva *et al.*, 2015).

Especula-se que SDSE esteja localizado no segundo estágio de evolução descrito acima (Ciszewski e Szewczyk, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, um total de 115 amostras beta-hemolíticas de SDSE do grupo C, que haviam sido isoladas de humanos e equinos no período compreendido entre 1979 e 2008, em diferentes cidades do sudeste brasileiro, foram analisadas pela técnica de PFGE e classificadas em 15 clones. Porém, em contraste com o comumente observado em estudos epidemiológicos envolvendo amostras de *S. pyogenes*, as amostras de SDSE se agruparam em poucos clones, demonstrando uma baixa diversidade clonal, com predomínio de dois clones designados A (57,4% das amostras) e B (26,1% das amostras). O clone B compreendia um total de 30 amostras, onde 3 eram de origem animal (equinos) e haviam sido isoladas na cidade de Seropédica, nos anos de 1983 e 1984, de animais sintomáticos. Curiosamente, essas amostras isoladas de equinos não apresentavam diferenças no perfil de bandas quando comparadas com duas outras amostras de origem humana, isoladas em 1981, na cidade do Rio de Janeiro, da orofaringe de dois pacientes assintomáticos. Dessa forma, todas as 5 amostras foram dispostas no mesmo subclone, denominado B₂ (Figura 5). Nenhum contato físico ocorreu entre os humanos e os equinos de onde foram isoladas essas amostras (Silva, 2012; Silva *et al.*, 2015).

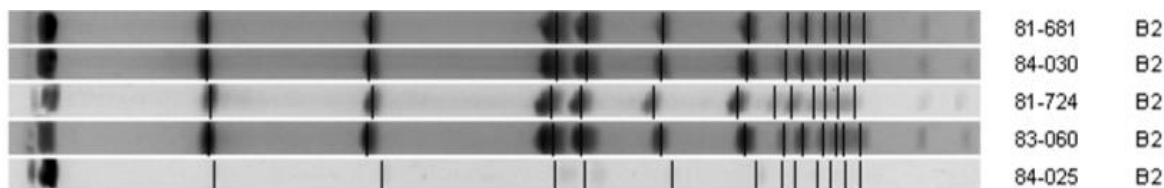


Figura 5 - Gel de PFGE das amostras brasileiras de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* classificadas no subclone B₂ (Silva *et al.*, 2015).

Além disso, todas as amostras classificadas como B₂ foram submetidas a técnica de MLST (*Multilocus sequence typing*) e classificadas como pertencentes ao mesmo *sequence typing* (ST129), o qual pertence ao complexo clonal CC31.

Tal descoberta nos levou a sugerir, pela primeira vez na literatura, uma relação zoonótica na espécie SDSE (Silva *et al.*, 2015). No entanto, não foi avaliado se essas amostras, apesar de pertencerem a um mesmo clone, possuíam fatores de virulência comuns e se alguns destes foram ganhos ou perdidos, facilitando a adaptação ao novo hospedeiro. Dessa forma, diferenças na resistência e na capacidade patogênica entre as amostras de SDSE do clone B₂, isoladas de equinos e humanos, foi o foco desse trabalho.

3. OBJETIVOS

O trabalho aqui apresentado tem como objetivo avaliar amostras de SDSE geneticamente relacionadas, isoladas de humanos e equinos, através da investigação da resistência e de mecanismos de virulência envolvidos nos processos de aderência, invasão, produção de biofilme e de outros fatores de virulência, e sobrevivência frente a *C. elegans*, buscando entender sua adaptação aos dois hospedeiros distintos.

Para atingir este objetivo, quatro amostras de SDSE pertencentes ao clone B₂ e ao ST129, duas isoladas de humanos e duas de equinos (escolhidas aleatoriamente) foram comparadas com o objetivo específico de:

- a. Determinar a susceptibilidade das amostras frente aos antibióticos mais utilizados para tratamento das infecções;
- b. Determinar o mecanismo de resistência das amostras resistentes à eritromicina;
- c. Determinar o tipo *emm*;
- d. Determinar a presença de genes codificantes de fatores de virulência;
- e. Avaliar a capacidade de produzir biofilme;
- f. Avaliar a capacidade de aderir e invadir células do epitélio respiratório humano;
- g. Estudar a capacidade de *killing* frente a um modelo *in vivo* de *Caenorhabditis elegans*, também na presença de N-acetilcisteína (NAC) ou butionina sulfoximina (BSO);
- h. Avaliar a preferência olfativa do *C. elegans* em relação às diferentes amostras estudadas, através do ensaio de escolha binária;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras bacterianas de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Neste estudo, foram utilizadas quatro amostras bacterianas, anteriormente identificadas como *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* pertencentes ao grupo C de Lancefield, que fazem parte da coleção do Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias (BMB) onde se encontram estocadas em Todd-Hewitt Broth (THB; Becton, Dickinson and Company; Sparks MD, EUA) com adição de glicerol a 18% em freezer -80°C. Estas amostras foram utilizadas nos experimentos citados a seguir.

As amostras 81-681 e 81-724 foram obtidas no ano de 1981 da orofaringe de pacientes humanos assintomáticos na cidade do Rio de Janeiro, RJ. Já as amostras 83-060 e 84-030 foram obtidas, respectivamente, nos anos de 1983 e 1984, de secreção uterina de equinos sintomáticos, na cidade de Seropédica, RJ.

Todas as quatro amostras foram analisadas por meio da técnica de *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) em estudos anteriores do laboratório BMB e apresentaram o mesmo perfil clonal, sendo classificadas no clone B (B₂) e ST129 (Silva *et al.*, 2015).

Tabela 1 - Amostras de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* utilizadas nesse estudo.

Amostra	Ano de isolamento	Material clínico	Paciente no momento da coleta	Perfil clonal (PFGE)	Hospedeiro
81-681	1981	Secreção de orofaringe	Assintomático	B ₂	Humano
81-724	1981	Secreção de orofaringe	Assintomático	B ₂	Humano
83-060	1983	Secreção uterina	Sintomático	B ₂	Equino
84-030	1984	Secreção uterina	Sintomático	B ₂	Equino

PFGE, *Pulsed field gel electrophoresis*

4.2 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Foi realizada a avaliação do perfil de susceptibilidade das amostras de SDSE à penicilina, eritromicina e clindamicina através do método da difusão em meio sólido. A

metodologia empregada e a análise dos halos foram realizadas como preconizado pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*, 2018).

De início, as amostras de SDSE foram semeadas em ágar sangue e incubadas por 18 horas numa temperatura de 37°C. Após o período de incubação, colônias de SDSE foram transferidas para uma solução de salina a 0,85% estéril até esta atingir uma turbidez equivalente à da escala 0,5 de McFarland (cerca de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Os inóculos assim preparados foram semeados confluentemente em placas contendo o meio de Ágar Mueller-Hinton (Difco-Becton, Dickinson & Co., Sparks, MD, EUA) adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Biocampo 2000 Produtos Biológicos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), para formação de um tapete microbiano. Posteriormente, discos de penicilina (10 U; Sigma, St. Louis, MO, EUA), clindamicina (2 µg; Cecon, São Paulo, SP, Brasil) e eritromicina (15 µg; Cecon, São Paulo, SP, Brasil) foram aplicados e levemente pressionados contra a superfície do meio de cultura, mantendo uma distância de 12 mm entre os dois últimos.

Finalmente, a placa foi incubada por 18 horas a 37°C, os halos medidos e a susceptibilidade interpretada com base no CLSI (2018). A classificação das amostras se deu então como: sensíveis, com resistência intermediária ou resistentes.

Além disso, a concentração mínima inibitória (CMI) das amostras para penicilina também foi determinada. Para isso, foi aplicado o método de diluição em ágar, segundo as normas do CLSI (2010), utilizando o meio ágar Mueller-Hinton acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Conforme recomendado pelo CLSI, o antimicrobiano foi diluído em água destilada estéril e adicionado ao meio de cultura. Assim, cada uma das placas possuía uma concentração diferente de penicilina (0,0075 µg/mL a 0,48 µg/mL). Posteriormente, as amostras na concentração 0,5 de McFarland foram semeadas nas placas, estas incubadas a 37°C, e após 18 h de incubação, a CMI foi determinada. Vale ressaltar que a CMI é a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Foram também analisados os fenótipos de resistência à eritromicina e a clindamicina, de acordo com as normas estabelecidas pelo CLSI (2018). As amostras que apresentaram resistência tanto para eritromicina quanto para clindamicina foram classificadas como fenótipo MLS_B constitutivo, sendo constatada produção da enzima metilase. O fenótipo foi classificado como MLS_B induzido ao se observar resistência à eritromicina e sensibilidade à clindamicina, havendo, no entanto, uma redução do halo de inibição do crescimento na lateral mais próxima ao disco de eritromicina, de forma que,

deste lado a amostra seja classificada como resistente, produzindo um halo de inibição do crescimento bacteriano com um formato semelhante a letra “D”. As amostras classificadas como fenótipo M; apresentaram resistência apenas aos macrolídeos e sensibilidade uniforme à clindamicina. Enquanto as portadoras do fenótipo L; demonstraram resistência apenas às lincosaminas, logo, halo de sensibilidade uniforme à eritromicina e resistência à clindamicina (Roberts *et al.*, 1999; Biedenbach *et al.*, 2006; Uh *et al.*, 2007; CLSI, 2010). Todos esses possíveis fenótipos estão representados na Figura 6.

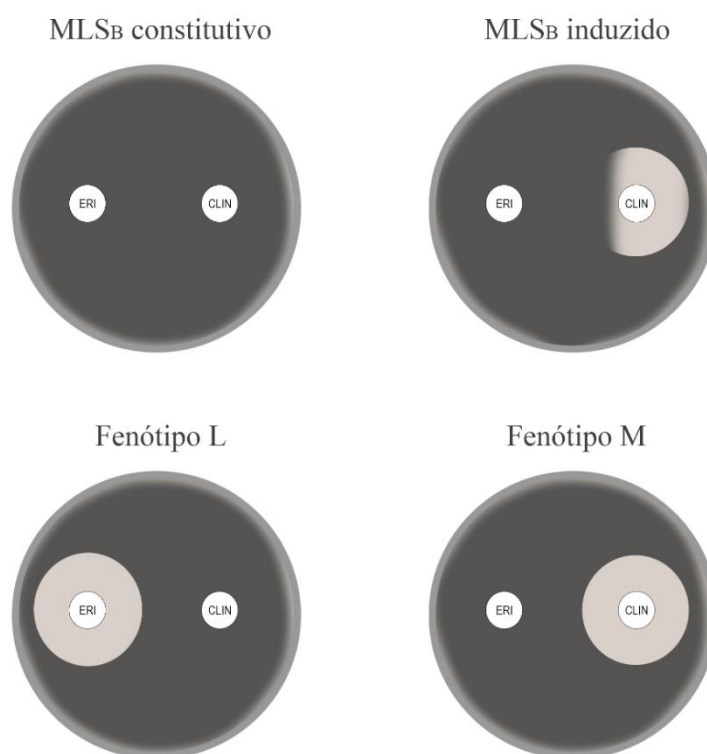


Figura 6 – Esquema representativo dos fenótipos de resistência e sensibilidade à eritromicina e clindamicina em SDSE. Por Thaís Tavares de Amorim.

Para as amostras que apresentaram resistência aos antibióticos clindamicina ou eritromicina, foi realizada investigação da presença de genes de resistência através da extração do DNA, pesquisa de genes de resistência por reação de PCR e eletroforese em gel de agarose para visualização dos resultados. As amostras resistentes tiveram seu material genético extraído através da técnica descrita por Chien e colaboradores utilizando a resina Chelex 100 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Para tal feito, um raspado bacteriano crescido em placa de ágar sangue por 18 horas/37°C foi suspenso em 200 µL da solução de Chelex a 5%, fortemente homogêneas e mantidas a 100°C por 10 minutos. Após o tempo de incubação, os tubos foram homogêneos mais uma vez por

10 segundos e, posteriormente, centrifugados a 3000 g por 1 minuto. O sobrenadante, onde está contido o material genético, foi transferido para um outro tubo tipo eppendorf e estocado a -20°C (Chien *et al.*, 2013, com modificações).

As amostras EGC 53.157, EGG 015.195 e EGG 06.196, respectivamente, foram utilizadas como controle-positivo dos genes *ermA*, *ermB* e *mef*.

Os genes *ermA*, *ermB* e *mef* foram amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para atingir este objetivo, foram utilizados iniciadores sintetizados pela Bio-Synthesis Inc. (Lewisville, TE, EUA) listados na Tabela 2.

Tabela 2 - *Primers* utilizados para detecção de genes de resistência por reação em cadeia da polimerase.

Gene	Fenótipo codificado	Iniciadores (5'-3', <i>forward</i> e <i>reverse</i> , respectivamente)	Tamanho do produto de PCR	Cepa controle positivo
<i>ermA</i>	Resistência a macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas B (MLS _B)	GCATGACATAAACCTTCA AGGTTATAATGAAACAGA	206 pb	53.157 (EGC)
<i>ermB</i>	Resistência a macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas B (MLS _B)	CGAGTGAAAAAGTACTCAACC GGCGTGTTTCATTGCTTGATG	616 pb	015.195 (EGG)
<i>mefA</i>	Resistência a macrolídeos (M)	AGTATCATTAACTACTAGTGC TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	348 pb	06.196 (EGG)
16S*	Subunidade 16S do RNA ribossômico	GAGTACGACCGCAAGGTTGA CTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG	100 pb	53157 (EGC)

EGC – *Streptococcus* classificado no grupo sorológico C de Lancefield; EGG – *Streptococcus* classificado no grupo sorológico G de Lancefield; *, controle positivo da reação de PCR. Sutcliffe, Tait-kamradt e Wondrack, 1996; Tait-kamradt *et al.*, 1997; Klugman *et al.*, 1998; Seppälä *et al.*, 1998; Haenni *et al.*, 2010.

As reações foram realizadas no termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sendo preparadas como descrito na Tabela 3. A programação consistiu de: 2 minutos de pré-desnaturação a 95°C, seguido de 30

ciclos a 95°C por 1 minuto para desnaturação, 55°C por 1 minuto e 30 segundos para anelamento, 72°C por 1 minuto e 30 segundos para a extensão e 72°C por 7 minutos para extensão final. Para visualização dos amplicons, 5 µL da reação de PCR foram diluídos em 1 µL de tampão de amostra 6X Gel Loading Dye (Sinapse, São Paulo, SP, Brasil) e aplicados no gel de agarose a 2% em tampão TAE 1X para corrida, a 110V durante 45 min. Por fim, a visualização do gel foi realizada no aparelho Gel Doc EZ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). O padrão de corrida utilizado foi o 50 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Tabela 3 - Conteúdos utilizados na reação em cadeia da polimerase para pesquisa de genes de resistência.

Componentes da reação	Multiplex 1: <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>mef</i> , 16S
H ₂ O bidestilada	q.s.p. 50 µL
Tampão da enzima <i>Taq</i> DNA polimerase	1X (sem MgCl ₂)
MgCl ₂	5 mM
Iniciadores (<i>forward</i> e <i>reverse</i>)	0,4 µM cada fwd; 0,4 µM cada rev
dNTP mix	200 µM
DNA da amostra	50 ng
<i>Taq</i> DNA polimerase	1 U

4.3 Tipagem *emm*

A técnica de tipagem *emm* pode ser resumida em basicamente 3 etapas: a primeira é a obtenção do material genético das amostras de interesse, a segunda é a amplificação de um determinado segmento no gene *emm* através da técnica de PCR e a terceira, o sequenciamento e análise do segmento amplificado. Toda a metodologia foi utilizada conforme descrito pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e apresentado no site <https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/emm-typing-protocol.html>.

Preliminarmente, o DNA das amostras foi extraído através técnica descrita por Chien utilizando resina Chelex 100 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) citada no item 4.2 (Chien *et al.*, 2013, com modificações).

Posteriormente à extração do DNA, foi realizada à amplificação do gene *emm* por PCR. Para tal, utilizou-se 200 µM de cada um dos dNTPs, 35 pM do iniciador *forward* (5'-TATT(C/G)GCTTAGAAAATTAA-3'), 35 pM do iniciador *reverse* (5'-GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT-3'), 1,25 U da enzima *Taq* DNA polimerase, 5 ng do

DNA de interesse e, por fim, 1X do tampão da enzima acrescido de 2 mM de MgCl₂. Após a preparação da reação, a mistura foi submetida ao termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A programação consistiu em: 1 minuto de pré-desnaturação a 94°C, seguido de 10 ciclos a 94°C por 15 segundos para desnaturação, 47°C por 30 segundos para anelamento, e 72°C por 1 minuto e 15 segundos para a extensão. A seguir, foram realizados 20 ciclos adicionais de 94°C por 15 segundos, 47°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 15 segundos, com acréscimos de 10 segundos nos 19 ciclos subsequentes; extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para detectar os amplicons, os produtos de PCR foram submetidos a uma corrida de eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v; Gibco, Grand Island, NY, EUA) em tampão TAE 1 X (Tris-Acetato 20 mM, EDTA 0,5 mM pH 8,0). A corrida foi realizada em tampão TAE 1X, o mesmo utilizado para confecção do gel. Então, 5 µL do produto da reação de PCR de cada amostra foram diluídos em 1 µL de tampão de amostra 6X Gel Loading Dye (Sinapse, São Paulo, SP, Brasil) e aplicadas no gel para realização da corrida que ocorreu a uma voltagem de 110V durante 45 minutos, utilizando como padrão de peso molecular o 123bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Ao fim da corrida, visualizou-se o gel no aparelho Gel Doc EZ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Com a confirmação da amplificação, os produtos do PCR foram purificados através do kit *GFXtm PCR DNA abd Gel Band Purification* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), de acordo com as recomendações do fabricante. Para quantificação do material genético, utilizou-se o espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, DE, EUA). Por fim, os amplicons foram enviados para sequenciamento no Instituto de Biofísica Carlos Chaga Filho, UFRJ. As sequências recebidas foram editadas através do Bioedit v7.1.3 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EUA) e submetidas ao site Blast-*emm* (<https://www2.cdc.gov/vaccines/biotech/strepblast.asp>) para a classificação do tipo *emm* ao qual a amostra pertence.

4.4 Pesquisa de genes de virulência

A princípio, realizou-se a extração do material genético das 4 amostras apresentadas na Tabela 1, como descrito no item 4.2. Posteriormente, foi realizada a pesquisa dos diferentes genes de virulência através de reação de PCR. Para a reação

utilizou-se 200 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M de cada iniciador, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase, 5 μ L (50 ng) de DNA das amostras de interesse e 1X do tampão da enzima com 2 mM de $MgCl_2$. As reações aconteceram no termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando o seguinte ciclo: etapa de pré-desnaturação de 2 min a 95°C, acompanhados por 30 ciclos de 95°C por 45 s para desnaturação, 55°C por 30 s para a etapa de anelamento, 72°C por 30 s para etapa de extensão da fita e, por fim, uma extensão final a 72°C por 4 min. Em seguida, conforme descrito no item 4.2, 5 μ L dos amplicons obtidos na reação foram diluídos em 1 μ L de tampão de amostra 6X Gel Loading Dye (Sinapse, São Paulo, SP, Brasil) e aplicados no gel de agarose a 2% em tampão TAE 1X para corrida, a 110V durante 45 min. Após tal etapa, a visualização do gel foi realizada no aparelho Gel Doc EZ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). O padrão de corrida utilizado foi o 50 bp DNA Ladder. Além disso, estão explicitados a seguir, na Tabela 4, os genes analisados, seus respectivos fenótipos, locus e os *primers* utilizados para as reações de PCR. Todos os *primers* utilizados nesse experimento foram desenhados pelo nosso grupo de pesquisa (Santos *et al.*, 2020).

Tabela 4 - Genes associados a fatores de virulência em *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* avaliados por reação de PCR

Gene	Fenótipo codificado	locus_tag	Primer (5'–3' forward e reverse)	Tamanho do amplicon (pb)	Amostra controle positivo
<i>brpA</i>	Proteína reguladora de biofilme	SDE12394_08900	ATGGGCGTCAAAAGCGTCAA CCCGATAACCTAATAAACTTGG	168	SDSE HSM53
<i>pilus</i>	Subunidade de pilus	SDE12394_04490	GAAACCAAACCCGCTCAAAT CGTAGTCATCTTCTGGCAC	86	SDSE 84.94
<i>emm</i>	Proteína M	SDE12394_00995	TGGAAGAGCATCAGACTCACA CGCTGTGAAGAATGGGTTAG	175	EGA GAP88
<i>fbp</i>	Proteína ligadora de fibronectina	SDE12394_06640	GGTGCTGTCAATCCTTTTAC AGCCTTGAAAATGGTGTTGTA	100	SDSD VSD13
<i>gapA</i>	GAPDH ^a	SDE12394_09620	GCTGCTGAAAACACTTACAT TACCGTCAAGAATGTCGTGG	115	SDSD VSD13
<i>hyl</i>	Hialuronidase	SDE12394_08290	CGGGACTTGATTTTGATTATAC GCAGTCTTTTTGAATCGTCTCT	160	SDSE 84.94
<i>inlA</i>	Internalina	SDE12394_07350	GAAGCAGAAGGAAATCAAATCA CCTGTCACATCCAAGAAAGTT	77	SDSE 84.94
<i>lmb</i>	Proteína ligadora de laminina	SDE12394_05265	CGGCATTTTCTTATCTGGCTA GGAGAAATACCCGAGATACC	63	SDSE HSM53
<i>sagA</i>	Estreptolisina S	SDEG_0705	GGCTGCTGCTGCTGCTGT CTCCGCTACCACCTTGAG	77	SDSE 84.94
<i>scpB</i>	C5a peptidase	SDEG_0933	AAACTAAAACCCCAAACTC CGTCATCTGCTACTGTTTCT	54	SDSE HSM53

Gene	Fenótipo codificado	locus_tag	Primer (5'–3' foward e reverse)	Tamanho do amplicon (pb)	Amostra controle positivo
<i>ska</i>	Estreptoquinase	SDE12394_01015	GGTTATGATACGGTTGGTGT GATGCTTTTGGTATTATGGACT	78	SDSE HSM53
<i>slo</i>	Estreptolisina O	SDE12394_10255	AACAAACCAGACGCAGTAGT TGAAACATTGGCATAGGTAGG	117	SDSE HSM53
<i>spdI</i>	Estreptodornase	MGAS10750_Spy0622	TGCCACGATTCATTACCCAT CGCTACCTTTTCACATATCCAA	149	SDSD VSD13
<i>speC</i>	Exotoxina pirogênicas estreptocócicas	GQ923929.1	GCCTGCTCAAATAATAAAGTA ACATAAGGAGAAGTAGCGTCA	189	SDSD VSD13
<i>speG</i>	Exotoxina pirogênicas estreptocócicas	SDEG_1991	TCAAAGGGGATAAGGTAGATGT ATAAGAGGGGAGACTGGTTTC	167	SDSE HSM53
<i>speK</i>	Exotoxina pirogênicas estreptocócicas	HQ724302.1	TGGGGGACAGCAAATAAAAT TGTCTAATGCCACCGTCTTT	91	SDSD VSD13
<i>speL</i>	Exotoxina pirogênicas estreptocócicas	HQ724303.1	TTCAATCAATGGTGGTCTCG CTGGAAGGTAACGGGAGAT	77	SDSD VSD13
<i>speM</i>	Exotoxina pirogênicas estreptocócicas	HQ724304.1	ATGTTGATGGAGGTTTGATAAG CGGTATCTGTTCCCCAAAAT	85	SDSD VSD13

^a, GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. SDSE, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*; EGA – *Streptococcus* classificados no grupo sorológico A de Lancefield; SDSD, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

4.5 Avaliação da produção de biofilme

Todas as amostras citadas na Tabela 1 foram avaliadas quanto a capacidade de produzir biofilme em tubos de vidro 13x100mm (Corning Inc., Corning, NY, EUA). Inicialmente, as amostras foram semeadas em placas de ágar sangue, incubadas por 18 h/37°C. A partir desse crescimento uma alçada foi transferida para tubos contendo 4 mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB; Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, EUA), suplementado com 0,5% (p/v) de glicose (TSBG) e incubados a 37°C até atingir a $DO_{570nm} = 0,6$ (Eifuku-Koreeda *et al.*, 1991).

Em seguida, 100 µL dos inóculos padronizados foram transferidos para novos tubos de vidro 13x100 mm, contendo 4 mL de TSBG, que foram incubados durante 20 horas a 37°C, numa inclinação de 30° em relação ao plano horizontal. Após o tempo de incubação, os tubos tiveram seus respectivos sobrenadantes descartados e o biofilme delicadamente lavado com 1 mL de solução salina a 0,85% (p/v).

Em seguida, os tubos foram secos em estufa a 37°C, e, para análise quantitativa, os biofilmes foram suspensos em 4 mL de solução salina a 0,85% e lidos em espectrofotômetro na DO_{600nm} . A partir dos valores obtidos as amostras foram classificadas como: $DO_{600nm} \leq 0,099$, não produtor (-); $0,1 < DO_{600nm} \leq 0,299$, produtor fraco (+); $0,3 < DO_{600nm} \leq 0,599$, produtor moderado (++); e $DO_{600nm} > 0,600$, produtor forte de biofilme (+++) (Genteluci *et al.*, 2015).

4.6 Adesão e invasão às células 16HBE14o-

Células do epitélio brônquio humano 16HBE14o- foram mantidas em monocamadas, na superfície de garrafas de plástico (TPP, Trasadingen, Suíça) contendo o meio de cultura celular DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, acrescido de 4,5 mg/L de glicose, L-glutamina e 25 mM de HEPES), suplementado com 2,5 mg/L de fungizona, 100 mg/L de sulfato de gentamicina e 10% (v/v) de soro fetal bovino (Sigma Aldrich, St. Louis MO, EUA). A cultura foi mantida a 37°C em atmosfera enriquecida com 5% de CO₂ por, aproximadamente, dois dias de incubação para a formação de um tapete confluyente de células.

Após o tempo de incubação, observou-se a garrafa com auxílio de um microscópio invertido em um aumento de 40x. Sendo observada uma monocamada de células, esta foi tratada com uma solução estéril de tripsina constituída por 10 µM de NaCl, 5 µM de KCl,

5 μM de dextrose, 6 μM de NaHCO_3 , tripsina 0,025% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,5 μM de EDTA em meio DMEM para desprender as células do fundo da garrafa. Em seguida, foi transferido um volume contendo uma concentração de 3×10^5 células para cada um dos poços de uma placa de 24 poços (Nunclon, Nunc, Rokslide, Dinamarca), que foi incubada por cerca de 48 horas nas mesmas condições descritas anteriormente.

Posteriormente, cada poço foi lavado duas vezes com uma solução de tampão fosfato salina (PBS; 0,05 M, pH 7,4) para eliminação dos antimicrobianos presentes no meio de cultura. Paralelamente, um crescimento bacteriano em THB com $\text{DO}_{540\text{nm}} = 0,4$ (equivalente a cerca de 10^6 UFC/mL) foi lavado com PBS (0,05 M, pH 7,4) e ressuspenso em meio DMEM. Foram transferidos 500 μL da suspensão bacteriana para cada poço da placa contendo o tapete de células epiteliais, que então foi incubada por 2 horas nas mesmas condições citadas anteriormente.

Após o tempo de incubação, os poços foram lavados com PBS e a monocamada tratada com 0,25% (p/v) de tripsina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 5 minutos a uma temperatura de 37°C . Em seguida, as células eucarióticas foram rompidas com Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 0,025% (v/v). A solução contendo as células eucarióticas lisadas foi diluída seriadamente em PBS até 10^5 e semeada em ágar sangue para determinação da contagem total de células de SDSE que aderiram e invadiram (UFC_{AI}). Já para a quantificação das células que foram aptas a invadir (UFC_{I}), após a interação, a monocamada foi igualmente lavada com PBS, mas passou por uma etapa adicional de incubação com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina por 1 hora para eliminar as bactérias que não foram capazes de invadir. Logo depois, a cultura foi novamente lavada com PBS para remoção dos antimicrobianos aplicados. Em seguida, foi adicionada uma solução com 0,25% (p/v) de tripsina e a placa incubada por 5 minutos para desprender a monocamada. Finalmente, as células eucarióticas foram lisadas após uma incubação de 5 minutos na presença de 0,025% (v/v) de Triton X-100, sendo igualmente diluídas até 10^5 e semeadas em ágar sangue. Além disso, o sobrenadante foi diluído e plaqueado para contagem das bactérias presentes (UFC_{S}).

O número de bactérias aderentes (UFC_{A}) foi determinada utilizando a fórmula $\text{UFC}_{\text{A}} = \text{UFC}_{\text{AI}} (\text{aderiram e invadiram}) - \text{UFC}_{\text{I}} (\text{invadiram})$. Os resultados obtidos a partir dessa metodologia foram convertidos à porcentagem, adotando o número total de UFC ($\text{UFC}_{\text{AI}} + \text{UFC}_{\text{S}}$) como 100%, sendo UFC_{S} o número de unidades formadoras de colônias que se encontravam no sobrenadante. Em relação a capacidade invasiva, as amostras que apresentaram resultado $\geq 10\%$ de bactérias internalizadas foram classificadas como

altamente invasivas, de 1% a <10% - classificadas como invasivas, de >0,001% a <1% - fracamente invasivas e $\leq 0,001\%$ - não invasivas (Amaral *et al.*, 2005). Cada experimento foi realizado por três vezes, todos em triplicata, e o resultado foi a média entre as triplicatas de cada experimento. O teste *t* de *Student* foi utilizado como ferramenta estatística, levando em conta populações não pareadas; $p < 0,05$ foi considerado significativo (Baldassarri *et al.*, 2006).

4.7 Estudos com *Caenorhabditis elegans*.

4.7.1 Cultivo de *Caenorhabditis elegans*.

Inicialmente, foi realizada a semeadura confluenta de *Escherichia coli* OP50 não patogênica, que serviu como alimento para os animais, em placas de Petri contendo o meio Nematode Growth Medium (NG). Após incubação por 30 minutos a 37 °C, os nematoides *C. elegans* da linhagem BA17 foram adicionados sobre o meio de cultura e a placa incubada a uma temperatura de 20°C. Para manutenção e propagação os animais foram repassados a cada 3 dias conforme descrito acima (Santos *et al.*, 2020).

4.7.2 Sincronização de *Caenorhabditis elegans*.

Após 3 dias de incubação, as placas de NG que possuíam uma quantidade considerável de *C. elegans* (ovos e vermes adultos em diferentes fases) tiveram os nematoides sincronizados com o propósito de obtê-los no estágio larval L4. Primeiramente, as placas foram lavadas com 4 mL de tampão M9 [3 g de KH_2PO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 6 g de Na_2HPO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 5 g de NaCl (Affymetrix, Ohio, EUA) e 1 mL de MgSO_4 1M (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) completando o volume de 1 L de água destilada estéril]. A suspensão de nematoides foi transferida para um tubo tipo Falcon e, em seguida, adicionada de 1 mL da solução de lise [hipoclorito de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 6% acrescido de NaOH 5N (Merck, Darmstadt, Alemanha)]. Feito isso, o tubo foi agitado com auxílio de um agitador por, no máximo, 5 minutos (com intervalos a cada 30 seg) ou até a solução se tornar mais límpida e não sendo mais possível observar os nematoides em movimento.

Imediatamente, o tubo foi centrifugado 3 vezes a 1300 g durante 1 minuto, sendo o sobrenadante descartado entre cada centrifugação, já que esta é a fase em que as carcaças dos animais mortos se encontram, e o volume preenchido com tampão M9. O

pellet, onde os ovos do nematoide estavam concentrados, foi ressuspensão em 4 mL de tampão M9. Ao final da terceira centrifugação, o pellet foi ressuspensão em 1 mL de tampão M9, e transferido para novas placas de meio NG contendo um tapete confluyente de *E. coli* OP50 não patogênica. As placas foram incubadas a 20°C por 3 dias para que os nematoides atingissem a fase L4. (Stiernagle, 2006).

4.7.3 Ensaio de sobrevivência dos nematoides.

Inicialmente, ocorreu a preparação da placa de 24 poços. Para tal, foram transferidos 500 µL de caldo Todd-Hewitt Broth (THB), suplementado com 2,5% de ágar (Bacto Agar: Difco, Sparks MD, EUA) e 5 µg/ mL de ácido nalidíxico (Reagen, RJ, Brasil) para cada um dos poços. Em um segundo momento, as amostras de SDSE foram semeadas em placas de ágar sangue, contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubadas a uma temperatura de 37°C durante, aproximadamente, 20 horas. Após esse período, uma colônia isolada foi transferida para um tubo contendo 4 mL de caldo THB que, por sua vez, foi incubado *overnight* em banho-maria a 37°C. Posteriormente, 20 µL da suspensão bacteriana crescida *overnight* foi transferido para a superfície do meio THB acrescido com 2,5% de ágar e a placa incubada a 37°C por 4 h para a obtenção de um tapete bacteriano.

A fim de controlar o experimento, a cepa de *E. coli* OP50 também foi cultivada em ágar Lúria-Bertani (ágar LB) por, aproximadamente, 20 horas a 37°C, sendo uma colônia transferida para caldo Lúria-Bertani (caldo LB), que foi incubado *overnight* a 37°C em banho-maria. Após o crescimento, 20 µL da suspensão (D.O ajustada para 1,0 a 540nm) também foi transferido para a superfície do meio de cultivo depositado nos poços controle e as placas incubadas por 4 horas a 37°C.

Simultaneamente, as placas de NG contendo os nematoides, sincronizados na fase larval L4 conforme descrito no item 4.7.2, foram lavadas com 4 mL de tampão M9 e transferidas para tubos tipo Falcon. Após a incubação para formação do tapete bacteriano, 20 a 30 nematoides da suspensão de *C. elegans* foram transferidos para cada poço, e a placa incubada a 25°C durante 3 dias e a sobrevivência dos nematoides monitorada a cada 24 horas com o auxílio de um microscópio óptico invertido ID 02 (Zeiss; Oberkochen, Alemanha). Cada poço da placa foi observado individualmente e os nematoides viáveis contados (Sifri *et al.*, 2003, com adaptações). É importante enfatizar que a linhagem BA17 tem seu aparelho reprodutivo atrofiado na temperatura de 25°C e, por isso, não põe

ovos. Ao retornar a temperatura para 20°C, o aparelho reprodutor da nematoide volta ao desenvolvimento normal e a capacidade de oviposição retorna.

Tal experimento foi repetido no mínimo por três vezes. Além disso, os dados foram analisados pelo *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) através do método de taxa de sobrevivência de nematoides Kaplan-Meier. A significância foi obtida por meio do *log rank test* (Sifri *et al.*, 2003).

4.7.4 Ensaio de sobrevivência na presença de N-acetilcisteína (NAC) ou butionina sulfoximina (BSO).

Com objetivo de avaliar se a liberação do peróxido de hidrogênio influenciava na patogênese das cepas de SDSE de origem humana e equina durante a interação com o *C. elegans*, ensaios de sobrevivência foram conduzidos na presença de N-acetilcisteína (NAC) ou de butionina sulfoximina (BSO).

O NAC é um precursor de glutathione, responsável por sequestrar o peróxido de hidrogênio que é utilizado para oxidar a glutathione reduzida. Portanto, é de se esperar que na sua presença a ação do peróxido de hidrogênio seja atenuada. O BSO é um inibidor irreversível da enzima γ -glutamylcysteine (GCS), impedindo a formação da glutathione e, consequentemente, inativando um dos principais mecanismos de defesa do *C. elegans* frente a espécies reativas de oxigênio.

Em um primeiro momento, foi preparada a placa de 24 poços para o experimento. Para tal foi preparado Todd-Hewitt Broth (THB) suplementado com 2,5% de ágar, 5 μ g/mL de ácido nalidíxico e N-acetilcisteína estéril (NAC; Sigma, Saint Louis, MO, Estados Unidos) na concentração de 10 mM (Novaes *et al.*, 2013; Ezerina *et al.*, 2018). Para a adição do NAC, o caldo THB suplementado com ágar e ácido nalidíxico estéril foi adicionado de solução inicial de NAC estéril 100 mM (500 μ L da solução 100mM em 4,5 mL de caldo THB suplementado para obter concentração de 10 mM).

Para o BSO o ensaio foi realizado como descrito anteriormente com as seguintes alterações: a solução inicial de BSO estéril (20 mM; Sigma, Saint Louis, MO, Estados Unidos) foi adicionada ao caldo THB suplementado com 2,5% de ágar e 5 μ g/mL de ácido nalidíxico estéril para obter concentração de BSO de 2 mM (Novaes *et al.*, 2013).

Em cada placa foram preparados poços com NAC, poços com BSO, 2 poços com caldo THB suplementado com 2,5% de ágar e 5 μ g/mL de ácido nalidíxico (controle) e 1 poço com apenas o caldo THB suplementado com 2,5% de ágar (controle). Após o

preparo da placa, foi realizado o teste de esterilidade do meio. Em seguida, a inoculação da amostra bacteriana e do nematoide se deu exatamente como descrito no item 4.7.3.

O experimento foi repetido por, no mínimo, três vezes. Os resultados foram analisados pelo *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) através do método de taxa de sobrevivência de nematoides Kaplan-Meier e a significância obtida por meio do *log rank test* (Sifri *et al.*, 2003).

4.7.6 Microscopia óptica de Contraste de Interferência Diferencial (CID) de *C. elegans* mantido na presença de SDSE

No segundo dia de interação do ensaio de sobrevivência descrito no item 4.7.3, na ausência de NAC e BSO, os nematoides tiveram sua morfologia celular avaliada com auxílio de um microscópio óptico de Contraste de Interferência Diferencial Axio Observer A1 (Zeiss; Oberkochen, Alemanha).

Para atingir este objetivo, após 48 horas a partir do início do ensaio de sobrevivência, dois poços onde interagiram a amostra de SDSE (humana ou equina) com *C. elegans* foram lavados com 1 mL de tampão M9. Em seguida, essa suspensão foi transferida para tubos tipo eppendorf e fixados em formaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Posteriormente, com auxílio de uma pipeta Pasteur, algumas gotas do lavado foram transferidas para lâminas de vidro e cobertos com lamínula. Por fim, as lâminas foram levadas ao microscópio óptico de Contraste de Interferência Diferencial e observadas quanto a morfologia celular, sendo analisadas: alteração da cutícula e do tubo intestinal, eclosão interna dos ovos e presença de bolhas apoptóticas.

4.7.7 Teste de escolha binária

C. elegans apresenta capacidade de evitar bactérias patogênicas a partir de sua preferência olfativa, conseguindo, assim, ter predileção por microrganismos menos patogênicos. Tal nematoide se alimenta de *E. coli* OP50, uma bactéria não patogênica. Porém, mesmo com a capacidade de detectar bactérias patogênicas através do olfato, *C. elegans* ainda é vulnerável a infecções por microrganismos patogênicos presentes em seu habitat. Este experimento tem como objetivo avaliar a capacidade de distinção de *C.*

C. elegans a partir de sua preferência olfativa, após uma exposição inicial aos microrganismos estudados (Zhang, Lu e Bargmann, 2005).

A princípio, a primeira etapa realizada foi o treinamento dos nematoides. Para tal, uma amostra de SDSE de cada hospedeiro (humano ou equino) foi crescida *overnight* em caldo THB a 37°C em banho-maria. Após o crescimento, 180 µL da suspensão bacteriana foram semeados de forma confluyente em metade de uma placa de Petri contendo o meio THB adicionado de 2,5% de ágar. Posteriormente, foi igualmente semeada na outra metade da placa 180 µL de uma outra suspensão de SDSE (oriunda de diferente hospedeiro) ou 80 µL de *E. coli* OP50, para controle do experimento. Por fim, foram depositados no centro da placa cerca de 50 a 200 nematoides em estágio larval L1, já que esse é o estágio seguinte a eclosão e os animais se encontram famintos. Após adição dos animais, a placa de treinamento foi incubada para interação do nematoide com os microrganismos por 4 horas a 25°C. Sucessivamente ao tempo de incubação, a placa foi lavada com 5 mL de tampão M9, e esse líquido transferido para um tubo cônico onde os nematoides, ao sofrerem ação da gravidade, se depositaram por decantação no fundo do tubo. O sobrenadante foi desprezado e os *C. elegans* ressuspensos em 5 mL de tampão M9. Este processo foi repetido três vezes e o volume final completado para 30 µL. A seguir, transferiu-se um volume de 5 µL para uma lâmina de vidro, com o propósito de contar o número de nematoides presentes na suspensão utilizando um microscópio óptico.

Finalmente, as mesmas amostras bacterianas utilizadas na fase de treinamento foram semeadas em forma de *spot*, a partir de 25 µL da suspensão bacteriana crescidas no caldo THB a 37°C/*overnight* em banho-maria. Esses dois *spots* foram posicionados em direções contrárias e equidistantes ao centro de uma nova placa de THB contendo 2,5% de ágar, e foi chamada de placa teste. Em seguida, o volume retirado da suspensão, contendo os *C. elegans* treinados, foi calculado a partir da contagem dos nematoides realizada anteriormente, fazendo com que cerca de 30 a 60 animais fossem transferidos para o centro da placa teste, equidistantes aos *spots* semeados. A placa teste foi incubada a 25°C por 4 horas. Após esse tempo, adicionou-se 1 µL de azida sódica (concentração de 10 mM) em cada *spot* para a imobilização dos animais. Por último, foi realizada a leitura do total de nematoides presentes em toda a placa e o número desses em cada *spot* (Figura 7; Santos, 2020).

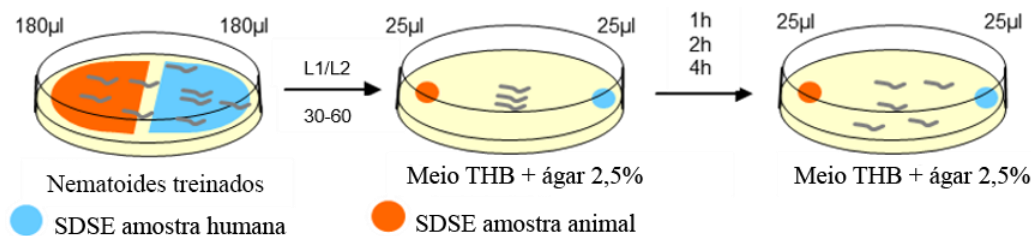


Figura 7 - Esquema de ensaio de escolha binária com nematoides treinados, exposto a duas diferentes cepas de SDSE. Adaptado de Victor Lima (2017) por Thaís Tavares.

Para controle, os nematoides em fase L1, oriundos de uma placa de manutenção comum de NG com *E.coli* OP50 sem contato prévio com amostras de SDSE, foram transferidos para uma placa teste, da mesma forma como citado anteriormente (Figura 8).

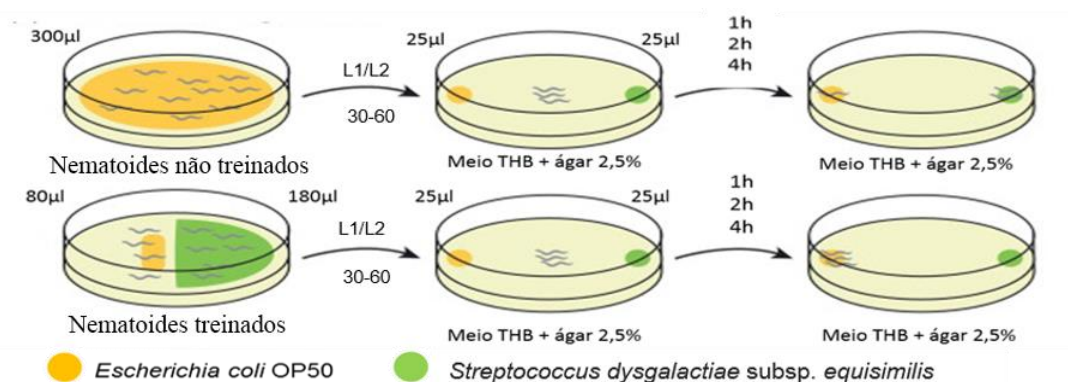


Figura 8 - Esquema de ensaio de escolha binária com vermes não treinados e vermes treinados, expostos a cepa controle de *E. coli* OP50 e a uma cepa de SDSE. Adaptado por Victor Lima (2017).

Todos os resultados foram avaliados pelo método de índice de escolha, que consiste no número de animais no tapete de uma cepa (X), subtraído pelo número de animais presentes no tapete de outra cepa (Y) e dividido pelo total de animais depositados na placa teste. É importante citar que um índice de escolha de -1 assinala uma total inclinação pela amostra X, um índice de 1 uma total inclinação pela amostra Y e um índice de 0 uma predileção igualitária pelas duas amostras. Outros dados estatísticos como desvio padrão (SD) e o erro padrão da média (SEM) de cada um dos experimentos foram obtidos com auxílio do QuickCalcs.

5. RESULTADOS

5.1. Susceptibilidade aos antimicrobianos e pesquisa de genes envolvidos com fenótipos de resistência.

As amostras citadas na Tabela 1 foram avaliadas quanto ao perfil de susceptibilidade a penicilina, clindamicina e eritromicina. Após a análise do tamanho dos halos de inibição de crescimento foi observado que todas as amostras apresentavam o mesmo perfil de susceptibilidade, sendo sensíveis a penicilina e clindamicina, mas resistentes a eritromicina (Tabela 5). Quanto ao fenótipo de resistência, devido a sensibilidade a clindamicina e resistência a eritromicina, as 4 cepas foram caracterizadas como fenótipo M (Tabela 5).

Tabela 5 – Fenótipo de resistência e perfil de susceptibilidade das amostras de SDSE quanto a susceptibilidade à penicilina, clindamicina e eritromicina.

Amostras	Hospedeiro	Pen	Clin	Eri	CMI _{Pen} (µg/mL)	Fenótipo de resistência
81-681	Humano	S	S	R	0,015	M
81-724	Humano	S	S	R	0,015	M
84-030	Equino	S	S	R	0,015	M
83-060	Equino	S	S	R	0,015	M

Pen – penicilina; Clin – clindamicina; Eri – eritromicina; CMI – Concentração mínima inibitória; S – Sensível ao antimicrobiano avaliado; R – Resistente ao antimicrobiano avaliado; M – fenótipo de resistência do tipo M.

Tabela 6 – Pesquisa nas amostras de SDSE de genes envolvidos com a resistência aos macrolídeos e /ou lincosaminas.

Amostras	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>mef</i>
81-681 H	-	-	+
81-724 H	+	-	+
84-030 E	-	-	+
83-060 E	+	-	+

+, Presença do gene; -, ausência do gene; H, amostra isolada de hospedeiro humano; E, amostra isolada de hospedeiro equino.

Além disso, já que todas as amostras apresentaram resistência a eritromicina, o conjunto amostral foi submetido a uma investigação da presença dos genes envolvidos na resistência aos macrolídeos e/ou lincosaminas: *ermA*, *ermB* e *mef*.

Todas as amostras avaliadas apresentaram ausência do gene *ermB* e presença do gene *mef*. Porém, houve divergência quanto ao gene *ermA*. As amostras 81-681 e 84-030 isoladas, respectivamente, de hospedeiro humano e equino, apresentaram ausência desse gene. Enquanto nas amostras 81-724 (humano) e 83-060 (equino) tal gene foi detectado (Tabela 6).

5.2. Tipagem *emm* e pesquisa de genes de virulência através do método de reação em cadeia da polimerase.

Estudos epidemiológicos envolvendo estreptococos A, C e G utilizam regularmente a tipagem da proteína M. Dentre as 4 amostras de SDSE avaliadas todas foram classificadas como pertencentes ao tipo *emm stC6979* (Tabela 7).

Ademais, foi realizada a pesquisa de diversos outros genes envolvidos na codificação de fatores de virulência para SDSE. Em todas as amostras analisadas, foi constada a presença dos seguintes genes: *emm*, *brpA*, *fbp*, *gapA*, *hyl*, *inlA*, *lmb*, *sagA*, *scpB*, *ska*, *slo* e *speG*. Em contrapartida, não foram detectados em todas as amostras os seguintes genes: *spdI*, *speC*, *speK*, *speL* e *speM*. Em relação ao gene que codifica uma subunidade do pilus, as amostras apresentaram antagonismos quanto a sua presença. Desse modo, tal gene foi detectado nas amostras 81-681, 81-724 e 83-060. Na amostra 84-030 esse gene não foi detectado (Tabela 7).

Tabela 7 – Genes de virulência nas amostras de SDSE de origem humana e equina.

Genes de virulência	Amostras bacterianas			
	81-681 H	81-724 H	84-030 E	83-060 E
<i>emm</i>	+	+	+	+
<i>brpA</i>	+	+	+	+
<i>pilus</i>	+	+	-	+
<i>fbp</i>	+	+	+	+
<i>gapA</i>	+	+	+	+
<i>hyl</i>	+	+	+	+
<i>inlA</i>	+	+	+	+
<i>lmb</i>	+	+	+	+
<i>sagA</i>	+	+	+	+
<i>scpB</i>	+	+	+	+
<i>ska</i>	+	+	+	+
<i>slo</i>	+	+	+	+
<i>spdI</i>	-	-	-	-
<i>speC</i>	-	-	-	-
<i>spegG</i>	+	+	+	+
<i>speK</i>	-	-	-	-
<i>speL</i>	-	-	-	-
<i>speM</i>	-	-	-	-

+, Presença do gene; -, ausência do gene;

H, amostra isolada de hospedeiro humano; E, amostra isolada de hospedeiro equino.

5.3. Capacidade das amostras de SDSE de formar biofilme.

A aptidão das amostras para formar biofilme em superfície de vidro foi avaliada. Após a análise da densidade óptica, as amostras 81-681 e 83-060 apresentaram $DO_{600nm} \leq 0,099$. Dessa forma, foram classificados como não produtoras de biofilme. Por outro lado, as amostras 81-724 e 84-030 obtiveram $0,1 < DO_{600nm} \leq 0,299$, sendo classificadas como produtores de biofilme fraco (Tabela 8).

Tabela 8 – Avaliação da produção de biofilme por SDSE isolados de humanos e equinos.

Amostra	DO _{600nm} (M ± DP)	Fenótipo de Biofilme
81-681 H	0,074 ± 0,012	Não produtor
81-724 H	0,285 ± 0,160	Produtor de biofilme fraco
84-030 E	0,145 ± 0,105	Produtor de biofilme fraco
83-060 E	0,022 ± 0,006	Não produtor

H, amostra isolada de hospedeiro humano; E, amostra isolada de hospedeiro equino; M ± DP, média ± desvio padrão.

5.4. Adesão e invasão às células 16HBE14o-

Para esse experimento, foram escolhidos ao acaso um representante de cada grupo. Dessa forma, a amostra 81-681 foi selecionada para representar os SDSE isolados de humanos e a amostra 84-030 os de equinos.

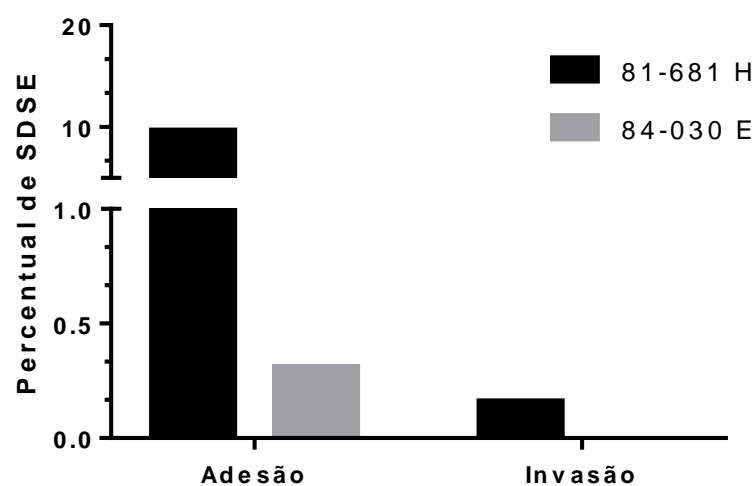


Figura 9 – Percentagem de adesão e invasão de SDSE de origem humana e equina às células 16HBE14o-. H, amostra isolada de hospedeiro humano; E, amostra isolada de hospedeiro equino.

Ambas as amostras apresentaram capacidade de aderir às células brônquicas humanas (16HBE14o-), mas divergiram quanto a capacidade de invasão (Figura 9). A amostra isolada de humano apresentou uma capacidade de adesão muito maior (31 vezes) quando comparada a isolada de equino. Para o representante isolado de equino (84-030) apenas 0,31% ± 0% das células foram capazes de aderir, enquanto 9,66% ± 0% das células bacterianas isoladas de humanos (81-681) exibiram essa competência. Quanto a habilidade de invasão, apenas a amostra isolada de humano (81-681) exibiu essa aptidão em 0,16% ± 0% das suas células, sendo classificada como fracamente invasiva (Figura 9).

5.5. Sobrevivência de *C. elegans* frente a amostras de SDSE isoladas de humanos e equinos.

A sobrevivência de *C. elegans* foi avaliada frente às 4 amostras de SDSE (Figura 10). No primeiro dia do ensaio, os nematoides testados frente à amostra 81-724 apresentaram a menor taxa de sobrevivência ($16,0\% \pm 6,4\%$), enquanto a 83-060 exibiu a maior ($43,5\% \pm 7,6\%$). Ao final do primeiro dia a taxa de sobrevivência frente às amostras de SDSE oriundas de humanos foi de $20,3\% \pm 4,8\%$, significativamente menor ($p < 0,01$) que para os isolados de equinos ($34,8\% \pm 5,8\%$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Ensaio de *killing* de *C. elegans* frente a amostras de SDSE de origem humana e bovina.

Amostras de SDSE	% diária de sobrevivência de <i>C. elegans</i>		
	1º dia (M ± DP)	2º dia (M ± DP)	3º dia (M ± DP)
81-681 H	24,3 ± 7,1	18,4 ± 6,4	12,5 ± 5,52
81-724 H	16,0 ± 6,4	9,6 ± 5,1	8,0 ± 4,7
84-030 E	19,3 ± 7,9	12,9 ± 6,7	5,4 ± 4,6
83-060 E	43,5 ± 7,6	31,9 ± 7,1	20,2 ± 6,1
SDSE isolados de humanos	20,3 ± 4,8	14,1 ± 4,2	10,3 ± 3,7
SDSE isolados de equinos	34,8 ± 5,8	25,0 ± 5,3	14,8 ± 4,3
Controle <i>E.coli</i> OP50	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0

H, amostra isolada de hospedeiro humano; E, amostra isolada de hospedeiro equino; M ± DP, média ± desvio padrão.

Como esperado, no segundo dia de ensaio, as taxas de sobrevivência sofreram mais quedas. Os nematoides expostos a amostra 81-724 permaneceram apresentando a menor taxa ($9,6\% \pm 5,1\%$) e, frente a 83-060, a maior ($31,9\% \pm 7,1\%$). No terceiro dia de experimento, a amostra 84-030, que vinha apresentando resultados próximos ao da amostra 81-724, promoveu a menor taxa de sobrevivência, apenas $5,4\% \pm 4,6\%$, enquanto a amostra 83-060, permaneceu exibindo a maior taxa de $20,2\% \pm 6,1\%$.

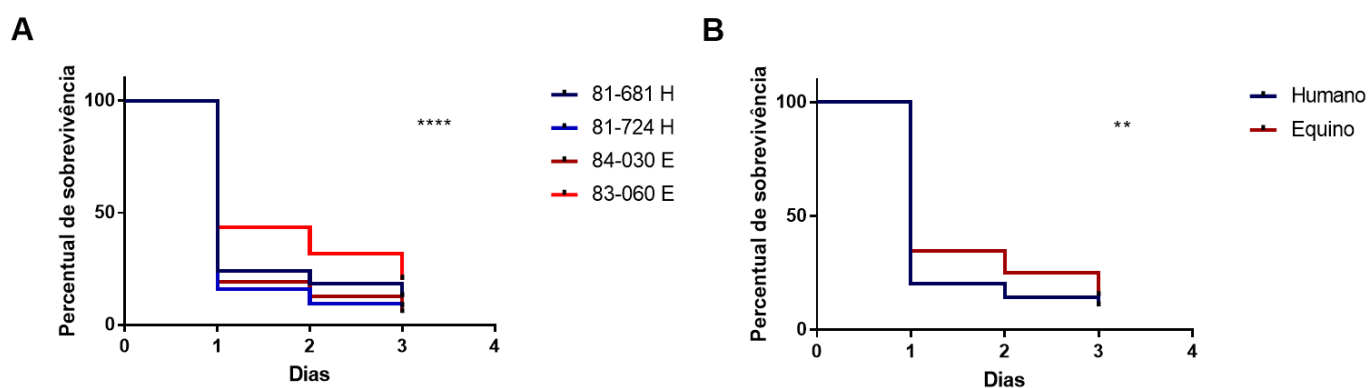


Figura 10 – Curva de sobrevivência de *C. elegans* frente a amostras de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. **A.** Análise das amostras de SDSE de forma individualizada. **B.** Curva de sobrevivência média de *C. elegans* na presença de amostras de SDSE de origem humana(H) e isoladas de equinos (E). ****, $p < 0,0001$; **, $p < 0,01$.

Há diferença significativa quando analisamos, ao final do terceiro dia, a capacidade das amostras de SDSE de origem humana ($10,3\% \pm 3,7\%$) em relação às de equino ($14,8\% \pm 4,3\%$) de causarem a morte do *C. elegans*. De fato, as amostras de humanos são mais aptas a provocarem menores taxas de sobrevivência, mesmo assim ambos os isolados são capazes de levar a morte do nematoide (Tabela 9; Figura 10).

5.6. Sobrevivência de *C. elegans* frente a SDSE isoladas de humanos e equinos na presença de N-acetilcisteína (NAC) e de butionina sulfoximina (BSO).

A sobrevivência de *C. elegans* foi avaliada na presença de N-acetilcisteína (NAC) frente as 4 amostras de SDSE. Todas as amostras apresentaram uma taxa de sobrevivência maior (Tabela 10; Figura 11) quando comparadas ao experimento sem a presença de NAC (Tabela 9). Tal resultado poderia sugerir que o peróxido de hidrogênio possa atuar na morte de *C. elegans*.

Tabela 10 – Ensaio de *killing* de *C. elegans* frente amostras de SDSE na presença de N-acetilcisteína (NAC).

Amostras de SDSE	% diária de sobrevivência de <i>C. elegans</i> com adição de NAC		
	1º dia (M ± DP)	2º dia (M ± DP)	3º dia (M ± DP)
81-681 H	57,1 ± 9,4	37,1 ± 9,1	30,5 ± 8,7
81-724 H	84,6 ± 7,6	59,3 ± 10,4	58,2 ± 10,1
84-030 E	72,2 ± 8,9	57,7 ± 9,8	50,5 ± 9,9
83-060 E	64,9 ± 9,6	51,1 ± 10,0	27,7 ± 8,9
SDSE isoladas de humanos	69,9 ± 6,4	47,4 ± 7,0	43,9 ± 6,9
SDSE isoladas de equinos	68,6 ± 6,6	54,4 ± 7,0	39,3 ± 6,9

H, amostra isolada de hospedeiro humano; E, amostra isolada de hospedeiro equino; M ± DP, média ± desvio padrão.

Ao fim do último dia de experimento, foi possível observar que os *C. elegans* postos em contato tanto com as amostras isoladas de humanos (43,9% ± 6,9%) quanto de equinos (39,3% ± 6,9%) apresentaram maiores taxas de sobrevivência quando comparadas ao ensaio sem a presença de NAC. A maior taxa de sobrevivência foi registrada frente a amostra 81-724 (84,6% ± 7,6%; 59,3% ± 10,4%; 58,2% ± 10,1%), seguida pela amostra 84-030 (72,2% ± 8,9%; 57,7% ± 9,8%; 50,5% ± 9,9%) (Tabela 10).

Porém, quando as amostras isoladas de humanos são comparadas as isoladas de equinos, não houve diferença significativa entre as taxas de sobrevivência na presença de NAC (Figura 11).

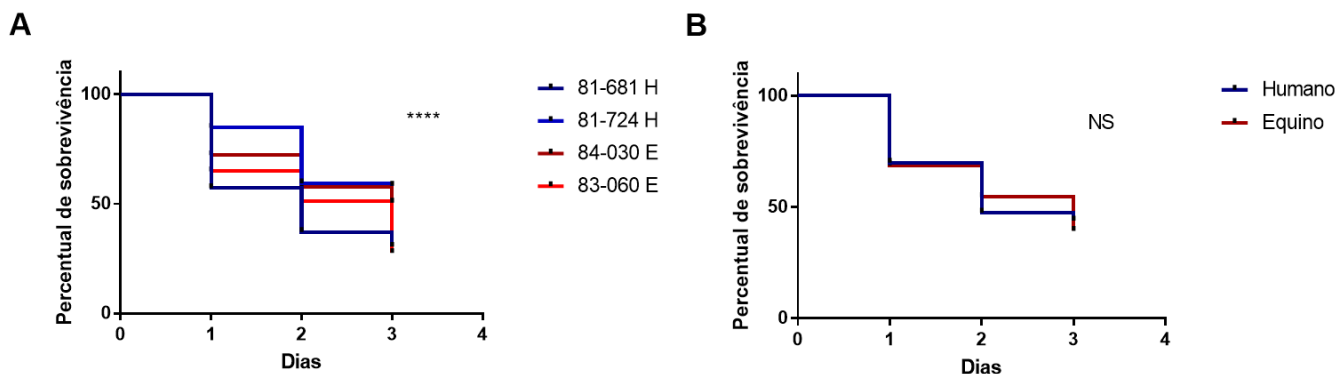


Figura 11 – Curva de sobrevivência de *C. elegans* na presença de N-acetilcisteína (NAC) frente a amostras de SDSE. SDSE H, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolada de humanos; SDSE E, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolada de equino. **A.** Análise das amostras de SDSE de forma individualizada. **B.** Curva de sobrevivência média de *C. elegans* na presença de amostras de SDSE de origem humana(H) e isoladas de equinos (E). *****, $p < 0,0001$; NS, não significante.

A sobrevivência de *C. elegans* frente as amostras de SDSE foi igualmente avaliada na presença de butionina sulfoximina (BSO). Todas as amostras apresentaram uma taxa de sobrevivência extremamente próxima (Figura 12) aos experimentos sem a presença de

BSO e NAC (Tabela 9; Figura 10). Esse dado reforça ainda mais que o peróxido de hidrogênio não é o único fator determinante na morte de *C. elegans*.

Tabela 11 – Ensaio de *killig* de *C. elegans* frente a amostras de SDSE na presença de butionina sulfoximina (BSO).

Amostras de SDSE	% diária de sobrevivência de <i>C. elegans</i> com adição de BSO		
	1º dia (M ± DP)	2º dia (M ± DP)	3º dia (M ± DP)
81-681 H	11,7 ± 5,7	10,0 ± 5,3	9,2 ± 5,1
81-724 H	12,0 ± 4,9	9,6 ± 4,4	9,0 ± 4,3
84-030 E	20,7 ± 6,8	13,3 ± 5,7	9,6 ± 4,9
83-060 E	59,8 ± 8,0	40,1 ± 8,0	35,9 ± 7,8
SDSE isoladas de humanos	11,8 ± 3,7	9,7 ± 3,4	9,4 ± 3,4
SDSE isoladas de equinos	40,8 ± 5,8	27,1 ± 5,2	23,1 ± 4,9

H, amostra isolada de hospedeiro humano; E, amostra isolada de hospedeiro equino; M ± DP, média ± desvio padrão).

A amostra 83-060 apresenta altas taxas de sobrevivência em todos os 3 dias do experimento: 59,8% ± 8,0%; 40,1% ± 8,0% e 35,9% ± 7,8%. Já as amostras 81-681 e 81-724, ambas isoladas de humanos, exibiram taxas extremamente próximas durante toda a experimentação. Porém, a taxa de sobrevivência dos *C. elegans* expostos à essas representantes permaneceram relativamente constantes durante os dois últimos dias, provavelmente devido ao fato do BSO se dissolver com o passar dos dias, e os nematoides serem aptos a recuperarem suas defesas naturais ao peróxido de hidrogênio. Em relação a amostra 84-030, essa apresentou taxas maiores do que as dos isolados de humanos, mas menores quando comparada a amostra 83-060 (Tabela 11).

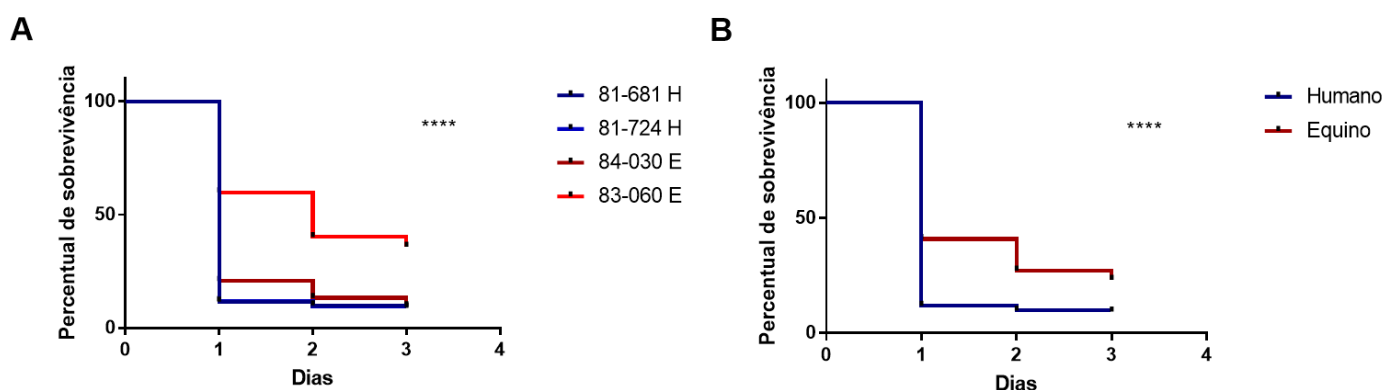


Figura 12 – Curva de sobrevivência de *C. elegans* na presença de butionina sulfoximina (BSO) frente a amostras de SDSE. SDSE H, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolada de humanos; SDSE E, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolada de equino. **A.** Análise das amostras de SDSE de forma individualizada. **B.** Curva de sobrevivência média de *C. elegans* na presença de amostras de SDSE de origem humana(H) e isoladas de equinos (E). *****, $p < 0,0001$.

Com a comparação entre as amostras, é possível observar que as provenientes de equinos levaram a uma significativamente maior taxa de sobrevivência do *C. elegans*. O que leva a pensar que as amostras de humanos possam apresentar maior virulência (Tabela 11; Figura 12).

5.7. Microscopia óptica de Contraste de Interferência Diferencial (CID) de *C. elegans* mantido na presença de SDSE.

C. elegans foram observados por microscopia óptica de Contraste de Interferência Diferencial (CID) após a interação com amostras de SDSE por 48 horas. Para controle, foram também avaliados *C. elegans* que tiveram contato apenas com *E. coli* OP50, onde é possível observar a estruturação saudável do animal (Figura 13).

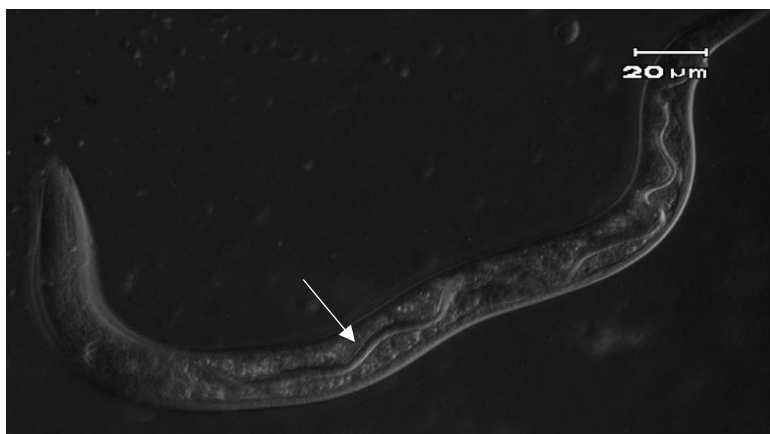


Figura 13 – Microscopia óptica de *C. elegans* crescidos na presença da cepa controle *E. coli* OP50. Seta branca aponta para o tubo digestivo do nematoide.

A amostra 81-681 foi selecionada ao acaso para representar as amostras provenientes de humanos. Os nematoides expostos a esta amostra apresentaram sua cutícula intacta, mas diversas alterações morfológicas internas e um acúmulo de células bacterianas ao longo do corpo do verme foram observadas (Figura 14C). Modificações em todo o tubo digestivo do animal, que impediram sua visualização (Figura 14C), presença de bolhas apoptóticas (Figura 14A) e endotoquia matricida, fenômeno que impede a oviposição do animal, culminando na eclosão interna dos ovos e liberação da progênie dentro do corpo do próprio progenitor (Figura 14B; Figura 14C), também foram observadas.

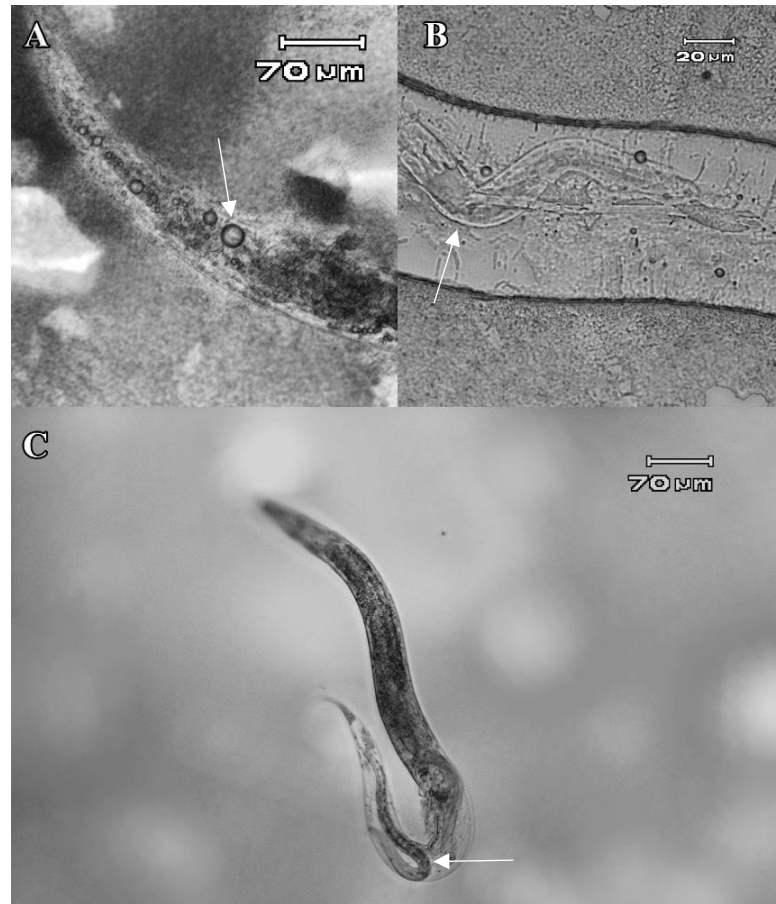


Figura 14 – Microscopia óptica de *C. elegans* crescidos na presença de SDSE isolada de hospedeiro humano (amostra 81-681). Setas apontam para: A – formação de bolhas apoptóticas; B – endotoquia matricida; C - alterações no tubo digestivo e endotoquia matricida.

A amostra 84-030 foi escolhida ao acaso entre as isoladas de equino. Os nematoides submetidos a essa amostra não apresentaram tantas alterações morfológicas quanto os expostos a 81-681. A cutícula do animal também permaneceu intacta, porém foi possível detectar alterações na sua estrutura interna, inclusive no tubo digestivo (Figura 15A; Figura 15C). No entanto, não foi observado o fenômeno de endotoquia matricida, apesar de ser possível detectar os ovos no útero do nematoide (Figura 15B; Figura 15C).

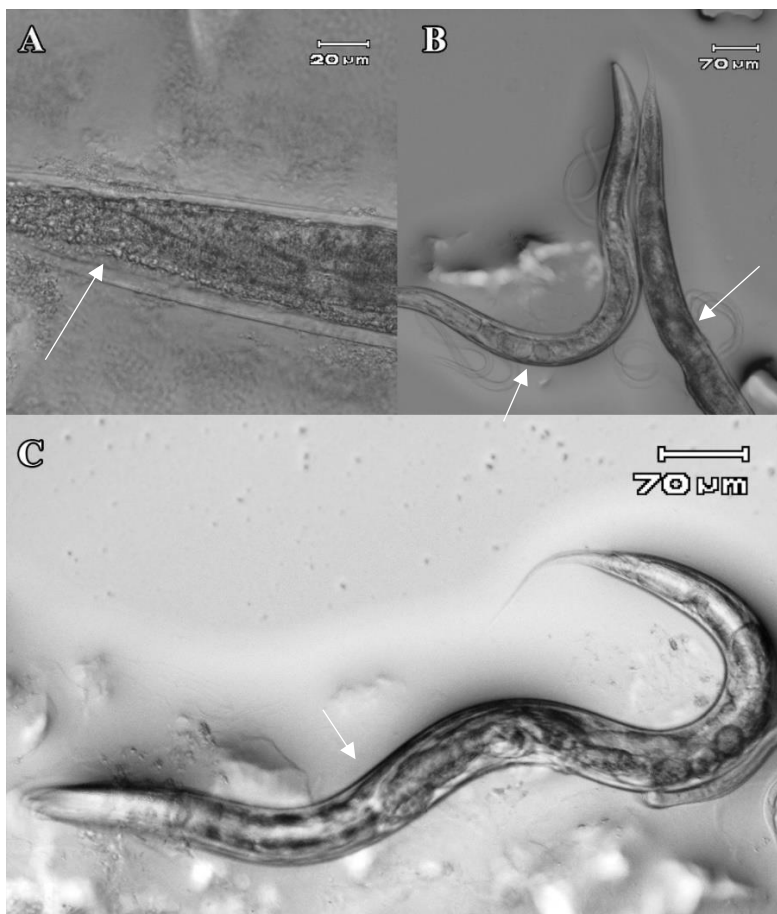


Figura 15 – Microscopia óptica de *C. elegans* crescidos na presença de SDSE isolada de hospedeiro equino (84-030). Setas apontam para: A – Alterações morfológicas internas; B e C – ovos intactos e alteração do tubo digestivo.

Ambas as amostras foram capazes de provocar alterações morfológicas em *C. elegans*. Porém, a amostra de SDSE de origem humana promoveu maior variedade de alterações no verme quando comparada com a isolada de equino.

5.8. Preferência olfativa de *Caenorhabditis elegans*.

As mesmas amostras selecionadas para o estudo da morfologia celular foram utilizadas nos estudos de preferência olfativa. Primeiramente, as representantes foram confrontadas com a cepa controle de *E. coli* OP50 utilizando nematoides que receberam ou não treinamento prévio. Dessa forma, os nematoides, ao serem transferidos para a placa teste, puderam escolher de qual microrganismos iriam se alimentar, SDSE ou *E. coli* OP50, e deslocar-se até eles.

Foi possível observar que a preferência dos animais foi para a cepa controle *E. coli* OP50 (não patogênica para ele). Em todas as situações em que foi possível a escolha

da cepa controle, a maioria dos nematoides depositados nas placas teste optaram por ela (índice de escolha 1).

O Índice de escolha de *C. elegans* expostos a amostras representante dos isolados de equinos foi de $0,73 \pm 0,06$ para os nematoides treinados e $0,56 \pm 0,10$ para os animais não treinados. Já o índice de escolha do nematoide para a amostra representante dos isolados de humanos foi de $0,64 \pm 0,19$ para os animais que receberam treinamento prévio e $0,57 \pm 0,21$ para os que não receberam. Ao comparar o índice de escolha, tanto para os nematoides treinados quanto para os não treinados, entre SDSE de equino x *E. coli* e SDSE de humano x *E. coli*, apesar de apresentar uma ligeira diferença entre eles, essa não foi significativa (Figura 16).

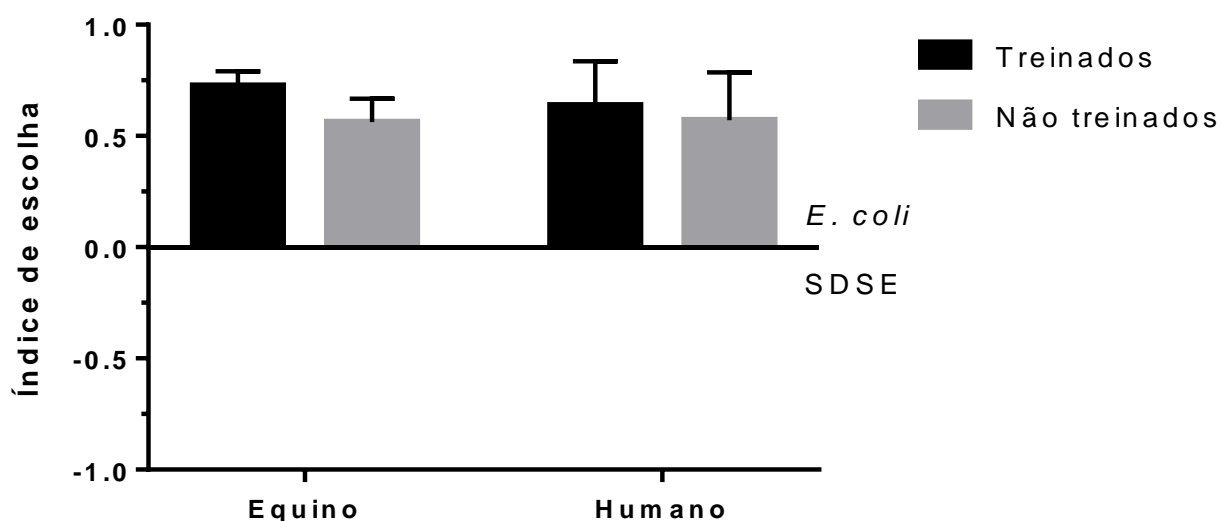


Figura 16 – Ensaio de escolha binária de *C. elegans* entre amostras de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isoladas de humano (81-681) ou equino (84-030) e *E. coli* OP50.

Em um segundo momento, as representantes de SDSE originárias de hospedeiro humano e equino foram confrontadas entre si.

Nesse teste, cerca de 99% dos animais optaram por nenhum microrganismo e aproximadamente 1% deles escolheram a amostra 84-030, proveniente de equino (+1). O índice de escolha foi de $0,031 \pm 0,08$ para os nematoides treinados e $0,021 \pm 0,04$ para os não treinados (Figura 17).

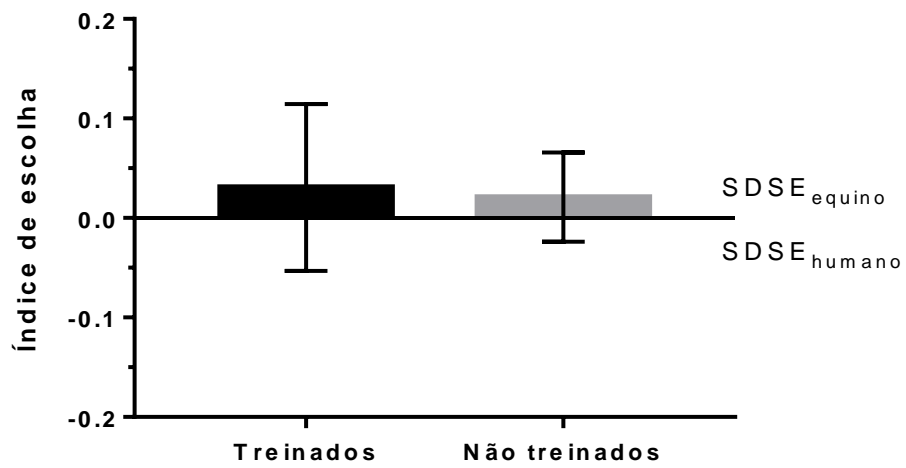


Figura 17 – Ensaio de escolha binária de *C. elegans* entre amostras de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isoladas de humano (81-681) e *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isoladas de equinos (84-030).

6. DISCUSSÃO

No ano de 2019 presenciamos o início de uma das maiores pandemia já vividas pela humanidade e que permanece até os dias atuais, causada pelo vírus SARS-CoV-2. Acredita-se que a pandemia se deu início através da transmissão por hospedeiro intermediário para humanos, via contato direto. Dessa forma, um patógeno exclusivo de outros animais adaptou-se para um novo hospedeiro: o homem (Harrison, Lin e Wang, 2020; Kirtipal, Bharadwaj e Kang, 2020). Zoonoses bacterianas também são comuns, e podem ser transmitidas por diversas vias, tais como: contato direto com animais ou material infectado, mordidas e arranhões de animais, vetores artrópodes e consumo de alimentos contaminados. Às vezes, os microrganismos podem ser transmitidos por várias das vias, o que torna as medidas de controle mais ineficientes (Chikeka e Dumler, 2015). São infecções advindas da adaptação do microrganismo a um novo hospedeiro.

O surgimento dos antibióticos no século XX revolucionou a biomedicina moderna e possibilitou melhoras significativas em pacientes com prognósticos, até então, fatais. Assim, a utilização desses medicamentos proporcionou um aumento expressivo na expectativa de vida em populações ao redor de todo o mundo. Todavia, após o desenvolvimento desses agentes terapêuticos, o seu uso indiscriminado auxiliou o surgimento de microrganismos resistentes que, por sua vez, levaram a necessidade do desenvolvimento de novas gerações de antibióticos, e assim sucessivamente. Em 2019, a situação foi agravada com a pandemia ocasionada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2. A prescrição de antibióticos como medida profilática tornou-se uma prática comum, o que deve gerar um problema futuro em relação a resistência bacteriana. Dessa forma, o monitoramento de novas zoonoses e da resistência torna-se primordial (Ahmad e Khan., 2019; Cantón, Gijón e Ruiz-Garbajosa., 2020; Rawson *et al.*, 2020).

A penicilina é o fármaco de primeira escolha para tratar infecções por SDSE. Todas as amostras aqui estudadas apresentaram sensibilidade a esse antimicrobiano, com concentrações mínimas inibitórias (CMI) para a droga menores do que os *cutoff* preconizados pelo CLSI. Vale ressaltar que as amostras analisadas foram isoladas entre os anos de 1981 e 1984 e, mesmo assim, ainda refletem com exatidão o perfil atual de susceptibilidade à penicilina (Hashikawa *et al.*, 2004; Biedenbach *et al.*, 2006; Takahashi, Ubukata e Watanabe, 2011; Silva, 2012; Ikebe, T. *et al.*, 2018). Uma possível resistência intermediária à tal antibiótico foi relatada em 1997 (Wu *et al.*, 1997), e em 2016 foram

detectadas 4 amostras de SDSE resistentes à penicilina devido a produção de PBPs alteradas, onde duas apresentavam MIC de 0,5 mg/L e as demais de 2 mg/L (Fuursted *et al.*, 2016). No entanto, esses resultados nunca foram confirmados por centros de referência. Trabalhos mais recentes não têm encontrado amostras de SDSE resistentes a penicilina, porém os resultados de Fuursted *et al.* (2016) alertam para a necessidade de vigilância dos SDSE quanto a essa resistência.

Em indivíduos que apresentam alergia aos β -lactâmicos, outros agentes antimicrobianos são recomendados no tratamento, como a eritromicina e a clindamicina. Quanto a esses antibióticos, todas as amostras testadas neste estudo apresentaram susceptibilidade a clindamicina e resistência a eritromicina. O fenótipo M de resistência (sensibilidade a clindamicina e resistência a eritromicina) exclui a oportunidade da utilização da eritromicina como uma alternativa terapêutica, o que resulta em uma grande complicação para os pacientes que apresentam impossibilidade do uso de β -lactâmicos. Os fenômenos observados em relação a esses dois últimos fármacos condizem com o observado na literatura. A resistência à eritromicina é, de fato, mais relatada do que à clindamicina (Kataja, 1998; Kataja, 1999; Lloyd, Jacob e Menon, 2007; Vélez *et al.*, 2017).

Nesse estudo, tanto as amostras isoladas de humanos, quanto as isoladas de equinos apresentaram perfil fenotípico idêntico (fenótipo M). Isso pode ser explicado devido ao fato de tais agentes antimicrobianos serem administrados, inclusive profilaticamente, em diversos animais, principalmente em animais de fazenda. O uso imprudente de tais medicamentos podem levar a resistência, através de uma pressão seletiva nos microrganismos pelo uso de doses subletais. Tais doses, por sua vez, alcançam a população humana por meio da contaminação do ambiente, de alimentos, de rios, lençóis freáticos e outros (Ahmad e Khan, 2019).

Em relação aos aspectos genotípicos, nenhuma das amostras possuem o gene *ermB*, mas todas apresentam o *mef*. A divergência entre os isolados está justamente no gene *ermA*, o qual está presente nas amostras 81-724 H e 83-060 E é ausente nas amostras 81-681 H e 84-030 E. Sabe-se que tais genes estão envolvidos com a resistência aos macrolídeos e/ou lincosaminas, sendo o *mef* codificante de uma proteína de efluxo de macrolídeos e os *ermA* e *ermB* codificantes de rRNA metilases (Giovanetti *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2020). Em 2011, Takahashi, Ubukata e Watanabe fizeram uma relação entre os genes e os fenótipos de resistência, a qual associaram a presença do *mef* ao fenótipo M, *ermA* ao MLS_B induzido e *ermB* ao MLS_B constitutivo. Porém, nos parece que tal

associação não deve ser generalizada, uma vez que no atual estudo, duas amostras apresentaram o gene *ermA* assim como o *mef*, sendo observado o fenótipo M ao invés do MLS_B induzido.

Os macrolídeos atuam inibindo o alongamento da cadeia proteica nos ribossomos. Essas moléculas se ligam a subunidade 50S e fecham a passagem dos aminoácidos, o que leva ao bloqueio da tradução bacteriana. Porém, tanto as amostras isoladas de animais, quanto as de humanos apresentam resistência à eritromicina e a presença de, pelo menos, um gene envolvido com esse fenótipo. As amostras 81-681 H e 84-030 E possuem apenas o gene *mef* e, por isso, utilizam transportadores membranares (bombas de efluxo) para expulsarem tal antimicrobiano do espaço intracelular bacteriano. Essas proteínas são ativas apenas na presença de macrolídeos com 14-15 átomos. A alta incidência do gene *mef* nas amostras pode ser explicada devido a sua presença em um transposon de profagos, permitindo a transferência de tal material genético (Iannelli *et al.*, 2014).

Já as amostras 81-724 H e 83-060 E apresentam, além do *mef*, o *ermA*, que codifica metilases. Tais enzimas são capazes de ocasionar alterações no sítio de ação dos macrolídeos através de metilações na subunidade 50S do ribossomo, o que impede a ligação do antibiótico (Seppala *et al.*, 1998). Tal gene está, de fato, relacionado ao fenótipo MLS_B , mas o observado em questão foi certamente o fenótipo M, sendo necessário um estudo mais aprofundado em relação a expressão desses genes nas amostras citadas.

A transferência horizontal de genes entre *S. pyogenes* e SDSE é descrita na literatura, assim como a transferência dentro da mesma espécie (SDSE para SDSE) (McNeilly. e McMillan., 2014). Cepas de SDSE que causam infecções sintomáticas em animais podem ser transmitidas de forma assintomática para humanos, onde irão interagir com outros estreptococos e adquirir genes de virulência, podendo ocasionar posteriormente uma infecção sintomática (Lefébure *et al.*, 2012; McNeilly. e McMillan., 2014; Ciszewski e Szewczyk., 2017). Esse fato corrobora com os resultados encontrados em nosso estudo, pois em animais as infecções eram sintomáticas, ao contrário das observadas em humanos. Normalmente, as infecções de SDSE são de origem endógena (Efstratiou *et al.*, 1994; Brandt e Spellerberg., 2009). Porém, outros achados constataam a transmissão desse microrganismo entre humanos e animais. Um estudo realizado na Austrália observou a presença de uma cepa idêntica presente em uma criança e em seu cachorro de estimação, provavelmente devido à forte convivência entre ambos (Schrieber *et al.*, 2014). Entretanto, um outro trabalho realizado no Brasil constatou a transmissão

de cepas de SDSE idênticas entre humanos e equinos de diferentes localidades, provando a circulação em diferentes hospedeiros de ST129 (Silva *et al.*, 2015). Em ambos os estudos, SDSE exibiu características genéticas típicas dos isolados humanos. Em nosso estudo demos continuidade ao trabalho de Silva, assim, os isolados de diferentes hospedeiros apresentaram características genotípicas semelhantes, mas divergiram em relação as algumas fenotípicas. Dessa forma, podemos observar que as amostras provindas de humanos parecem apresentar maior potencial patogênico do que as de equinos.

No presente estudo, todas as amostras foram classificadas no tipo *emm stC6979*. Sabe-se que a prevalência de determinados tipos *emm* variam geograficamente, e, ainda assim, é possível associá-los com a incidência de infecções invasivas por SDSE (McDonald *et al.*, 2007). Vários estudos observaram a ocorrência do tipo *emm stC6979*. Uma pesquisa realizada na Finlândia relatou que tal tipo *emm* era um dos mais prevalentes em infecções invasivas (Rantala *et al.*, 2010; Vähäkuopus *et al.*, 2011). Além disso, esse tipo *emm* foi o mais encontrado entre as amostras pertencentes ao clone B (56,5%), o qual é um dos dois clones mais prevalentes e virulentos entre as amostras brasileiras de SDSE (Santos *et al.*, 2020).

As amostras avaliadas exibiram uma gama de fatores de virulência em comum com *S. pyogenes*, o que era esperado devido à grande similaridade entre as espécies. Entre os genes de superantígenos, o *speG* foi o único encontrado, o que está de acordo com o descrito na literatura que indicam este como o superantígeno mais presente em SDSE (Babbar *et al.*, 2018). Desse modo, tanto as amostras isoladas de humanos, quanto as isoladas de equinos apresentaram perfil de virulência extremamente similar, com diferença em apenas um gene na amostra 84-030 E. Tal amostra não possui o gene que codifica uma subunidade do *pilus*, identificada pelo par de *primers* utilizado, ao contrário da outra amostra de origem equina. O gene do *pilus* está diretamente relacionado à adesão e formação de biofilme (Manetti *et al.*, 2007; Manetti *et al.*, 2010; Becherelli *et al.*, 2012; Kimura *et al.*, 2012). A ausência desse gene pode ser explicada pelo fato de determinados fatores de virulência serem importantes para a colonização em humanos, e não tão imprescindíveis para infecções em animais. Assim, sua ausência supõe que o processo de adaptação a diferentes hospedeiros pode vir a alterar as características de virulência de SDSE (Ciszewski e Szewczyk., 2017). Por outro lado, talvez o processo de adesão em SDSE seja multifatorial, assim, outros genes além do *pilus* estariam atuando, tornando-o não tão essencial.

Algumas falhas terapêuticas no uso de antibióticos podem ser explicadas devido a produção de biofilme. Cateteres implantados são comumente alvos de microrganismos para a formação de tal matriz, o que leva ao favorecimento de infecções, principalmente invasivas (Conley *et al.*, 2003; Baldassarri *et al.*, 2006; Ogawa *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2012; Rantala e Touhinen., 2014; Alves-Barroco *et al.*, 2019). A produção de biofilme por *Streptococcus* é bem estabelecida na literatura desde o início do século XXI (Loo, Corliss e Ganeshkumar, 2000). Uma vasta gama de espécies pertencentes a esse gênero é capaz de formar biofilme, dentre elas destaca-se *S. pyogenes* (Corcuera *et al.*, 2013; Shak *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2014; Rosini e Margarit, 2015; Klein *et al.*, 2015). Porém, a descoberta da capacidade de formação de biofilme em SDSE ocorreu apenas em 2015 (Genteluci *et al.*, 2015).

Como dito anteriormente, apenas a amostra 84-030 E apresentou ausência do gene para uma subunidade de *pilus*, também envolvido com a aderência e formação de biofilme (Manetti *et al.*, 2010; Becherelli *et al.*, 2012; Kimura *et al.*, 2012). Em 2007, Manetti observou que cepas de *S. pyogenes* com o gene do *pilus* nocauteado eram incapazes de formar essa matriz (Manetti *et al.*, 2007). No nosso estudo, as amostras 81-681 H e 83-060 E foram classificadas como não produtoras de biofilme. A isolada 81-724 H foi classificada como produtor fraco. A amostra que não apresentava o gene da subunidade de *pilus*, a 84-030 E, também foi classificada como produtora de biofilme fraco. Ou seja, o gene *pilus* não foi essencial para que a amostra pudesse formar um biofilme fraco. Esse gene provavelmente, tem uma importância maior para a colonização em humanos, pois todas as cepas apresentaram o gene, mas tornou-se optativo em equinos por outros mecanismos atuarem na formação desse biofilme. Dessa forma, mais estudos são necessários para elucidar a importância do *pilus* para colonização e formação de biofilme em ambos os hospedeiros. A análise genotípica da formação de biofilme revelou que todas as amostras analisadas nesse estudo possuíam *brpA*, um gene importante para o desenvolvimento dessa matriz. Em 2019, Alves-Barroco observou que cepas de SDSD mutantes deficientes em *brpA* eram capazes de se ligar e se estabelecerem em uma superfície, mas não eram aptas a desenvolverem biofilmes maduros.

Diferente do observado em nossa análise, muitos estudos de biofilme formado por EGB mostram que as cepas obtidas de animais apresentam produção elevada em relação as provindas de humanos (Parker *et al.*, 2016; Pang *et al.*, 2017). Quando comparamos as duas amostras produtoras fracas observamos que na de origem humana a produção de biofilme é maior e essa se aproxima de ser classificada como produtora moderada. Os

humanos dos quais foram isoladas essas amostras estavam assintomáticos. Esse fato também já foi observado em EGB, nos quais isolados de pacientes sintomáticos apresentam menor capacidade de produzirem biofilme quando comparados aos portadores sem sintomas. Esses resultados devem ser melhor estudados para melhor compreendermos a relação entre infecções assintomáticas e a produção de biofilme (Kaur *et al.*, 2009; Parker *et al.*, 2016).

Tanto o processo de adesão, quanto o de invasão são essenciais durante a patogênese de infecções por espécies de *Streptococcus* para o estabelecimento da doença. Os microrganismos aderem e invadem às superfícies dos sítios infecciosos por meio de interações proteicas entre as células procarióticas e eucarióticas, mas, para isso, precisam superar obstáculos como: forças eletrostáticas e mecânicas, respostas fisiológicas e, principalmente, a competição com microrganismos pertencentes a microbiota normal (Jenkinson e Lamont, 1997; Nobbs, Lamont, e Jenkinson, 2009). É importante ressaltar que a forte adesão em determinados tecidos é um processo vantajoso. Porém, a capacidade do microrganismo de se desprender de um tecido para infectar outros nichos também é igualmente conveniente. Assim, é imprescindível salientar que a adesão deve ser algo dinâmico e não estático. Para muitos gêneros bacterianos a interação entre a célula invasora e a hospedeira leva a internalização do patógeno pelas células eucarióticas (Dempfle e Mosesson, 2003; Pankov e Yamada, 2002).

A capacidade de invasão e persistência das células bacterianas tem sido uma das hipóteses levantadas para explicar falhas terapêuticas no uso de antibióticos (Conley *et al.*, 2003). Ao invadirem, por meio de invasinas, as células epiteliais, endoteliais ou imunológicas, acabam se protegendo da ação de substâncias externas, como os antimicrobianos. Ademais, a capacidade de invasão fornece um mecanismo eficiente de evasão do sistema imunológico e de disseminação através de diferentes nichos pelo corpo do hospedeiro (Kaplan, Chhatwal e Rohde, 2006; Madigan *et al.*, 2010; Shimomura *et al.*, 2011; Nei *et al.*, 2012; Rohde, Talay e Rasmussen, 2012).

Em relação aos resultados aqui observados, a amostra oriunda de equino apresentou uma capacidade de aderência significativamente menor do que a de humano e não foi capaz de invadir as células 16HBE14o-, que são células epiteliais brônquicas humanas. Curiosamente, essa mesma amostra foi a que não possuía o gene da subunidade do *pilus*. Assim, é possível teorizar a suposta importância desse gene no processo de adesão. É de conhecimento científico que *S. pyogenes* é capaz de invadir e persistir em células eucarióticas (Medina, Rohde e Chhatwal, 2003). Da mesma forma, estudos

descrevem que SDSE também possuem tal capacidade (Rohde, Talay e Rasmussen, 2012; Santos *et al.*, 2020). Silva e colaboradores observaram que amostras de SDSE de origem humana pertencentes ao clone B, o mesmo das amostras aqui analisadas, possuíam maiores percentuais de invasão quando comparadas a outros clones não prevalentes, o que corrobora com os nossos resultados (Silva *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, *C. elegans* foi frequentemente utilizado como modelo animal para diversas experimentações devido a sua alta similaridade genética com mamíferos, curto ciclo de vida, facilidade de cultivo, visualização simples por meio de microscópio invertido e baixo custo (Darby, 2005; Blaxter, 2011). Estudos utilizando esses nematoides e diferentes espécies de *Streptococcus* têm sido realizados para elucidar a forma com que esses microrganismos ocasionam a morte do animal e conseqüentemente entender sua patogênese para o homem (Jansen *et al.*, 2002; Bolm *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2020).

Com base nos resultados de estudos anteriores do nosso laboratório, foi possível observar que os clones mais prevalentes de SDSE encontrados no Brasil, A e B, possuem mais potencial de virulência do que os clones esporádicos e que, possivelmente, utilizam o peróxido de hidrogênio juntamente a outros fatores de virulência na morte dos nematoides (Santos, 2020). Em nosso trabalho, os isolados de SDSE provenientes de equinos e de humanos foram capazes de ocasionar a morte do helminto de forma expressiva e semelhante em meios de cultura sem a adição de NAC ou BSO, sendo a maior diferença evidenciada nos primeiros dias de experimento, onde as amostras humanas foram capazes de levar mais nematoides à morte. Ao adicionarmos o precursor de glutathione, NAC, a sobrevivência do nematoide aumentou cerca de 30% do que o observado sem a presença do sequestrador de H₂O₂, mas não houve diferença ao compararmos a sobrevivência de *C. elegans* frente a amostras isoladas de diferentes hospedeiros. Até então, os resultados tanto de humanos quanto de equinos estavam próximos, com diferença significativa apenas nos primeiros dias do experimento sem NAC. Porém, ao prejudicarmos a defesa do nematoide frente a espécies reativas de oxigênio, de forma a impedir a produção de glutathione por conta da presença de BSO, foi possível observar que as amostras providas de humanos ocasionam significativamente mais mortes quando comparadas ao resultado observado na presença de NAC. No entanto, a sobrevivência dos nematoides expostos as amostras isoladas de equinos aumentam quando comparada ao experimento realizado na ausência de NAC e BSO, mas diminuem quando confrontada ao ensaio suplementado com NAC. Dessa forma, ao compararmos

os dois isolados, podemos constatar que ambas as amostras, apesar de provavelmente utilizarem a produção de H₂O₂ como fator de virulência, também se utilizam de outros mecanismos igualmente fundamentais para causar a morte do animal. Entretanto, as isoladas de humanos parecem apresentar maior patogenicidade ao levarem uma maior percentagem de nematoides à morte.

Em relação às alterações morfológicas características de situações de estresse, tanto os isolados de humanos, quanto os de equinos foram capazes de ocasioná-las. Porém, curiosamente, as amostras isoladas de hospedeiro equino levaram a alterações menos significativas do que as de humanos. As mudanças observadas foram alterações na estrutura interna do animal, como perda da forma dos órgãos. Por outro lado, fenômenos como surgimento de bolhas apoptóticas e endotoquia matricida, onde há eclosão interna dos ovos e as larvas L1 acabam se alimentando dos órgãos da progenitora, apresentaram-se exclusivamente nos nematoides expostos a SDSE isolados de hospedeiro humano. Assim, é possível associar as alterações morfológicas com o estresse causado, supondo uma maior patogênese para as amostras provenientes de humanos. As amostras isoladas de equinos ocasionaram menor estresse e, conseqüentemente, poucas mudanças morfológicas.

Muitos estudos evidenciam a capacidade do nematoide *C. elegans* reconhecer amostras que apresentam maior risco patogênico através de sensações olfativas. Um trabalho publicado em 2002 observou que determinadas moléculas de *Staphylococcus aureus* eram reconhecidas pelos *C. elegans*, e estes se afastavam da cultura bacteriana possivelmente patogênica à eles (Osani *et al.*, 2002). Em 2005, foi constatado que o nematoide possuía preferência olfativa para determinados microrganismos não patogênicos, devido a presença de quimiossensores capazes de induzirem a aversão do animal aos patógenos (Zhang *et al.*, 2005). Ademais, em 2006, foi demonstrada a capacidade de *C. elegans* em detectar moléculas de lactona de homoserina aciladas produzidas por *Pseudomonas aeruginosas*, associando a presença dessas com possíveis patógenos (Beale *et al.*, 2006).

Por conta disso, resolvemos avaliar qual a preferência de *C. elegans* em relação ao controle *E. coli* OP50 e as amostras de SDSE provindas de humanos e equinos. Em nosso estudo, observamos que os nematoides, treinados ou não, têm uma tendência expressiva em optar pela *E. coli* OP50 e afastar-se das amostras de SDSE. Isso ocorre devido ao fato desses animais se alimentarem regularmente de *E. coli* OP50 e, por conta disso, reconhecê-las como agentes não patogênicos. Porém, ao confrontarmos SDSE de

diferentes isolados, percebemos uma tendência do animal em aproximar-se da SDSE isolada de equino, apesar da maior parte optar por nenhuma das duas amostras, o que demonstra o potencial patogênico das amostras de SDSE e a capacidade dos nematoides em reconhecê-las. Ainda assim, há uma preferência do animal por SDSE isolada de equino, que associado aos resultados de sobrevivência e das alterações morfológicas encontradas sugerem que a amostra provinda de humanos é mais virulenta.

O papel patogênico do *S. dysgalactiae* beta-hemolítico no hospedeiro equino tem sido reconhecido, porém as amostras parecem pertencer a uma população geneticamente distinta dentro do táxon de *Streptococcus dysgalactiae* (Pinho *et al.*, 2016). No entanto, uma subpopulação menor, definida por MLST e MLSA parece ser capaz de causar infecções em cavalos, outros animais e humanos, indicando que a transmissão entre hospedeiros de cepas pertencentes a este grupo possa ocorrer (Pinho *et al.*, 2016). O ST129 foi o primeiro ST descrito dentro desse contexto (Silva *et al.* 2015), que apesar de exibir características genotípicas típicas de SDSE isolado de humanos (ST129) foi encontrado promovendo infecção em equinos, sugerindo transmissão zoonótica do humano para o animal, uma evolução inversa ao esquema proposto por Wolfe (Wolfe, Dunavan e Diamond, 2007). No nosso estudo as amostras provenientes de humanos parecem apresentar maior capacidade patogênica nos aspectos analisados. Mesmo assim, outros estudos são necessários para ampliar a investigação do potencial patogênico das amostras aqui utilizadas e entender essa evolução, principalmente utilizando outros modelos.

7. CONCLUSÃO

O atual estudo analisou quatro amostras de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* pertencentes ao grupo C de Lancefield ST129, clone B, isoladas de diferentes hospedeiros, humano e equino, do período de 1981 a 1984. Por conseguinte, com base nos resultados obtidos nesse estudo, podemos concluir que:

- Todas as amostras aqui analisadas são sensíveis a penicilina e clindamicina. Todas são resistentes a eritromicina, apresentando o fenótipo de resistência tipo M. Isso indica a impossibilidade do uso de eritromicina como escolha alternativa para o tratamento. Além disso, chama a atenção para a necessidade de mais estudos em relação a resistência antimicrobiana em SDSE tanto em humanos, quanto em animais. A resistência a eritromicina nessas amostras é mediada pelo gene *mef* e, em algumas, também pelo *ermA*.
- Todas as amostras apresentam proteína M e foram classificadas no tipo *emm* *stC6979*, o mais frequente entre as amostras do clone B de SDSE;
- Tanto os isolados de humanos, quanto os de equinos possuem diversos genes de virulência. Dentro dos testados, apenas o gene para uma subunidade do pilus aparenta ser facultativo em amostras de equinos.
- As amostras 81-724 H e 84-030 E possuem capacidade de produzir biofilmes fracos.
- As amostras isoladas de humanos apresentam maior capacidade de aderir e invadir células humanas 16HBE14o⁻ do que as de equinos.
- Todas as amostras foram capazes de ocasionar alterações morfológicas e levar a morte de *C. elegans*, mas as provindas de humanos levaram ao surgimento de maiores alterações morfológicas.
- *C. elegans* quando tiveram que escolher entre SDSE provinda de humano e de equino, a quase totalidade dos nematoides optou por nenhuma das duas, com menos de 1% optando pela amostra isolada de equino. A preferência sempre era pela amostra de *E. coli* OP50 apontando para o potencial patogênico das amostras de SDSE, independente da origem.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelsalam, M., Chen, S.C. e Yoshida, T. (2010). Dissemination of streptococcal pyrogenic exotoxin G (spg) with an IS-like element in fish isolates of *Streptococcus dysgalactiae*. FEMS Microbiol Lett. 309, 105-113.
- Ahmad, M. e Khan, A.U. (2019). Global economic impact of antibiotic resistance: A review. J. Glob. Antimicrob. Resist. 19, 313-316.
- Alves-Barroco, C., Roma-Rodrigues, C., Balasubramanian, N., Guimarães, M.A., Ferreira-Carvalho, B.T., Muthukumar, J., Nunes, D., Fortunato, E., Martins, R., Santos-Silva, T., Figueiredo, A.M.S., Fernandes, A.R. e Santos-Sanches, I. (2019). Biofilm development and computational screening for new putative inhibitors of a homolog of the regulatory protein *BrpA* in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. Int. J. Med. Microbiol. (3-4), 169-181.
- Altun, Z. F., L. A. Herndon, C. Crocker, R. Lints, e D. H. Hall. (2015) WormAtlas. Disponível em: <http://www.wormatlas.org>.
- Anand, T.D., Rajesh, R., Rajendhran, J. e Gunasekaran, P. (2012). Superantigen profiles of *emm* and *emm*-like typeable and nontypeable pharyngeal streptococcal isolates of South India. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 11, 3.
- Anjos I.H.V. (2019). Avaliação do MALDI-TOF MS como ferramenta para identificação de espécies de *Streptococcus* spp. dos grupos C e G e detecção de biomarcadores para discriminação de clones de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 117f.
- Babbar, A., Itzek, A., Pieper, D.H. e Nitsche-Schmitz, D.P. (2018). Detection of *Streptococcus pyogenes* virulence genes in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* from Vellore, India. Folia Microbiol (Praha), 63(5), 581–586.
- Back, P., Braeckman, B.P. e Matthijssents, F. (2012). ROS in aging *Caenorhabditis elegans*: damage or signaling? Oxid Med Cell Longev, 1–14.
- Baldassarri, L., Creti, R., Recchia, S., Imperi, M., Facinelli, B., Giovanetti, E., Pataracchia, M., Alfarone, G. e Orefici, G. (2006). Therapeutic failures of antibiotics used to treat macrolide-susceptible *Streptococcus pyogenes* infections may be due to biofilm formation. J. Clin. Microbiol. 44, 2721-2727.
- Baracco, G.J. (2019). Infections caused by group C and G *Streptococcus* (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and others): epidemiological and clinical aspects. Microbiol. Spectr. 7(2), 1–11.
- Bargmann, C.I. (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. Science 282, 2028–2033.
- Becherelli, M., Manetti, A.G.O., Buccato, S., Viciani, E., Ciucchi, L., Mollica, G., Grandi, G. e Margarit, I. (2012). The ancillary protein 1 of *Streptococcus pyogenes* FCT-1 pili mediates cell adhesion and biofilm formation through heterophilic as well as homophilic interactions. Mol. Microbiol. 83, 1035–1047.
- Behara, B., Mathur, P., Bhardwaj, N., Jain, N., Misra, M.C., Kapil, A. e Singh, S. (2014). Antibiotic susceptibilities, streptococcal pyrogenic exotoxin gene profiles among clinical isolates of group C or G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* & of group G *S. anginosus* group at a tertiary care centre. Indian J. Med. Res. 139, 438-445.
- Berenguer, J., Sampedro, I., Cercenado, E., Baraia, J., Rodríguez-Créixems, M. e Bouza, E. (1992). Group-C β -hemolytic streptococcal bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis. 15(2), 151–155.
- Bert, F., Branger, C., Poutrel, B. e Lambert-Zechovsky, N. (1997). Differentiation of human and animal strains of *Streptococcus dysgalactiae* by pulsed-field gel electrophoresis. FEMS Microbiol. Lett., 150(1), 107–112.
- Biedenbach, D. J., Toleman, M.A., Walsh, T.R. e Jones, R.N. (2006). Characterization of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). Diagn Microbiol Infect Dis. 55, 119-127.

- Bolm, M., Jansen, W.T.M., Schnabel, R. e Chhatwal, G.S. (2004). Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans*: a common feature of different streptococcal species. *Infect. Immun.* 72, 1192–1194.
- Beale, E., Li, G., Tan, M.W. e Rumbaugh, K.P. (2006). *Caenorhabditis elegans* senses bacterial autoinducers. *Appl Environ. Microbiol.* 72, 5135–5137.
- Bessen, D., Jones, K.F. e Fischetti, V.A. (1989). Evidence for two distinct classes of streptococcal M protein and their relationship to rheumatic fever. *J. Exp. Med.* 169, 269–283.
- Blaxter, M. (2011). Nematodes: The worm and its relatives. *PLoS Biol.* 9, e1001050.
- Brandt, C.M. e Spellerberg, B. (2009). Human infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. *Clin. Infect. Dis.* 49, 766–772.
- Brenner, S. (1973). The genetics of behaviour. *British Medical Bulletin.* 29, 269–271.
- Bridge, P.D. e Sneath, P.H. (1983). Numerical taxonomy of *Streptococcus*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 565–597.
- Broyles, L.N., Van Beneden, C., Beall, B., Facklam, R., Shewmaker, P.L., Malpiedi, P. e Farley, M.M. (2009). Population-based study of invasive disease due to β -hemolytic streptococci of groups other than A and B. *Clin Infect Dis*, 48(6), 706–712.
- Bruun, T., Kittang, B. R., de Hoog, B. J., Aardal, S., Flaatten, H. K., Langeland, N. e Skrede, S. (2013). Necrotizing soft tissue infections caused by *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* of groups C and G in western Norway. *Clin Microbiol Infect* 19(12), E545–E550.
- Carapetis, J.R., Steer, A.C., Mulholland, E.K. e Weber, M. (2005). The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*, 5, 685–694.
- Carlsson, F., Sandin, C. e Lindahl, G. (2005). Human fibrinogen bound to *Streptococcus pyogenes* M protein inhibits complement deposition via the classical pathway. *Mol. Microbiol.* 56, 28–39.
- Cantón R., Gijón D. e Ruiz-Garbajosa P. (2020). Antimicrobial resistance in IUCs: an update in the light of the COVID-19 pandemic. *Curr Opin Crit Care.* 26(5):433-441.
- Carvalho, M.S., Trabulo, M., RIBEIRAS, R., Abecasis, J., Costa, F.L. e Mendes, M. (2012). A case of native valve infective endocarditis in an immunocompromised patient. *Rev. Port. Cardiol.* 31, 35–38.
- Ciszewski, M., e Szewczyk, E. M. (2017). Potential factors enabling human body colonization by animal *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strains. *Curr. Microbiol.*, 74(5), 650–654.
- Ciszewski, M., Zegarski, K., e Szewczyk, E.M. (2016). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolated from infections in dogs and humans: are current subspecies identification criteria accurate? *Curr. Microbiol.*, 73(5), 684–688.
- Cole, J.N., Barnett, T.C., Nizet, V. e Walker, M.J. (2011). Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9(10), 724–736.
- Conley, J., Olson, M.E., Cook, L.S., Ceri, H., Phan, V. e Davies, H.D. (2003). Biofilm formation by group A streptococci: is there a relationship with treatment failure? *J. Clin. Microbiol.* 41, 4043–4048.
- Corcuera, M.T., Gómez-Lus, M.L., Gómez-Aquado, F., Maestre, J.R., Ramos, M.D., Alonso, M.J. e Prieto, J. (2013). Morphological plasticity of *Streptococcus oralis* isolates for biofilm production, invasiveness, and architectural patterns. *Arch. Oral Biol.* 58, 1584–1593.
- Cunningham, M.W. (2000). Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 470–511.
- CDC Group B Strep (GBS). Disponível em: <https://www.cdc.gov/groupbstrep/about/infection.html>. Acesso em 02/03/2020.
- CDC *Streptococcus* Laboratory. Disponível em: <https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/emm-background.html>. Acesso em 15/12/2019.
- Chikeka I. e Dumler J.S. (2015). Neglected bacterial zoonoses. *Clin Microbiol Infect.* 21(5):404-15.

- Crater, D.L. e van de Rijn, I. (1995). Hyaluronic acid synthesis operon (has) expression in group A streptococci. *J. Biol. Chem.*, 270(31), 18452–18458.
- Creti, R., Imperi, M., Baldassarri, L., Pataracchia, M., Alfarone, G. e Orefici, G. (2007). Lateral transfer of alpha-like protein gene cassettes among streptococci: identification of a new family member in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 224-227.
- Darby, C. (2005). Interactions with microbial pathogens. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*. 6, 1-15.
- Davies, M. R., McMillan, D. J., Beiko, R. G., Barroso, V., Geffers, R., Sriprakash, K. S. e Chhatwal, G. S. (2007). Virulence profiling of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* isolated from infected humans reveals 2 distinct genetic lineages that do not segregate with their phenotypes or propensity to cause diseases. *Clin Infect Dis*, 44(11), 1442–1454.
- Dempfle C. E. e Mosesson M. W. (2003). Theme issue: Fibrinogen and fibrin - structure, function, interactions and clinical applications. *J Thromb Haemost.* 89(4):599–600.
- Dermer, P., Lee, C., Eggert, J. e Few, B. (2004). A history of neonatal group B *Streptococcus* with its related morbidity and mortality rates in the United States. *J. Pediatr. Nurs.*, 19(5), 357–363.
- Diamond, J. e Panosian, C. (2006). When Disease Makes History: Epidemics and Great Historical Turning Points. Ed. Ha'ma'la'inen, P. 17–44.
- Dierksen, K.P. e Tagg, J. R. (2000). Haemolysin-deficient variants of *Streptococcus pyogenes* and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* may be overlooked as an etiological agent of pharyngitis. *J. Med. Microbiol.* 49, 811-816.
- Dinkla, K., Rohde, M., Jansen, W.T., Kaplan, E.L., Chhatwal, G.S. e Talay, S.R. (2003). Rheumatic fever-associated *Streptococcus pyogenes* isolates aggregate collagen. *J. Clin. Invest.* 111, 1905–1912.
- Dobell, C. (1932). Antony van Leeuwenhoek and his “Little Animals”: being some account of the father of protozoology and bacteriology and his multifarious discoveries in these disciplines. *Nature*, 130 (3288), 679–680.
- Euzéby, J.P. (1997). List of bacterial names with standing in nomenclature. Disponível em <http://www.bacterio.net/streptococcus.html>. Acesso em 22/04/2021.
- Efstratiou, A. (1989). Outbreaks of human infection caused by pyogenic streptococci of Lancefield groups C and G. *J. Med. Microbiol*, 29(3), 207–219.
- Efstratiou A., Colman G., Hahn G, Timoney J.F., Boeufgras J.M. e Monget D. (1994). Biochemical differences among human and animal streptococci of Lancefield group C or group G. *J Med Microbiol.* 41(2):145-8.
- Efstratiou, A. (1997). Pyogenic streptococci of Lancefield groups C and G as pathogens in man. *J Appl Microbiol Symposium Supplement*, 83, 72–79.
- Ekelund, K., Skinhøj, P., Madsen, J. e Konradsen, H. B. (2005). Invasive group A, B, C and G streptococcal infections in Denmark 1999-2002: epidemiological and clinical aspects. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(7), 569–576.
- Ezeriņa, D., Takano, Y., Hanaoka, K., Urano, Y. e Dick, T. P. (2018). N-Acetyl cysteine functions as a fast-acting antioxidant by triggering intracellular H₂S and sulfane sulfur production. *cell chemical. Biology* 25(4), 447–459.
- Facklam, R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Reviews* 15(4), 613–630.
- Farrow, J.A.E. e Collins, M.D. (1984). Taxonomic studies on streptococci of serological groups C, G and L and possibly related taxa. *Syst. Appl. Microbiol.*, 5(4), 483–493.
- Ferretti J. e Köhler W. History of Streptococcal Research. (2016). In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333430/>

- Fire, A. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391, 806–811.
- Fischetti, V.A. (1989). Streptococcal M protein: Molecular design and biological behavior. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2(3), 285–314.
- Finkel, T. e Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239–247.
- Fuursted, K., Stegger, M., Hoffmann, S., Lambertsen, L., Andersen, P. S., Deleuran, M. e Thomsen, M. K. (2016). Description and characterization of a penicillin-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* clone isolated from blood in three epidemiologically linked patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, 71(12), 3376–3380.
- Fung, J.C., Wicher, K. e McCarty, M. (1982). Immunochemical analysis of streptococcal group A, B, and C carbohydrates, with emphasis on group A. *Infect. Immun.*, 37, 209–215.
- Garsin, D.A., Sifri, C.D., Mylonakis, E., Qin, X., Singh, K.V., Murray, B.E., Calderwood, S.B. e Ausubel, F.M. (2001). A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 10892–10897.
- Genteluci, G.L., Silva, L.G., Souza, M.C., Glatthardt, T., de Mattos, M.C., Ejzemberg, R., Alviano, C.S., Figueiredo, A.M.S. e Ferreira-Carvalho, B.T. (2015). Assessment and characterization of biofilm formation among human isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *J. Med. Microbiol.* 305(8), 937–947.
- Geyer, A. e Schmidt, K. H. (2000). Genetic organisation of the M protein region in human isolates of group C and G streptococci: Two types of multigene regulator-like (*mgrC*) regions. *Molecular and General Genetics*, 262(6), 965–976.
- Giovanetti, E., Brenciani, A., Lupidi, R., Roberts, M. C. e Varaldo, P. E. (2003). Presence of the *tet(O)* Gene in Erythromycin- and Tetracycline-Resistant Strains of *Streptococcus pyogenes* and Linkage with either the *mef(A)* or the *erm(A)* Gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(9), 2844–2849.
- Gherardi, G; Imperi, M; Palmieri, C; Magi, G; Facinelli, B; Baldassarri, L; Pataracchia, M. e Creti, R. (2014). Genetic diversity and virulence properties of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* from diferente sources. *J. Med. Microbiol.* 63, 90 – 98.
- Ghoneim, A.T.M. e Cooke, E.M. (1980). Serious infection caused by group C streptococci. *Journal of Clinical Pathology*, 33(2), 188–190.
- Haidan, A., Talay, S.R., Rohde, M., Sriprakash, K.S., Currie, B.J. e Chhatwal, G.S. (2000). Pharyngeal carriage of group C and group G streptococci and acute rheumatic fever in an Aboriginal population. *Lancet*. 356, 1167-1169.
- Haenni, M.; Saras, E.; Bertin, S.; LeBlond, P., Madec, J. Y. e Payot, S. (2021). Diversity and mobility of integrative and conjugative elements in bovine isolates of *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, and *S. uberis*. *Appl Environ Microbiol.* 76, 7957-7965.
- Hall-Stoodley, L.; Costerton, J.W. e Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108.
- Harrison, A.G, Lin T. e Wang P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.*41(12):1100-1115.
- Harrington, D.J., Greated, J.S., Chanter, N. e Sutcliffe, I.C. (2000). Identification of lipoprotein homologues of pneumococcal PsaA in the equine pathogens *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus*. *Infect. Immun.* 68, 6048-6051.
- Halliwell, B. (1999). Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 443, 37–52.
- Hashikawa, S., Inuma, Y., Furushita, M., Ohkura, T., Nada, T., Torii, K., Hasegawa, T. e Ohta, M. (2004). Characterization of group C and G streptococcal strains that cause streptococcal toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol.* 42, 186–192.

- Hed, J., Dahlgren, C. e Rundquist, I. (1983). A simple fluorescence technique to stain the plasma membrane of human neutrophils. *Histochemistry*, 79(1), 105–110.
- Houszka, M., Dzimira, S., Krol, J., Kandefer-Gola, M., Ciaputa, R., Sobieraj, L. e Podkowik, M. (2014). Streptococcal endocarditis in a captive southern white rhinoceros. *J Zoo Wildl Med*, 45(3), 635–637.
- Horstmann, R.D., Sievertsen, H.J., Leippe, M e Fischetti, V.A. (1992). Role of fibrinogen in complement inhibition by streptococcal M protein. *Infect. Immun.* 60, 5036-5041
- Horstmann, R.D., Sievertsen, H.J., Knobloch, J. e Fischetti, V.A. (1988). Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 1657–1661.
- Humar, D., Datta, V., Bast, D.J., Beall, B., De Azavedo, J.C.S. e Nizet, V. (2002). Streptolysin S and necrotising infections produced by group G *Streptococcus*. *Lancet*, 359(9301), 124–129.
- Iannelli, F., Santagati, M., Santoro, F., Oggioni, M. R., Stefani, S. e Pozzi, G. (2014). Nucleotide sequence of conjugative prophage Φ 1207.3 (formerly Tn1207.3) carrying the *mef(A)/msr(D)* genes for efflux resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes*. *Front. Microbiol.*, 5, 687.
- Jomova, K., Lawson, M., Drostinova, L., Lauro, P., Poprac, P., Brezova, V., Michalik, M., Lukes, V. e Valko, M. (2017). Protective role of quercetin against copper (II)-induced oxidative stress: A spectroscopic, theoretical and DNA damage study. *Food Chem. Toxicol.* 110, 340–350.
- Ikebe, T., Murayama, S., Saitoh, K., Yamai, S., Suzuki, R., Isobe, J. e Kudaka, J. (2004). Surveillance of severe invasive group-G streptococcal infections and molecular typing of the isolates in Japan. *Epidemiol. Infect.*, 132(1), 145–149.
- Ikebe, T., Okuno, R., Sasaki, M., Kanda, Y., Otsuka, H., Kawahara, R. e Nihonmatsu, H. (2018). Molecular characterization and antibiotic resistance of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* isolated from patients with streptococcal toxic shock syndrome. *J Infect Chemother*, 24(2), 117–122.
- Ishihar, H., Ogura, K., Miyohi-Akiyama, T., Nakamura, M., Kaya, H. e Okamoto, S. (2020). Prevalence and genomic characterization of group A *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolated from patients with invasive infections in Toyama prefecture, Japan. *Microbiol. Immunol.* 64:113-122.
- Jansen, W.T., Bolm, M., Balling, R., Chhatwal, G.S. e Schnabel, R. (2002). Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans* by *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* 70, 5202–5207.
- Jenkinson H. F. e Lamont R. J. (1997) Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med.*8(2):175–200.
- Jensen, A. e Kilian, M. (2012). Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, its subspecies, and its clinical and phylogenetic relationship to *Streptococcus pyogenes*. *J. Clin Microbiol.* 50(1), 113–126.
- Kaur H., Kumar P., Ray P., Kaur J. e Chakraborti A. (2009). Biofilm formation in clinical isolates of group B streptococci from north India. *Microb Pathog.* 46:321–327.
- Kaletta, T. e Hengartner, M.O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5(5), 387–399.
- Kalia, A. e Bessen, D.E. (2004). Natural selection and evolution of streptococcal virulence genes involved in tissue-specific adaptations. *J. Bacteriol.* 186(1), 110–121.
- Kaplan, E.L., Chhatwal, G.S. e Rohde, M. (2006). Reduced ability of penicillin to eradicate group A streptococci from epithelial cells: clinical and pathogenic implications. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1398–1406.
- Kataja, J.; seppälä, H.; skurnik, M.; sarkkinen, H. e Huovinen, P. Different erythromycin resistance mechanisms in group c and group g streptococci. *Antimicrob agents chemother.* (1998). 42, 1493-1494.
- Kataja, J.; huovinen, P. e skurnik, M. (1999) the finnish study group for antimicrobial resistance e seppälä, H. Erythromycin resistance genes in group a streptococci in finland. *Antimicrob agents chemother.* 43, 48-52.
- Kawamura, Y., Hou, X.G., Sultana, F., Miura, H. e Ezaki, T. (1995). Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the

genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol*, 45(2), 406–408.

Kimura, K.R., Nakata, M., Sumitomo, T., Kreikemeyer, B., Podbielski, A., Terao, Y. e Kawabata, S. (2012). Involvement of T6 pili in biofilm formation by serotype M6 *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol*. 194, 804-812

Kinnula, V.L., Crapo, J.D. e Raivio, K.O. (1995). Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab. Invest.* 73, 3–19.

Kirtipal, N., Bharadwaj, S. e Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect Genet Evol*, 104502.

Köhler, W. (2007). The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *International J. Med. Microbiol*, 297(3), 133–150.

Klein M.I., Hwang G., Santos P.H., Campanella O.H. e Koo H. 2015. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol*. 5:10.

Klugman, K. P.; Capper, T.; Widdowson, C. A.; Koornhof, H. J. e Moser, W. (1998) Increased activity of 16-membered lactone ring macrolides against erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of South African isolates. *J Antimicrob Chemother.* 42, 729-734.

Laus, F., Preziuso, S., Spaterna, A., Beribè, F., Tesei, B. e Cuteri, V. (2007). Clinical and epidemiological investigation of chronic upper respiratory diseases caused by beta-haemolytic streptococci in horses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 247-260.

Lancefield, R. C. (1928). The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*: demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus haemolyticus*. *J. Exp. Med.* 47(1), 91–103.

Lancefield, R.D. (1933). Serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J. Exp Med.* 57, 571-595.

Laus, F., Preziuso, S., Spaterna, A., Beribè, F., Tesei, B. e Cuteri, V. (2007). Clinical and epidemiological investigation of chronic upper respiratory diseases caused by beta-haemolytic streptococci in horses. *Comparative Immunology, Diagn Microbiol Infect Dis*, 30(4), 247–260.

Larsen PL (1993) Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 90, 8905–8909

Lee, S. e Kenyon, C. (2009). Regulation of the longevity response to temperature by thermosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 19, 715–22.

Lefébure T., Richards V.P., Lang P., Pavinski-Bitar P. e Stanhope M.J. (2012) Gene repertoire evolution of *Streptococcus pyogenes* inferred from phylogenomic analysis with *Streptococcus canis* and *Streptococcus dysgalactiae*. *PLoS ONE* 7, e37607.

Loo, C.Y., Corliss, D.A. e Ganeshkumar, N. (2000). *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J. Bacteriol.* 182, 1374–1382.

Lloyd, C. A. C.; Jacob, S. E. e Menon, T. Antibiotic resistant beta-hemolytic streptococci. (2007) *Indian J pediatr.* 74, 1077-1080.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. e Clarck. D.P. (2010). Capítulo 6: Crescimento Microbiano. In: *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Rio de Janeiro: Editora Artmed, 128-138.

Manetti, A.G., Zingaretti, C., Falugi, F., Capo, S., Bombaci, M., Bagnoli, F., Gabellini, G., Besni, G., Mora, M., Edwards, A.M., Musser, J.M., Graviss, E.A., Telford, J.L., Grandi, G. e Margarit, I. (2007) *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 64, 968-983.

Manetti, A.G., Köller, T., Becherelli, M., Buccato, S., Kreikemeyer, B., Podbielski, A., Grandi, G. e Margarit, I. (2010). Environmental acidification drives GAS pilus expression and microcolony formation on epithelial cells in a FCT-dependent manner. *PLoS One* 5, e13864.

- Martínez-González J.J., Guevara-Flores A., Rendón J.L. e Arenal I.P.D. (2015). Auranofin-induced oxidative stress causes redistribution of the glutathione pool in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Mol Biochem Parasitol.* 201(1):16-25.
- Matsue, M., Ogura, K., Sugiyama, H., Miyoshi-Akiyama, T., Takemori-Sakai, W., Iwata, Y., Wada, T. e Okamoto, S. (2020). Pathogenicity characterization of prevalent-type *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strains. *Front Microbiol.* 11, 1-13.
- May, R. M., Gupta, S. e McLean, A. R. (2001). Infectious disease dynamics: what characterizes a successful invader? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 356, 901–910.
- Medina, E., Rohde, M. e Chhatwal, G.S. (2003). Intracellular survival of *Streptococcus pyogenes* in polymorphonuclear cells results in increased bacterial virulence. *Infect. Immun.* 71, 5376-5380.
- Menschner, L., Falke, U., Konrad, P., Berner, R. e Toepfner, N. (2019). Hydrogen peroxide production of Group A streptococci (GAS) is *emm*-type dependent and increased at low temperatures. *Curr. Microbiol.*, 76(6), 698–705.
- Metzgar, D. e Zampolli, A. (2011). The M protein of group A *Streptococcus* is a key virulence factor and a clinically relevant strain identification marker. *Virulence* 2, 402-412.
- Morens, D. M., Folkers, G. K. e Fauci, A. S. (2004). The challenge of emerging and reemerging infectious diseases. *Nature* 430, 242–249.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S. e Pfaller, M.A., (2017). *Microbiologia Médica*, eds. 8. ed. (Rio de Janeiro, Elsevier).
- McDonald, M., Towers, R.J., Andrews, R.M., Carapetis, J.R. e Currie, B.J. (2007) Epidemiology of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in tropical communities, Northern Australia. *Emerg Infect Dis* 13(11): 1694–1700.
- McMillan, D.J., Bessen, D.E., Pinho, M., Ford, C., Hall, G.S., Melo-Cristino, J. e Ramirez, M. (2010). Population genetics of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* reveals widely dispersed clones and extensive recombination. *PLoS ONE*, 5(7), e11741.
- McNeilly, C.L. e McMillan, D.J. (2014). Horizontal gene transfer and recombination in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Front. Microbiol.* 5, 676.
- Nei, T., Akutsu, K., Shima, A., Tsuboi, I., Suzuki, H., Yamamoto, T., Tanaka, K., Shinoyama, A., Kojima, Y., Washio, Y., Okawa, S., Sonobe, K., Norose, Y. e Saito, R. (2012). A case of streptococcal toxic shock syndrome due to Group G streptococci identified as *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *J Infect Chemother.* 18, 919-924
- Nobbs, A.H., Lamont, R.J. e Jenkinson, H.F. (2009). *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 407-450.
- Novaes, R., Freire-de-Lima, C. G., de Albuquerque, R. C., Affonso-Mitidieri, O. R., Espindola, O., Lima, M. A. e Echevarria-Lima, J. (2013). *Modulation of glutathione intracellular levels alters the spontaneous proliferation of lymphocyte from HTLV-1 infected patients.* *Immunobiology*, 218(9), 1166–1174.
- Ogawa, T., Terao, Y., Okuni, H., Ninomiya, K., Sakata, H., Ikebe, K., Maeda, Y. e Kawabata, S. (2011). Biofilm formation or internalization into epithelial cells enables *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. *Microb. Pathog.* 51, 58-68.
- Oh, S. I., Park, J. K. e Park, S. K. (2015). Lifespan extension and increased resistance to environmental stressors by N-acetyl-L-cysteine in *Caenorhabditis elegans*. *Clinics*, 70(5), 380-386.
- Oh S.I., Kim J.W., Kim J., So B., Kim B. e Kim H.Y. Molecular subtyping and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* isolates from clinically diseased pigs. (2020) *J Vet Sci.* 21(4): 57.
- Oppegaard, O., Mylvaganam, H. e Kittang, B. R. (2015). Beta-haemolytic group A, C and G streptococcal infections in Western Norway: A 15-year retrospective survey. *Clin. Microbiol. Infect.* 21(2), 171–178.
- Osanai, Hu, D.L. e Nakane. (2012). *Caenorhabditis elegans* evita toxinas estafilocócicas superantigênicas via via dependente de 5-hidroxitriptamina. *Pode J Microbiol.* 11, 1268-77.

- Pang M., Sun L., He T., Bao H., Zhang L., Zhou Y., Zhang H., Wei R., Liu Y. e Wang R. (2017). Molecular and virulence characterization of highly prevalent *Streptococcus agalactiae* circulated in bovine dairy herds. *Vet Res.* 48:65.
- Pankov R., Yamada K. M. Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science.* (2002). 115:3861–3863.
- Parker R.E., Laut C., Gaddy J.A., Zadoks R.N., Davies H.D. e Manning S.D. (2016). Association between genotypic diversity and biofilm production in group B *Streptococcus*. *BMC Microbiol.* 16:86.
- Pericone, C.D., Park, S., Imlay, J.A. e Weiser, J.N. (2003). Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (*SpxB*) and avoidance of the toxic effects of the Fenton reaction. *J. Bacteriol.* 185, 6815–6825.
- Pinho M.D., Erol E., Ribeiro-Gonçalves B., Mendes C.I., Carriço J.A., Matos S.C., Preziuso S., Luebke-Becker A., Wieler L.H., Melo-Cristino J. e Ramirez M. (2016). Beta-hemolytic *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from horses are a genetically distinct population within the *Streptococcus dysgalactiae* taxon. *Sci Rep.* 6;31736.
- Purushothaman S.S., Wang B. e Cleary P.P. (2003). M1 protein triggers a phosphoinositide cascade for group A *Streptococcus* invasion of epithelial cells. *Infect Immun.* 71(10), 5823-30.
- Ralph, A.P. e Carapetis, J.R. (2013). Group A streptococcal diseases and their global burden. *Curr Top Microbiol Immunol.* 368, 1-27.
- Rantala S., Vähäkuopus S., Vuopio-Varkila J., Vuento R. e Syrjänen J (2010) *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* bacteremia, Finland, 1995–2004. *Emerg Infect Dis* 16(5):843–846.
- Rantala, S. e Touhinen, S. (2014). Two cases of cardiac device-related endocarditis due to *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (group C or G streptococci). *BMC Infect. Dis.* 14, 174.
- Rato, M.G., Nerlich, A., Bergmann, R., Bexiga, R., Nunes, S. F., Vilela, C.L. e Chhatwal, G.S. (2011). Virulence gene pool detected in bovine group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolates by use of a group A *S. pyogenes* virulence microarray. *J. Clin. Microbiol.* 49(7), 2470–2479.
- Rawson, T. M., Moore, L. S. P., Castro-Sanchez, E., Charani, E., Davies, F., Satta, G. e Holmes, A. H. (2020). COVID-19 and the potential long-term impact on antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 1;75(7):1681-1684
- Reid, S.D., Montgomery, A.G., Voyich, J.M., DeLeo, F.R., Lei, B., Ireland, R.M., Green, N.M., Liu, M., Lukomski, S. e Musser, J.M. (2003). Characterization of an extracellular virulence factor made by group A *Streptococcus* with homology to the *Listeria monocytogenes* internalin family of proteins. *Infect. Immun.* 71, 7043-7052.
- Richards, V.P., Palmer, S.R., Bitar, P.D.P., Qin, X., Weinstock, G.M., Highlander, S.K. e Stanhope, M.J. (2014). Phylogenomics and the dynamic genome evolution of the genus *Streptococcus*. *Genome Biol. Evol.* 6(4), 741–753.
- Riddle, D., Blumenthal, T., Meyer, B. e Priess, J. (1997). *C. elegans* II (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1997). Volume 2, pp. 12222.
- Roberts, M. C.; Sutcliffe, J.; Courvalin, P.; Jensen, L. B.; Rood, J. e Seppälä, H. (1999) Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 43, 2823-2830.
- Roberts, A.L., Connolly, K.L., Kirse, D.J., Evans, A.K., Poehling, K.A., Peters, T.R., e Reid, S.D. (2012). Detection of group A *Streptococcus* in tonsils from pediatric patients reveals high rate of asymptomatic streptococcal carriage. *BMC Pediatr.* 12, 3.
- Rohde, M., Talay, S.R., e Rasmussen, M. (2012). Molecular mechanisms of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* enabling intravascular persistence. *Microbes Infect.* 14, 329-334.
- Rosini, R., e Margarit, I. (2015). Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5:6.
- Ruediger, G. F. (1906). The cause of green coloration of bacterial colonies in blood-agar plates. *J. Infect. Dis.* 3(4), 663–665.

- Switzer WM, Salemi M, Shanmugam V, Gao F, Cong M.E., Kuiken C, Bhullar V, Beer B.E., Vallet D, Gautier-Hion A, Tooze Z, Villinger F, Holmes E.C. e Heneine W. (2005). Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates. *Nature*.434(7031):376-80.
- Saito, M., Seki, M., Iida, K.-I., Nakayama, H. e Yoshida, S.-I. (2007). A novel agar medium to detect hydrogen peroxide-producing bacteria based on the prussian blue-forming reaction. *Microbiol. Immunol.* 51, 889–892.
- Salata R.A., Lerner P.I., Shlaes D.M., Gopalakrishna K.V. e Wolinsky E. (1989). Infections due to Lancefield group C streptococci. *Medicine*. 68, 225–239
- Santos V. L. (2020). Estudos sobre a virulência em modelos *in vivo* e *ex vivo* de diferentes clones de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolados no Brasil. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Goés. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 101f.
- Santos, V.L., Silva, L.G., Martini, C.L., Anjos, I.H.V., Maia, M.M., Genteluci, G.L., Sant’Anna, V., Ferreira, A.M.A., Couceiro, J.N.S.S., Sá Figueiredo, A.M. e Ferreira-Carvalho, B.T. (2020) Low lineage diversity and increased virulence of group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *J. Med. Microbiol.*69, 576 – 586.
- Seppälä H., Skurnik M., Soini H., Roberts M.C. e Huovinen P. (1998). A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*.. *Antimicrob Agents Chemother*; 42: 257-62
- Silva L.G. (2012). Determinação das espécies e susceptibilidade aos antimicrobianos em amostras de estreptococos do grupo C, de humanos e equinos, e análise da diversidade clonal de *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *equisimilis*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 91f.
- Silva L.G, Genteluci G.L., Mattos M.C., Glatthardt T., Sá Figueiredo A.M. e Ferreira-Carvalho B.T. (2015). Group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in south-east Brazil: genetic diversity, resistance profile and the first report of human and equine isolates belonging to the same multilocus sequence typing lineage. *J. Med. Microbiol.* 64, 551–558.
- Schrager, H.M., Alberti, S., Cywes, C., Dougherty, G.J. e Wessels, M.R. (1998). Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A *Streptococcus* to CD44 on human keratinocytes. *J. Clin. Investig.* 101, 1708–1716.
- Schrieber, L., Towers, R., Muscatello, G. e Speare, R. (2014). Transmission of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* between child and dog in an aboriginal Australian community. *Zoonoses Public Health.* 61(2), 145–148.
- Shak, J.R., Ludewick, H.P., Howery, K.E., Sakai, F., Yi, H., Harvey, R.M., Paton, J.C., Klugman, K.P. e Vidal, J.E. (2013). Novel role for the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. *mBio* 4, 655–713.
- Shimomura, Y., Okumura, L., Murayama, S.Y., Yagi, J., Ubukata, K., Kirikae, T. e Miyoshi-Akiyama, T. (2011). Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). *BMC Genomics.* 12, 17.
- Spratt, B., Mkel, P.H., Nohynek, H., Cherian, T., Mulholland, K., Dagan, R. e Gratten, M. (2003). Report from a WHO Working Group: standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 22(2), 1–11.
- Sunaoshi, K., Murayama, S.Y., Adachi, K., Yagoshi, M., Okuzumi, K., Chiba, N. e Ubukata, K. (2010). Molecular *emm* genotyping and antibiotic susceptibility of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolated from invasive and non-invasive infections. *J. Med. Microbiol.* 59(1), 82–88.
- Suzuki, H., Lefébure, T., Hubisz, M. J., Bitar, P. P., Lang, P., Siepe, A. e Stanhope, M.J. (2011). Comparative genomic analysis of the *Streptococcus dysgalactiae* species group: Gene content, molecular adaptation, and promoter evolution. *Genome Biol. Evol.* 3(1), 168–185.
- Sutcliffe, J.; tait-kamradt, A. e Wondrack, L. (1996). *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother.* 40, 1817-1824.

- Tahmourespour, A., Nabinejad, A., Shirian, H., Rosa, E.A.R. e Tahmourespour, S. (2013). Typing of *Streptococcus mutans* strains isolated from caries free and susceptible subjects by multilocus enzyme electrophoresis. *Braz. J. Microbiol.* 44(3), 873–877.
- Takahashi, T.; sunaoshi, K.; sunakawa, K.; fujishima, S.; watanabe, H. e ubukata, K. (2010). The invasive streptococcal disease working group B clinical aspects of invasive infections with *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* in japan: differences with respect to *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae* infections. *Clin microb infect.* 16, 1097-1103.
- Takahashi, T., Ubukata, K. e Watanabe, H. (2011). Invasive infection caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: Characteristics of strains and clinical features. *J Infect Chemother.* 17(1), 1–10.
- Tartof, S.Y., Farrimond, F., De Matos, J.A., Reis, J.N., Ramos, R.T.T., Andrade, A.N. e Riley, L.W. (2011). Inverse association between Lancefield group G *Streptococcus* colonization and sore throat in slum and non-slum settings in Brazil. *J. Clin Microbiol.* 49(1), 409–412.
- Tarone, G., Hirsch, E., Brancaccio, M., De Acetis, M., Barberis, L., Balzac, F., Retta, S.F., Botta, C., Altruda, F., Silengo, L. e Retta, F. (2000). Integrin function and regulation in development. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 725-731.
- Taylor, L. H., Latham, S. M. e Woolhouse, M. E. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 356, 983–989.
- Torres, R.S.L.A., Paula, C.C., Pilonetto, M., Fontana, C.K., Minozzo, J. C. e Torres, R.A. (2007). An outbreak of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in a hospital in the south of Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 38, 417420.
- Tait-kamradt, A.; Clancy, J.; Cronan, M.; Dib-hajj, F.; Wondrack, L.; Yuan, W. e Sutcliffe, J. (1997). *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 41, 2251-2255, 1997.
- Turner, C.E., Bubba, L. e Efstratiou, A. (2019). Pathogenicity factors in group C and G streptococci. *Microbiol. Spectr.*, 7(3), 1–13.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012–2018.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. e Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer*, 26(2), 171–176.
- Uh, Y.; Hwang, G. Y.; Jang, I. H.; Cho, H. M.; Noh, S. M.; Kim, H. Y.; Kwon, O. e Yoon, K. J. (2007) Macrolide resistance trends in beta-hemolytic streptococci in a tertiary Korean hospital. *Yonsei Med J.* 48, 773-778.
- Vandamme, P., Pot, B., Falsen, E., Kersters, K. e Devriese, L. A. (1996). Taxonomic study of Lancefield streptococcal groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 46(3), 774–781.
- Vähäkuopus, S., Vuento, R., Siljander, T., Syrjänen, J. e Vuopio, J. (2011). Distribution of *emm* types in invasive and non-invasive group A and G streptococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31(6), 1251–1256.
- Vélez, J. R., Cameron, M., Rodríguez-Lecompte, J. C., Xia, F., Heider, L. C., Saab, M. e Sánchez, J. (2017). Whole-Genome Sequence Analysis of Antimicrobial Resistance Genes in *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* Isolates from Canadian Dairy Herds. *Front. vet. sci.* 4.
- Vieira, V.V., Teixeira, L.M., Zahner, V., Momen, H., Facklam, R.R., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J. e Castro, A.C. (1998). Genetic relationships among the different phenotypes of *Streptococcus dysgalactiae* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1231-1243.
- Weiss, R. A. e McMichael, A. J. (2004) Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nature Med.* 10, S70–S76.

- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. e Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93(3), 965–974.
- Wolfe N.D., Dunavan C.P. e Diamond J. (2007). Origins of major human infectious diseases. *Nature*.447(7142):279-83.
- Wu, J. J.; lin, K. Y.; Hsueh, P. R. Liu, J. W.; pan, H. I. e Sheud, S. M. (1997). High incidence of erythromycin resistant streptococci in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 41, 844-846.
- Wu, K., Zhang, K., McClure, J., Zhang, J., Schrenzel, J., Francois, P., Harbarth, S. e Conly J. (2013). A correlative analysis of epidemiologic and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from diverse geographic locations with virulence measured by a *Caenorhabditis elegans* host model. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1, 33-42.
- Xiao, R. (2013). A genetic program promotes *C. elegans* longevity at cold temperatures via a thermosensitive TRP channel. *Cell.* 152, 806–17.
- Yi, L., Wang, Y., Ma, Z., Zhang, H., Li, Y., Zheng, J.X., Yang, Y.C., Fan, H.J. e Lu, C.P. (2014). Biofilm formation of *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* and comparative proteomic analysis of biofilm and planktonic cells. *Curr. Microbiol.* 69, 227–233.
- Yinduo, J. I., McLandsborough, L., Kondagunta, A. e Cleary, P. P. (1996). C5a peptidase alters clearance and trafficking of group A streptococci by infected mice. *Infect. Immun.* 64(2), 503–510.
- Zhang, Y., Lu, H. e Bargmann, C.I. (2005). Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 438, 179–184.