

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



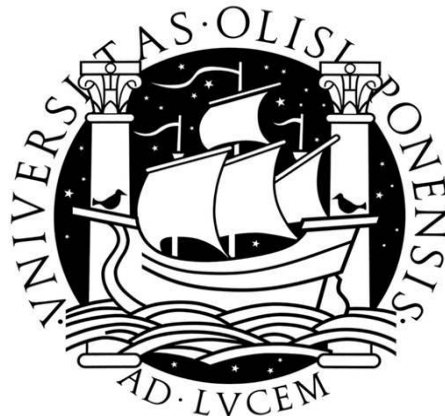
Factores de virulência em *Streptococcus pyogenes*

Lara Marques Lino

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2010

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Factores de virulência em *Streptococcus pyogenes*

Lara Marques Lino

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek (Universidade técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária) pelo Prof. Doutor Rogério Paulo de Andrade Tenreiro (Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências)

2010

“It is not the strongest of the species that survives,

nor the most intelligent that survives.

It is the one that is the most adaptable to change.”

Charles Darwin

Agradecimentos

Como não poderia deixar de ser, e porque a muitos tenho de agradecer, e ainda bem que tenho, aqui ficam os meus sinceros e sentidos agradecimentos.

Em primeiríssimo lugar agradeço à Professora Doutora Teresa Semedo Lemsaddek, a minha orientadora neste trabalho, sem a qual a realização do mesmo não teria sido possível. Agradeço-lhe as suas orientações científicas, as suas críticas sempre construtivas, o seu esforço, o seu empenho, a sua disponibilidade e a sua paciência na conduta deste trabalho. Gostaria ainda de lhe agradecer todo o apoio, compreensão, ânimo, coragem e amizade que sempre demonstrou ter nas mais diversas situações, do início ao término desta dissertação. Acreditem que tornou o meu ano mais suave, mais possível e menos difícil!

Agradeço também ao Professor Doutor Rogério Tenreiro por me ter possibilitado a realização deste trabalho no seu laboratório e por ter aceite ser meu orientador interno, por todas as críticas, pela disponibilidade e pela orientação científica e pela revisão final do trabalho.

Gostaria inclusive de prestar o meu agradecimento ao Professor Doutor Abdelhak Lemsaddek, não por este assunto ter sido tantas vezes abordado mas porque, obviamente, o merece. Agradeço-lhe pela orientação no laboratório e por me ter ajudado na adaptação ao mesmo, pelo esclarecimento de todas as dúvidas, por todas as chamadas de atenção, pela ajuda na fase final da escrita e também, pela boa disposição, pela descontração, pelas conversas, e pelas risadas.

Este trabalho contou também com a colaboração e ajuda de Renato Pires e Márcia Rato, aos quais gostaria de agradecer por toda a informação fornecida.

Aos meus colegas e amigos de laboratório gostaria de agradecer o apoio no esclarecimento de todas as dúvidas, a ajuda na integração da equipa, bem como todas as chamadas de atenção. Especialmente a alguns dos quais passo a citar: Daniel, Joana Madeira, Inês, Ricardo e Zé, gostaria de agradecer a boa disposição, os bons momentos de descontração, a força transmitida, as boas conversas e a amizade que ficou.

Aos meus amigos de mestrado, Ana, Diogo, Vânia, Carmen e Inês, quero agradecer não só por este ano lectivo mas também e talvez principalmente por toda a ajuda no primeiro ano de mestrado. Obrigada por terem tornado a minha tarefa mais fácil, obrigada por toda a

força, por todo o apoio, pela compreensão, pela paciência, por terem acreditado em mim e também por todos os bons momentos de descontração! Eu sei que sem vocês não seria possível! Obrigada por terem sido e serem meus AMIGOS!!!

Um agradecimento especial vai também para aos meus amigos Marinhenses, aos quais agradeço simplesmente por serem meus AMIGOS com tudo o que o significado da palavra amizade implica!

À minha família, em especial ao meu pai que me ensinou, desde cedo, a “dar o litro” e à minha avó que sempre foi um exemplo de força e coragem, à Laura e à minha irmã, ao meu irmão e à minha mãe o meu sincero obrigada por todo o apoio e compreensão. Por me terem dado força e amor e por terem desculpado a minha falta de tempo e disponibilidade.

Por último, mas não menos importante que os demais, agradeço ao Pedro por todo o apoio, compreensão, carinho, força. Por me ter ajudado a acreditar que era capaz! Obrigado por fazeres parte da minha vida e por a fazeres mais feliz.

Resumo

Streptococcus pyogenes, um dos agentes patogénicos mais comuns a nível mundial, pode provocar uma grande variedade de patologias como faringites, amigdalites, infecções da pele e tecidos moles ou patologias mais graves como a escarlatina e a síndrome do choque tóxico.

Na tentativa de ajudar a esclarecer se a presença de factores de virulência está relacionada com a origem dos isolados, no presente trabalho foi realizada a pesquisa de genes de virulência (e.g. *speA*, *speC*, *speH*, *speJ*, *speI*, *speK*, *speL*, *speM*, *prtF1*, *spd1*, *slaA*, *ssa*) em 208 isolados de *S. pyogenes* provenientes de quatro origens distintas: colonização, faringite/laringite, infecção da pele/tecidos moles e doença invasiva.

De modo a complementar o estudo foi analisada a expressão génica de quatro dos genes de virulência (*speA*, *ssa*, *slaA* e *spd1*) em vinte isolados seleccionados da amostra inicial, após crescimento em dois meios de cultura, BHI e 2YT. Adicionalmente, e de forma a averiguar se esses mesmos genes seriam de origem fágica, procedeu-se ainda a testes em placa após indução com mitomicina C.

Como principais resultados pode-se referir que enquanto para os isolados de colonização a percentagem de presença de genes de virulência apresenta um máximo de 38,7% (36/93), nos isolados provenientes de infecção atinge o valor de 83,3% (10/12). Estes resultados levam a crer que, isolados provenientes de doença invasiva apresentam maior quantidade de genes de virulência.

Dos quatro genes pesquisados no estudo preliminar de expressão génica apenas para dois, *spd1* e *ssa*, foi observada expressão nas condições em análise, sendo o maior nível de expressão observado no meio de cultura BHI, que simula condições de infecção.

Globalmente, os resultados obtidos no presente estudo indicam uma associação entre factores de virulência e doença invasiva, tanto no estudo de presença como no de expressão. No entanto, devido ao número reduzido de isolados incluídos nos estudos de expressão e indução, as conclusões retiradas necessitam de confirmação em futuras investigações.

Palavras chave: *Streptococcus pyogenes*; factores de virulência; doença invasiva; colonização.

Abstract

Streptococcus pyogenes, is one of the most common pathogens worldwide. It can cause several diseases such as pharyngitis, tonsillitis, skin and soft tissues infections or other more severe pathologies, like scarlet fever and streptococcal toxic shock syndrome.

In order to know if the presence of streptococcal virulence factors is associated with the origin of the isolates, we performed a screening for the presence of virulence genes (e.g. *speA*, *speC*, *speH*, *speJ*, *speI*, *speK*, *speL*, *speM*, *prtF1*, *spd1*, *slaA*, *ssa*) in 208 isolates of *S. pyogenes* from four distinct origins: colonization, tonsillitis/pharyngitis, skin and soft tissues infections and invasive disease.

In order to complement the previous analysis, we selected four virulence genes (*speA*, *ssa*, *slaA* e *spd1*) and studied their gene expression in twenty isolates selected from the initial sample, after growth in two media, BHI and 2YT. Additionally, in order to verify if the same genes had fagic origin, we performed plate assays after induction with mitomycin C.

The results showed that isolates from colonization possess 38,7% (36/93) of virulence genes, while infection isolates presented up to 83,3% (10/12). These results suggest an association between isolates from invasive disease and a higher number of virulence genes.

Regarding gene expression, two of the four genes were analyzed, *spd1* e *ssa*, were expressed during growth in BHI and 2YT. The higher level of expression was observed when using BHI, a medium simulating infection settings.

As for the induction with mitomycin C, we were able to verify that four of the isolates induced halos, pointing to the presence of bacteriophages in those streptococci.

Overall, the results obtained in the present investigation pointed towards an association between virulence factors and invasive disease, regarding both their presence and expression. However, due to the small number of isolates included in the expression and induction studies these conclusions need further confirmation in future investigations.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*; virulence factors; invasive disease; colonization.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Caracterização de <i>Streptococcus pyogenes</i>	1
1.2. Factores de virulência em <i>S. pyogenes</i> e genes associados.....	2
1.3. Mobiloma: um novo conceito	4
1.4. Enquadramento do tema e objectivos do trabalho	6
2. Material e métodos.....	7
2.1. Caracterização da colecção em estudo	7
2.2. Meios e condições de crescimento.....	7
2.3. Presença/ausência de genes de virulência.....	7
2.3.1. Técnica de extracção de DNA.....	7
2.3.2. Técnica de PCR	7
2.3.3. Análise de dados.....	9
2.4. Análise da expressão génica: estudos preliminares	9
2.4.1. Ensaio de crescimento	9
2.4.2. Recolha de células em pontos específicos da curva de crescimento	10
2.4.3. Técnica de extracção de RNA.....	11
2.4.4. Técnica de RT-PCR	11
2.4.5. Técnica de PCR	11
2.4.6. Análise de dados.....	12
2.5. Indução de profagos em <i>S. pyogenes</i>	12
3. Resultados e Discussão	13
3.1. Presença/ausência de genes de virulência.....	13
3.2. Análise da expressão génica: estudos preliminares	19
3.3. Indução de profagos em <i>S. pyogenes</i>	23
4. Conclusões e perspectivas futuras.....	25
5. Bibliografia	27
6. Anexos.....	30

1. Introdução

1.1. Caracterização de *Streptococcus pyogenes*

O género *Streptococcus* caracteriza-se por incluir espécies anaeróbias facultativas, gram-positivas com uma baixa percentagem de G+C, catalase negativas e imóveis. Crescem a uma temperatura óptima de 37 °C e são inibidos por altas concentrações de glicose. (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria [online]). Embora sejam frequentemente encontrados como agentes patogénicos de humanos, algumas estirpes são apenas colonizadoras assintomáticas. Os estreptococos colonizam a pele e as mucosas e podem ser isolados da microbiota alimentar, respiratória e do tracto genital. Actualmente encontram-se identificadas cerca de 60 espécies e inúmeras subespécies do género *Streptococcus* (Garrity *et al.*, 2007). Algumas das espécies pertencentes a este género denominam-se *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. sanguinis*, *S. suis* e *S. thermophilus* (Murray *et al.*, 1995; Garrity *et al.*, 2007).

Streptococcus pyogenes pertence aos *Streptococcus* e ao grupo A de Lancefield - GAS (Efstratiou, 2000). A classificação de Lancefield baseia-se nas diferenças antigénicas de um hidrato de carbono variável localizado na parede celular (grupos de A até V) que pode ser detectado por diversas técnicas imunológicas. Mais recentemente Kawamura e os seus colaboradores dividiram o género *Streptococcus* em seis grandes grupos baseados nas sequências do gene 16S rRNA: *pyogenic*, *mitis*, *bovis*, *salivarius*, *anginosus* e *mutans*. Este género pode ainda distinguir-se de acordo com a hemólise, podendo-se denominar estirpes alfa-hemolíticas (e.g. *S. pneumoniae*) quando não se verifica hemólise, gama-hemolíticas (e.g. *S. agalactiae*) quando a hemólise é incompleta e beta-hemolíticas (e.g. *S. pyogenes*) quando ocorre hemólise completa (Kawamura *et al.*, 1995; Luca-Harari *et al.*, 2009).

S. pyogenes é uma espécie β -hemolítica, forma grandes colónias e caracteriza-se por infectar apenas humanos sendo um dos microrganismos infecciosos mais comum e versátil (Ikebe *et al.*, 2007; Lintges *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 1995). Em 2007 estimava-se que em todo o Mundo cerca de 18 milhões de pessoas sofressem de uma doença grave provocada por GAS e considera-se que este número aumenta 1,7 milhões por ano com o aparecimento de novos casos e o número de mortes ronda os 500 mil por ano, em todo o Mundo (Steer *et al.*, 2007). A penicilina tem vindo a ser utilizada para o tratamento de doenças associadas e este agente patogénico e em pacientes alérgicos a este composto têm vindo a ser administrado macrólidos (e.g. eritromicina e azitromicina) e lincosamidas (e.g. clindamicina) (Pires *et al.*, 2005).

Este agente patogénico é o mais comum a infectar crianças e adolescentes sendo também um importante agente de colonização (Lintges *et al.*, 2007; Pires *et al.*, 2009). A colonização assintomática pode incidir em tecidos tais como a pele, a garganta, o nariz, a nasofaringe, a região anal, e couro cabeludo (Lintges *et al.*, 2007; Steer *et al.*, 2007). As infecções podem subdividir-se em superficiais como é o caso das faringites e piodema ou invasivas como por exemplo impetigo, otite, pneumonia, abscesso peritonsilar, abscesso retrofaríngeo, sinusite, meningite, gangrena, fascíte necrosante, erisipela, celulites, endocardites, infecções gastrointestinais e do tracto urinário. Patologias mais graves são as mediadas por toxinas, como é o caso de escarlatina e o síndrome do choque tóxico. As sequelas associadas a infecções provocadas por *S. pyogenes* incluem a febre reumática, artrites reactivas, glomerulonefrite e eritema nodoso (Efstratiou, 2000; Steer *et al.*, 2007)

1.2. Factores de virulência em *S. pyogenes* e genes associados

S. pyogenes é tipicamente constituído por membrana citoplasmática, uma camada de peptidoglicano, um grupo específico de hidratos de carbono, uma cápsula composta de ácido hialurónico, proteína M e proteínas de ligação à fibronectina (Figura 1) (Steer *et al.*, 2007).

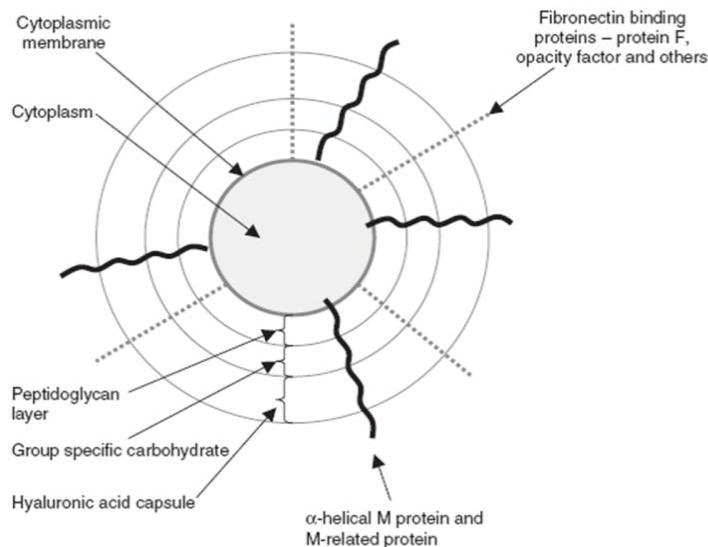


Figura 1 - Estrutura exterior básica de *Streptococcus* do grupo A. (retirado de Steer *et al.*, 2007)

Os principais factores de virulência presentes em *S. pyogenes* são factores de aderência como as proteínas de ligação à fibronectina; anti-proteólise; antifagocitose como a cápsula de ácido hialurónico a proteína M e o SIC (inibidor da lise mediada pelo complemento) C5a peptidase; exoenzimas como DNase, hialuronidase, Ides (enzima que degrada IgG), Speb (exotoxina pirogénica b); activador do plasminogénio como estreptoquinase e toxinas como estreptolisinas e exotoxinas pirogénicas (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria [online]).

A proteína M é um dos factores de virulência, senão o principal, que torna *S. pyogenes* um microrganismo tão perigoso, sendo responsável por uma elevada taxa de mortalidade e morbidade em humanos. A proteína M é uma proteína de superfície, dimérica, constituída por um grupo polissacárido, uma região conservada e uma região amina terminal, hipervariável, que lhe confere um elevado grau de especificidade (Steer *et al.*, 2007). Resistente ao calor e a pH ácido, é responsável por promover a fixação às células epiteliais humanas, aumentando assim a resistência à fagocitose (Ikebe *et al.*, 2007; Maripuu *et al.*, 2008). Os distintos tipos de GAS são classificados com base na proteína M através de estudos de genotipagem da porção amina terminal do gene correspondente (*emm sequence typing*) (Cunningham, 2000; McMillan *et al.*, 2007; Steer *et al.*, 2007). Em estudos anteriores estimava-se que existissem descritos 180 ‘*emm*’ tipos diferentes e 800 subtipos, no entanto continuaram a ser identificados novos tipos e subtipos de *emm* até a actualidade (Steer *et al.*, 2007). Existem ensaios clínicos e epidemiológicos que evidenciam associações entre determinados tipos de M e doenças revelando que os tipos M1, M3, M6, M18 e M28 são comuns em doenças invasivas e tóxicas, dos quais M1 e M3 têm sido os mais frequentemente encontrados (Creti *et al.*, 2007; Cunningham, 2000; Green *et al.*, 2005; McMillan *et al.*, 2007).

“Streptococcal pyrogenic exotoxins” (*spe*) e “Streptococcal superantigen A” (*ssa*) são factores de virulência extracelulares associados a fagos (Green *et al.*, 2005) que actuam como superantigénios, uma vez que estimulam sem especificidade cerca de 20% da população total de células T ao ligarem-se directamente ao receptor destas em vez de serem apresentados ao complexo MHC (major histocompatibility complex) classe II. Assim, as células T são activadas massivamente, o que resulta na produção de um elevado número de citocinas levando à falência dos órgãos. Estes factores de virulência são responsáveis por doenças graves como a síndrome do choque tóxico e a escarlatina (Green *et al.*, 2005; Maripuu *et al.*, 2008; Steer *et al.*, 2007).

Ao longo dos anos tem sido identificados diferentes tipos de *Spe* (e.g. *SpeA*, *SpeC*, *SpeG*, *SpeH*, *SpeI*, *SpeJ*, *SpeK*, *SpeL*, *SpeM*) que são distinguidos de acordo com as diferentes letras que correspondem à sua citocina precursora e indicam a ordem pela qual foram identificados (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria [online]).

“Streptococcal phospholipase A” (*slaA*) e “Streptococcal phage DNase 1” (*spd1*) são factores de virulência também associados a fagos (Green *et al.*, 2005). O gene *slaA* codifica para enzimas que actua nos fosfolípidos hidrolisando as suas ligações éster (Nagiec *et al.*, 2004). Sabe-se que as proteínas extracelulares codificadas pelo gene *spd1* estão envolvidas na

destruição do DNA, embora o papel destas DNases ainda não tenha sido totalmente elucidado (Broudy *et al.*, 2002; Green *et al.*, 2005).

O gene *prtF1* codifica para proteínas de ligação à fibronectina, este é um factor de virulência importante uma vez que estas proteínas de superfície estão envolvidas na aderência e invasão das células epiteliais. Proteínas de ligação à fibronectina, em particular PrtF1 têm sido associadas à resistência a macrólidos mediada por genes da classe *erm* (que codificam para a resistência a macrolidos, lincosamidos e estreptograminas) indicando assim que *S. pyogenes* consegue resistir a tratamentos e escapar à resposta imune do hospedeiro (Baldassarri *et al.*, 2007; Bisno *et al.*, 2003; Hyde *et al.*, 2001).

1.3. Mobiloma: um novo conceito

Mobiloma é o termo que engloba todos os elementos genéticos móveis (EGM) do genoma, como: bacteriófagos, transposões, plasmídeos, ilhas genómicas e elementos quiméricos, entre outros (Koonin *et al.*, 2008). Estes elementos genéticos móveis são responsáveis pela transferência horizontal de novas funções para a célula bacteriana, sendo reconhecidos como importantes agentes de evolução bacteriana.

Para que os EGM adquiridos por um microrganismo se mantenham como parte integrante do seu conteúdo genético devem codificar para características que lhe sejam benéficas. Tipicamente, isto implica que codifiquem para a resistência a antibióticos, desintoxicação de metais pesados, aquisição e utilização de nutrientes, evasão ou colonização de ambientes específicos. No caso das doenças humanas, os factores mais importantes são a colonização, a aquisição de nutrientes, a evasão às respostas imunitárias inata e adquirida e factores de virulência (Tinsley *et al.*, 2006).

Os transposões são elementos genéticos móveis, envolvidos na circulação intracelular de DNA, constituídos por duas sequências de inserção (IS) que ladeiam um ou mais genes que este transporta. Alguns desses genes conferem por exemplo resistência a antibióticos, produção de toxinas e enzimas degradativas. Os transposões inserem-se aleatoriamente no genoma, podendo inserir-se na região codificante ou de regulação de um determinado gene, levando a que este perca a sua função ou sofra uma mutação. Devido ao seu carácter dinâmico, os transposões têm uma enorme influência na evolução e composição de genomas de plantas e animais. A possibilidade de se inserirem dentro de genes do próprio organismo pode causar diversas patologias (Frost *et al.*, 2005).

Os bacteriófagos foram as primeiras entidades biológicas a serem explorados para o uso em biologia molecular. Os fagos são os mais abundantes e os mais rápidos a replicar. Bacteriófagos virulentos replicam com eficácia e lisam a bactéria hospedeira (Frost *et al.*, 2005). Superantígenos estão incluídos em fagos ou plasmídeos. (Lintges *et al.*, 2007)

S. pyogenes apresenta no seu genoma vários genes de origem fágica, como já foi referido anteriormente. Estes genes são de grande importância uma vez que codificam para factores de virulência e de resistência importantes para a sobrevivência e evolução dos microrganismos. Na Figura 2 estão representados os locais onde os genes de virulência associados a fagos se encontram integrados no genoma de alguns dos serotipos mais comuns da proteína M. Como se pode verificar os genes associados a fagos representam uma grande percentagem do genoma bacteriano e, além disso alguns genes de virulência são codificados pelo mesmo bacteriófago. Algumas das associações que já se conhecem são: *speK* e *slaA*; *speL* e *speM*; *SpeC* e *spd1*; *speI* e *speH* (Banks *et al.*, 2002; Broudy *et al.*, 2002; Green *et al.*, 2005).

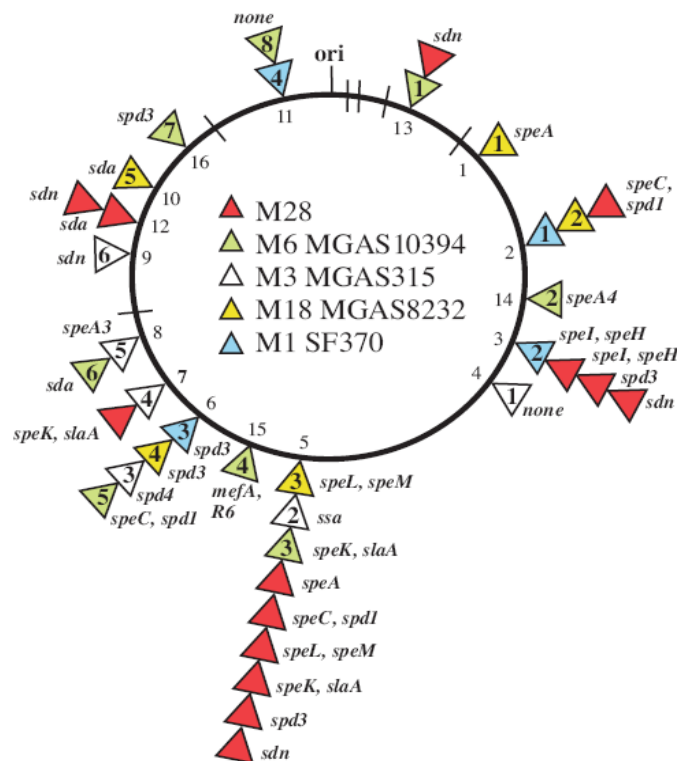


Figura 2 - Esquema representativo dos locais de integração dos genes de virulência codificados em profagos. O círculo preto indica a sequência do genoma compartilhado pelas estirpes de GAS de serotipos M28, M6, M3, M18 e M1. As linhas perpendiculares à linha do círculo representam os locais conservados dos operões rRNA. Os triângulos representam os locais de integração do profago e os genes de virulência associados a cada profago. Os triângulos são codificados por cores para corresponder aos diferentes serotipos de GAS (retirado de Green *et al.*, 2005).

1.4. Enquadramento do tema e objectivos do trabalho

No presente estudo foram analisados 208 isolados de GAS de quatro origens distintas: colonização, faringite/amigdalite, infecção da pele/tecidos moles e doença invasiva. Com o objectivo de verificar se existiam diferenças na distribuição dos genes de virulência pelas origens foi efectuado um estudo de detecção de presença dos seguintes determinantes: *speA*, *speC*, *speH*, *speJ*, *speI*, *speK*, *speL* e *speM*, *prtF1*, *spd1*, *slaA*, *ssa*. Foram pesquisados genes de origem fágica de forma a compreender se estes elementos genéticos móveis podem ser associados à patogenicidade de *S. pyogenes*.

Os isolados utilizados para a realização deste trabalho foram seleccionados de uma amostra inicial de 1629 isolados recolhidos de crianças e adultos de vinte unidades de ensino (quinze creches e cinco escolas) e oito instituições de saúde (cinco centros ambulatoriais e três hospitais) localizados na área de Lisboa, Portugal, entre 2000 e 2007. Dos 1629 isolados, 1026, foram obtidos de esfregaços de garganta de populações com colonização assintomática durante o período de 2000-2007 e 603 isolados foram obtidos de crianças e adultos com diagnóstico de infecções clínicas: 487 com amigdalite/faringite, entre 2000-2206, 72 com infecção de pele ou dos tecidos moles entre 1999-2005 e 44 com doença invasiva entre 1999-2005 (Pires *et al.*, 2005 e 2009).

Em 2005, Pires e os seus colaboradores, analisaram 511 isolados de *S. pyogenes*, recolhidos durante o período de 2000-2002, no distrito de Lisboa, de quatro origens distintas (colonização, faringite/amigdalite, infecção da pele e doença invasiva). O principal objectivo do trabalho foi analisar se existiam diferenças na resistência do agente patogénico a macrolidos, lincosamidas e tetraciclina consoante a sua origem. Este estudo demonstrou que a resistência a macrolidos e tetraciclina difere nas várias origens clínicas de GAS e que desde o ano 2000, em Portugal, a resistência de GAS tem vindo a sofrer alterações significativas, tanto para os isolados de colonização como para os diversos tipos de infecção.

Em 2009, Pires e os seus colaboradores com o objectivo de verificarem a resistência de *S. pyogenes* à bacitracina, analisaram 1629 isolados associados a colonização e infecções. Nesse estudo foram pesquisados vários genes de virulência a fim de se associar os genes de virulência a serótipos M, uma vês que os diferentes tipos de proteína M estão associados a resistência dos isolados a macrolidos.

As indicações recolhidas nestes estudos prévios (Pires *et al.*, 2005 e 2009) levaram ao interesse na realização da presente investigação.

2. Material e métodos

2.1. Caracterização da colecção em estudo

Para este estudo, seleccionaram-se 208 isolados das quatro origens obtidas (98 de colonização, 72 de amigdalite/faringite, 31 de infecção da pele/tecidos moles e 12 de doença invasiva) que apresentassem o mesmo padrão de *Pulse Field Gel Electrophoreses* (PFGE) em diferentes origens (total de 47 padrões diferentes) e por cada padrão de PFGE de cada origem seleccionou-se um mínimo de 2 isolados de determinado *emm*-type.

2.2. Meios e condições de crescimento

O meio de crescimento utilizado para o crescimento das estirpes na fase inicial foi *Tryptic Soy Agar* (TSA, Difco) suplementado com 5% de sangue de carneiro (Probiológica). As estirpes cresceram, a 37°C durante 14-16h, sendo posteriormente conservadas a -80°C em meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI, Biokar Diagnostics) com glicerol a 20%.

2.3. Presença/ausência de genes de virulência

2.3.1. Técnica de extracção de DNA

As estirpes conservadas a -80°C foram descongeladas e com o auxílio de uma ansa procedeu-se à técnica de espalhamento em placa de TSA suplementado com 5% de sangue de carneiro. As estirpes cresceram durante 14-16h a 37°C. Após o crescimento as células foram recolhidas com o auxílio de uma ansa e ressuspendidas em 250µl de TE (100mM Tris; 10mM EDTA) com lisozima (10mg/L) e incubados 1hora a 37°C. O DNA total foi extraído segundo o método do tiocianato de guanidina (Pitcher *et al.*, 1989).

2.3.2. Técnica de PCR

Neste estudo pesquisou-se a presença dos seguintes genes de virulência: *speA*, *speC*, *speH*, *speJ*, *speI*, *speK*, *speL* e *speM*, *prtF1*, *spd1*, *slaA* e *ssa* de acordo com o especificado na Tabela 1.

Tabela 1 - Primers e respectivos controlos utilizados nas reacções de PCR.

Gene	Sequência (5'→ 3')	Dimensão do produto (pb)	Controlo positivo	Referência
multiplex 1	<i>speA</i> F:TAAGAACCAAGAGATGG R:ATTCTTGAGCAGTTACC	248	S69*	Schmitz <i>et al.</i> , 2003
	<i>speC</i> F:GATTTCTACTTATTTACC R:AAATATCTGATCTAGTCCC	584	S69*	
	<i>speH</i> F:AGATTGGATATCACAGG R:CTATTCTCTCGTTATTGG	416	1002*	
multiplex 2	<i>speI</i> F:AAGGAAAAATAAATGAAGGTCCGCCAT R:TCGCTTAAAGTAATACCTCCATATGAATTCCTT	217	GAP 65 [§]	Lingtes <i>et al.</i> , 2007
	<i>speM</i> F:CCAATATGAAGATAACAAAGAAAATTGGCACCC R:CAAAGTGACTTACTTTACTCATATCAATCGTTTC	600	VSD7 [§]	
multiplex 3	<i>speK</i> F:TACAAATGATGTTAGAAATCCAAGGAACATATATGCT R:CAAAGTGACTTACTTTACTCATATCAATCGTTTC	656	VSD1 [§]	Lingtes <i>et al.</i> , 2007
	<i>speL</i> F:GGACGCAAGTTATTATGGATGCTCA R:TTAAATAAGTCAGCACCTTCCTCTTTCTC	460	GAP 17 [§]	
<i>prtF1</i>	F:TATCAAATCTTCTAAGTGCTGAG R:AATGGAACACTAACTTCGGACGGG	780 - 1200	DSMZ2071 [£]	Chhatwal <i>et al.</i> , 1994
<i>spd1</i>	F:CCCTTCAGGATTGCTGTCAT R:ACTGTTGACGCAGCTAGGG	400	GAP 17 [§]	Green <i>et al.</i> , 2005
<i>slaA</i>	F:CTCTAATAGCATCGGCTACGA R:AATGGAATAAGTGGCACTGAAAG	440	GAP 106 [§]	Green <i>et al.</i> , 2005
<i>ssa</i>	F:AGTCAGCCTGACCCTAC R:TAAGGTGAACCTCTAT	691	8563*	Reda <i>et al.</i> , 1994
<i>rRNA16S</i>	F - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R - CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	907		Massol-Deya <i>et al.</i> , 1995

Nota: * Estirpes *S. pyogenes* gentilmente cedidas por Birgitta Henriques-Normark.

[§] Estirpes "Veterinary *Streptococcus dysgalactiae*" (VDS1 e VDS7) e *S. pyogenes* (GAP 65, GAP 17, GAP 106) gentilmente cedidas por Ilda Santos-Sanches.

[£] Estirpes referência obtidas na DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemanha).

As reacções de PCR foram realizadas no termociclador (Biometra) e após a obtenção dos produtos de amplificação, utilizou-se uma alíquota de 5µl para visualizar os resultados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (Tris Borato EDTA) a 0,5X através da técnica de electroforese a uma voltagem de 95V durante 2 horas.

2.3.3. *Análise de dados*

Para analisar os dados relativos à presença/ausência de genes de virulência foi construída uma Tabela de dados booleanos em que **1** indica presença e **0** ausência do gene. A reprodutibilidade da técnica foi confirmada com a repetição de 10% das amostras, seleccionadas aleatoriamente, para todos os genes em estudo.

A análise do χ^2 das tabelas de contingências foi utilizado para determinar a independência estatística entre a presença dos genes de virulência e as origens dos isolados (Zar, 1996).

Paralelamente, a matriz de dados booleanos foi introduzida no *software* BioNumerics® (versão 4.61; Applied Maths, Kortrijk, Bélgica, 1998) para a construção de um dendograma com a finalidade de seleccionar 20 isolados (10% da colecção) para a análise de expressão génica (ver ponto 2.4). As semelhanças foram calculadas com recurso ao coeficiente *simple matching* e ao método de aglomeração UPGMA. Os 20 isolados foram seleccionadas segundo os seguintes critérios: grau de semelhança entre isolados superior a 70%, perfis de PFGE diferentes entre os isolados seleccionados mas os mais comuns relativamente a amostra total, maior quantidade de genes e diferentes origens.

2.4. **Análise da expressão génica: estudos preliminares**

2.4.1. *Ensaio de crescimento*

Os ensaios de crescimento foram realizados no equipamento *Microbiology Workstation Bioscreen C*® (ThermoLabSystems). Este aparelho monitoriza a turbidez das amostras ao longo do tempo gerando curvas de crescimento e faz automaticamente o cálculo dos parâmetros de crescimento (e.g. tempo de geração e taxa máxima de crescimento).

As 20 estirpes seleccionadas, foram incubadas a 37°C durante 14-16h em meio 2YT [2 × *yeast tryptone* – 1,6% (p/v) triptona, 1,0% (p/v) extracto de levedura e 0,5% (p/v) NaCl] pH 7, para garantir que as culturas se encontravam em fase activa. Seguidamente mediu-se a densidade óptica (D.O.) de modo a recolher aproximadamente 10⁹ UFC (unidades formadoras de colónias). Os pellets obtidos por centrifugação foram ressuspensos em 100 µl de tampão fosfato (PBS) 10 mM pH 7. O meio 2YT, que serve como controlo e o meio BHI que simula as condições de infecção foram distribuídos na microplaca do Bioscreen C® (cada placa contém 100 poços e cada poço levou 300 µl de meio). Cada poço da placa foi inoculado com 3µl de suspensão celular. As placas foram incubadas no equipamento a 37°C durante 24 horas. As leituras da D.O. foram realizadas de 30 em 30 minutos, com agitação prévia de 30 segundos. Foi utilizado o filtro 'wide band' que inclui os comprimentos de onda de 420 nm até 580 nm para evitar que as alterações de cor dos meios de cultura influenciassem os resultados. O ensaio foi realizado em triplicado.

2.4.2. Recolha de células em pontos específicos da curva de crescimento

Através dos resultados obtidos no ensaio realizado no Bioscreen C[®] determinou-se o número de horas que cada isolado demoraria a atingir a fase estacionária, para cada meio de cultura seleccionado. O gráfico que se segue (Figura 3) ilustra uma curva de crescimento bacteriano típica, em que a fase *lag* corresponde à adaptação dos microrganismos ao meio, a fase exponencial a uma taxa de duplicação elevada, a fase estacionária à escassez de nutrientes e a fase de declínio ao esgotamento dos mesmos e consequente decréscimo de crescimento bacteriano. Os pontos T1 e T2 assinalados correspondem ao fim da fase exponencial e a 2 horas depois, respectivamente, e representam os momentos em que o crescimento bacteriano foi interrompido e se procedeu à recolha das células para posterior análise.

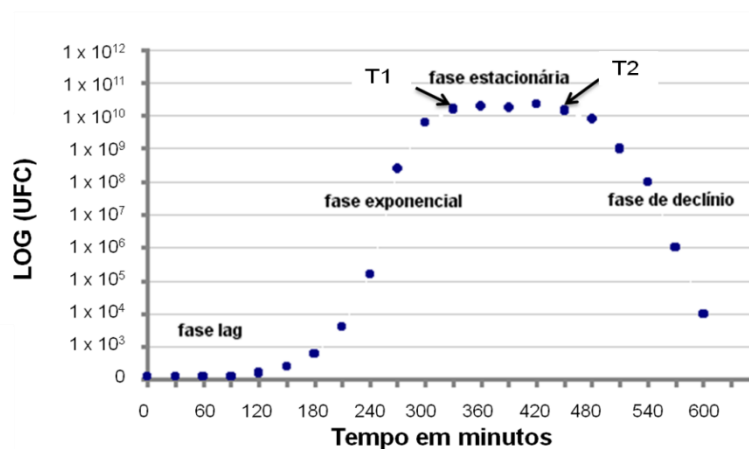


Figura 3 - Padrão típico de crescimento de uma cultura microbiana. Os números indicam os dois pontos de recolha das células neste trabalho. O número 1 representa o final da fase exponencial e corresponde ao primeiro ponto de recolha, que neste gráfico acontece aos 330 minutos aproximadamente, o número 2 corresponde ao segundo ponto de recolha que se verifica 2 horas após o primeiro ponto de recolha (adaptado de Bioquimicabacterias [online]).

Assim, inicialmente, as culturas cresceram durante 16h, em meio 2YT, pH 7, a 37°C, e foram medidas as respectivas D.O. para, tal como descrito no passo anterior, o número de células a recolher fosse idêntico (10^9 UFC). As células foram recolhidas por centrifugação, seguidamente foram lavadas com 500 μ l de PBS e ressuspendidas em 100 μ l do mesmo tampão. Seguidamente, 10 ml de cada um dos meios seleccionados (2YT e BHI) foi inoculado com 100 μ l de suspensão bacteriana. Os inóculos cresceram à temperatura de 37°C, o número de horas determinado para cada isolado de modo a atingir a os pontos T1 e T2, previamente seleccionados para recolha das células.

2.4.3. Técnica de extracção de RNA

Nos tempos T1 e T2 as células foram recolhidas por centrifugação e ressuspensas em 1ml de TE. A extracção de RNA foi feita segundo o método do Trizol® (Invitrogen, Life Technologies). Para confirmar a qualidade/quantidade de RNA visualizou-se 5µl da amostra em gel de agarose a 1% em tampão TBE a 0,5X através da técnica de electroforese a uma voltagem de 95V durante 1h e 30 min. De seguida, efectuou-se o tratamento com DNase I (Invitrogen, Life Technologies) a fim de remover o DNA residual. Assim, cada 1 µg de RNA foi tratada com 1U DNase I por incubação a 37°C durante 45 min. Seguidamente adicionou-se 1 µl de EDTA (25mM) e incubou-se a 65 °C durante 15 min. A eficiência do tratamento foi verificada por PCR dirigido para o gene constitutivo rRNA16S. A ausência de amplificação nas amostras de RNA e a amplificação na amostra de DNA (controlo positivo) confirmaram a eficácia do tratamento.

2.4.4. Técnica de RT-PCR

Para a síntese da primeira cadeia de cDNA foi adicionado, aproximadamente 100ng de RNA total tratado com DNase, 1 µl de 'primers' aleatórios a 300ng/µl, 1 µl de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) a 10 mM e água estéril tratada com 'Diethylpyrocarbonate' (DEPC) a fim de perfazer um volume final de 13 µl. A mistura foi incubada a uma temperatura de 65°C durante 5 min e rapidamente arrefecida em gelo durante 1 min. Seguidamente, para perfazer um volume final de 20 µl foram adicionados, pela ordem apresentada, os seguintes componentes: 4 µl de '5X First-Strand Buffer', 1µl de 0,1 M 'Dithiothreitol' (DTT), 1 µl de 'RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor' (40 U/µl) e 0,5 µl de 'SuperScript™ III RT' (200 U/µl). A solução foi homogeneizada, mantida a 25°C durante 10 min, incubada a 50°C 1h e finalmente a enzima foi inactivada a 70°C 15 min. As amostras foram mantidas a 4°C até posterior amplificação por PCR. Todos os reagentes utilizados para as reacções de RT-PCR foram adquiridos à Invitrogen.

2.4.5. Técnica de PCR

Os cDNAs obtidos foram amplificados para os genes *speA*, *ssa*, *slaA* e *spd1*. O gene constitutivo rRNA 16S foi utilizado como controlo. A mistura foi preparada com os seguintes componentes: 2,5 µl de tampão de PCR 10x, 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 0,8 µl de cada 'primer', 0,2 µl de 'Taq DNA polymerase' (5 U) e 1 µl de cDNA. As reacções de PCR foram realizadas no termociclador (Biometra) segundo as condições apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Primers e respectivos controlos utilizados nas reacções de PCR.

Gene	Sequência (5'→ 3')	Dimensão do produto	Referência
<i>speA</i>	F: 5' TAA GAA CCA AGA GAT GG R: 5' ATT CTT GAG CAG TTA CC	248 bp	Schmitz <i>et al.</i> , 2003
<i>ssa</i>	F: 5' AGT CAG CCT GAC CCT AC R: 5' TAA GGT GAA CCT CTA T	691 bp	Reda <i>et al.</i> , 1994
<i>slaA</i>	F: 5' CTC TAA TAG CAT CGG CTA CGA R: 5' AAT GGA AAA TGG CAC TGA AAG	440 bp	Green <i>et al.</i> , 2005
<i>spd1</i>	F: 5' CCC TTC AGG ATT GCT GTC AT R: 5' ACT GTT GAC GCA GCT AGG G	400 bp	Green <i>et al.</i> , 2005

Os resultados foram visualizados em gel da agarose a 1% com tampão TBE a 0,5X no sistema de electroforese a uma voltagem de 95V durante 1h e 30 min.

2.4.6. *Análise de dados*

As imagens obtidas foram analisadas no 'software' ImageJ 1.40g (National Institutes of Health, EUA). A densidade integrada foi calculada através da selecção da área de cada amplicão. Com o objectivo de comparar a influência dos diferentes meios no nível de expressão dos genes de virulência, cada valor de densidade integrada obtido foi normalizado usando o valor da densidade integrada obtida para os genes 'housekeeping' rRNA 16S, assim, os níveis de expressão (NE) foram calculados segundo a equação 1 (Carlos *et al.*, 2009).

$$NE = \frac{\text{Gene de virulência x no meio de cultura A}}{\text{Gene rRNA 16S no meio de cultura A}} \quad (1)$$

2.5. Indução de profagos em *S. pyogenes*

Os 20 isolados seleccionados anteriormente no ponto 2.3.3 foram também utilizados nos testes de indução fágica. Inicialmente, e para cada isolado, inocularam-se dois tubos com 2 ml de BHI utilizando 20 µl de cultura; tendo um desses tubos sido suplementado com 2 µl de mitomicina C (1mg/ml). As estirpes indicadoras *Bacillus subtilis* (IGC1065.IG3c+ e IGC Su3+)* e *Streptococcus pyogenes* (GAP 17 e GAP 109)* foram também inoculadas em 2 ml de BHI. Os inóculos foram mantidos a 37°C durante aproximadamente 16h. Os sobrenadantes dos isolados a analisar, obtidos por centrifugação (4000rpm, 10min), foram filtrados com filtros de 0,45µm. A cada uma das placas previamente preparadas com BHI sólido (1,5% de agar) foi adicionada uma camada BHI semi-sólido (0,7% de agar) com 200µl da estirpe indicadora incluída no meio. Após o meio solidificar foi inoculado com gotas de 5µl de cada um dos sobrenadantes em estudo. As placas foram mantidas a 37°C durante 16h. A análise foi efectuada por pesquisa de halos nas placas de indução fágica.

3. Resultados e Discussão

3.1. Presença/ausência de genes de virulência

Foram pesquisados 13 genes de virulência (*speA*, *speC*, *speH*, *speJ*, *speL*, *speK*, *speM*, *prtF1*, *spd1*, *slaA* e *ssa*) para os 208 isolados seleccionados de quatro origens distintas: colonização (93 isolados), faringite/amigdalite (72 isolados), infecção de pele/tecidos moles (31 isolados) e doença invasiva (12 isolados) com a finalidade de compreender se existiam diferenças significativas entre os genes detectados nos isolados das diferentes origens. Os resultados obtidos encontram-se compilados na Tabela 1 em anexo.

Estudos anteriores revelaram os genes seleccionados para o presente estudo estão directamente envolvidos na virulência e resistência deste agente patogénico (Pires *et al.*, 2009). Embora o estudo de presença/ausência não seja tão significativo como um estudo de expressão é uma boa ferramenta para relacionar as diferentes patologias com a presença de determinado(s) gene(s).

As Figuras 4 e 5 mostram os gráficos obtidos a partir dos dados obtidos e registados na Tabela 1 (em anexo) das reacções de PCR gene-específico para detecção de genes de virulência.

A Figura 4 indica a presença dos genes de virulência nos isolados em relação ao número total de isolados (n=208) enquanto a Figura 5 apresenta os dados em percentagem relativamente ao total de cada origem, tendo em conta que o número de isolados não está uniformemente distribuído pelas quatro origens.

No gráfico da Figura 4 pode-se verificar que os isolados de colonização (93 isolados), embora estejam em maior número, apresentam percentagens inferiores de presença de genes, quando comparados com isolados de faringite/amigdalite (72 isolados). Assim, para a globalidade dos resultados visualizados na Figura 4, as percentagens de presença para os genes de virulência variam, na colonização, entre 2,40 % (*speH*) a 17,31 % (*speK*), para faringite/amigdalite, entre 3,85 % (*speJ*) a 20,19 % (*spd1*), na pele/doença tecidos moles entre 0,48 % (*speJ*) e 9,13 % (*speL*) e nos isolados de doença invasiva variam entre 0,48 % (*ssa*) a 9,13 % (*speL*).

Como se pode facilmente observar na Figura 5, para a maioria dos genes, a doença invasiva apresenta uma maior incidência de genes em contraste com os isolados de colonização que, com excepção do gene *ssa*, apresentam sempre percentagens inferiores.

As percentagens de presença para os genes de virulência variam na colonização entre 5,38 % (*speH*) a 38,71 % (*speK*), na faringite/amigdalite variam entre 11,11 % (*speJ*) a 58,33 % (*spd1*), na pele/doença tecidos moles entre 3,23 % (*speJ*) e 61,69 % (*speI*) e na doença invasiva variam entre 8,23 % (*ssa*) a 83,33 % (*speI*).

Tal como em estudos anteriores, o presente estudo revelou, que a presença de genes de virulência não é aleatória e que uma maior quantidade de genes está associada a isolados de doenças invasivas em contraste com os de colonização, que possuem uma menor quantidade de genes de virulência (Commons *et al.*, 2008, Maripuu *et al.*, 2008, McMillan *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2006).

Relativamente aos genes *spe*, em todos os que foram pesquisados, com excepção do gene *speL*, observou-se uma percentagem de presença nos isolados de doença invasiva sempre superior em relação aos isolados das outras três origens e nos isolados de colonização as percentagens de presença foram as mais reduzidas em cinco dos oito *spe* pesquisados (ver Figura 5). Vários autores defendem que as exotoxinas pirógenicas são potentes superantígenos, de origem fágica, e que se encontram associadas às patologias mais graves como síndrome do choque tóxico e escarlatina (Bisno *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2005) e, mais uma vez, os resultados obtidos neste trabalho são concordantes com a literatura.

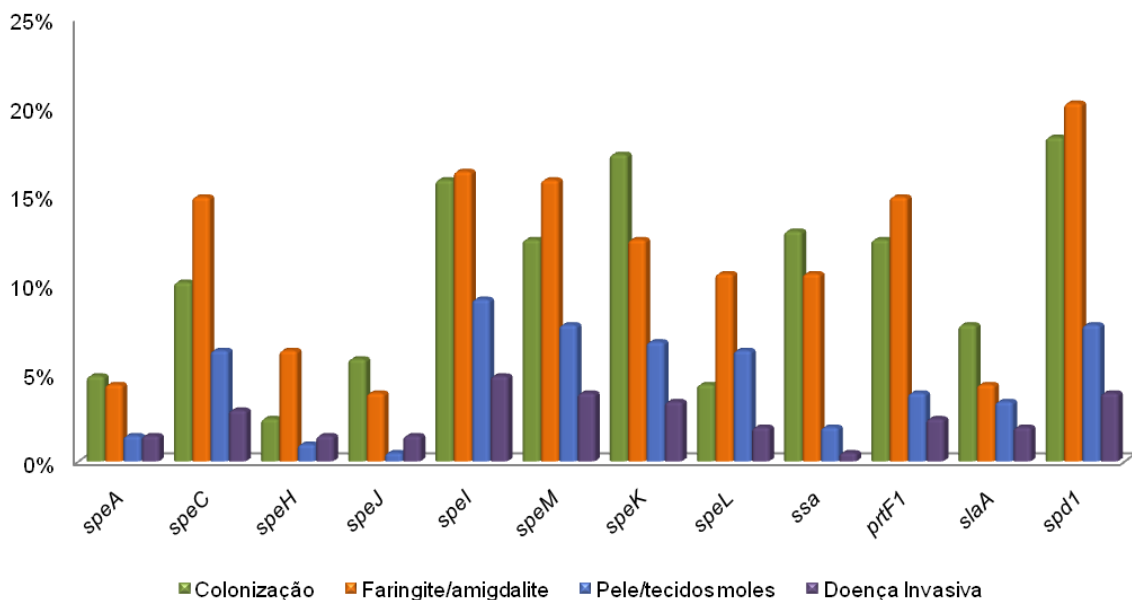


Figura 4 - Presença de genes de virulência em função das diferentes origens: colonização (93 isolados), amigdalite/faringite (72 isolados), pele/tecidos moles (31 isolados) e doença invasiva (12 isolados). As percentagens são relativas ao total dos isolados (n=208).

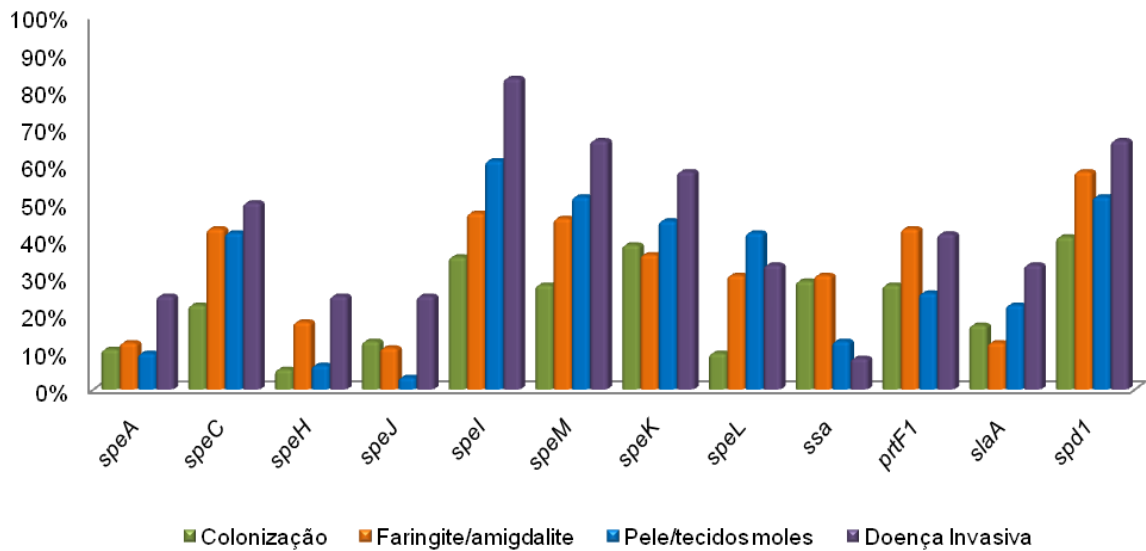


Figura 5 - Presença de genes de virulência em função das diferentes origens: colonização (93 isolados), amigdalite/faringite (72 isolados), pele/tecidos moles (31 isolados) e doença invasiva (12 isolados). As percentagens são relativas ao total de isolados de cada origem incluídos neste estudo.

Tal como Green e os seus colaboradores que, em 2005, detectaram que a presença do gene *ssa* nos seus isolados de doença invasiva e de faringite era reduzida, neste trabalho, apesar das percentagens nas origens colonização e faringite/amigdalite atingirem cerca de 29% e 30%, respectivamente, nas outras duas origens a percentagem de presença do gene nos isolados é mais reduzida (aproximadamente 13% para isolados de pele/tecidos moles e 8% para isolados de doença invasiva). Sabe-se que o gene *ssa* actua como superantigénio, que é codificado por profagos e que a sua expressão pode levar às patologias mais graves, como o síndrome do choque tóxico e a escarlatina. (Green *et al.*, 2005). Uma vez que a presença deste gene, nomeadamente em isolados de origem invasiva, é baixa, isso leva-nos a crer que as patologias desenvolvidas nos pacientes poderão não estar associadas a este gene mas a outros.

O gene *prtF1* apresentou percentagens semelhantes para isolados de duas origens distintas, faringite/amigdalite (43%) e doença invasiva (41%). As percentagens apuradas para as outras duas origens foram também semelhantes entre si (cerca de 26%). Este gene codifica para proteínas de ligação à fibronectina e está associado à capacidade que *S. pyogenes* tem para invadir as células epiteliais (Baldassarri *et al.*, 2007; Bisno *et al.*, 2003). Assim, como Baldassarri e seus colaboradores apuraram, também neste estudo não se verificou nenhuma associação entre este gene e os isolados de diferentes origens (Baldassarri *et al.*, 2007; Talay *et al.*, 1994).

Os genes *slaA* e *spd1*, ambos codificados por fagos, encontram-se distribuídos em percentagens superiores nos isolados de origem doença invasiva (cerca de 66% e 33%, respectivamente) em comparação com as outras três origens em estudo. Sabe-se que estes genes codificam para enzimas que actuam hidrolisando as ligações éster (*slaA*) e destruindo o DNA (*spd1*) (Broudy *et al.*, 2002; Nagiec *et al.*, 2004) e, estando associados a doença, seria de esperar que as percentagens de presença do gene em isolados de doença invasiva fossem superiores, tal como se observou.

A Figura 6 apresenta os genes de virulência distribuídos pelas quatro origens distintas também com base nos resultados obtidos pelas reacções de PCR gene-específico registadas na Tabela 1 em anexo. O gráfico da Figura 5 tem como objectivo mostrar de uma forma mais clara como os genes se distribuem pelas diferentes origens. Mais uma vez se pode observar que existe uma maior percentagem de genes de virulência nos isolados de doença invasiva.

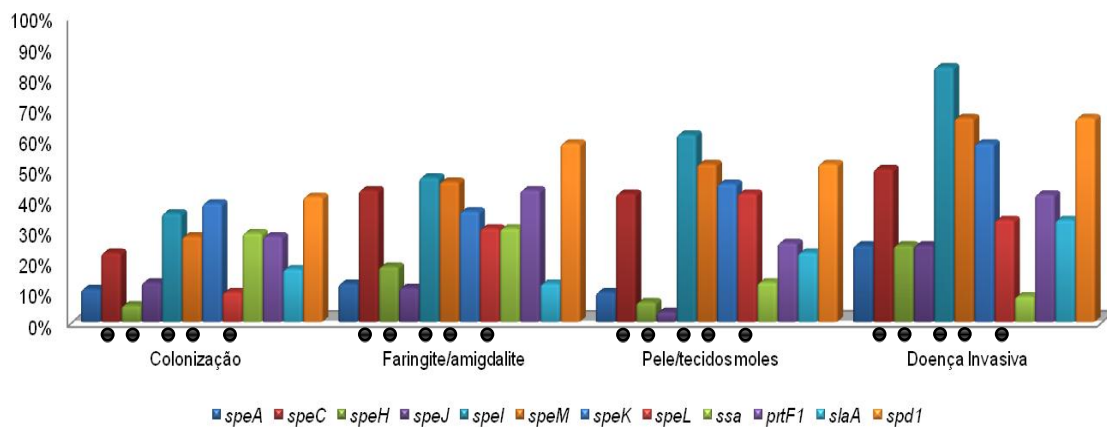


Figura 6 - Distribuição de genes de virulência pelas quatro origens: colonização (93 isolados), amigdalite/faringite (72 isolados), pele/tecidos moles (31 isolados) e doença invasiva (12 isolados). As percentagens são relativas ao total de isolados de cada origem. Os genes assinalados com o símbolo ● apresentam diferenças estatisticamente significativas relativamente à sua origem.

A análise estatística do χ^2 aplicada à presença/ausência de genes de virulência revelou que os genes *speC*, *speH*, *speI*, *speM* e *speL* apresentam diferenças estatisticamente significativas relativamente à sua origem ($P < 0,05$). A análise estatística permite ainda afirmar que os mesmos genes de virulência apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) em relação à origem colonização e o gene *speH* apresenta também, para além da relação referida, em relação à origem pele/tecidos moles, podendo-se afirmar que a origem referida está relacionada com a presença do gene. Em relação aos restantes genes de virulência não se observou qualquer diferença estatisticamente significativa quando se analisou a sua presença nos isolados das diferentes origens. Uma vez que os *spe* estão associados a patologias graves seria de esperar que existisse uma relação entre esses genes e os isolados originários de pacientes com doença. O facto de tal associação não se ter verificado pode ter a ver com as diferenças nos números de isolados de cada origem, que podem ter enviesado os resultados.

Para uma análise mais detalhada da distribuição dos genes pelas quatro origens, a tabela de dados booleanos foi introduzida no *software* BioNumerics® para a construção de um dendrograma (Figura 7). Considerando um nível de semelhança de 70% entre as estirpes podemos observar quinze *clusters*, representados na Figura 7 por letras (A-O). Com base neste dendrograma, tendo em conta grau de semelhança entre isolados superior a 70%, perfis de PFGE diferentes entre os isolados seleccionados mas os mais comuns relativamente à amostra total, maior quantidade de genes e diferentes origens, foi possível seleccionar 20 estirpes para o estudo de expressão génica (assinaladas na Tabela 1 em anexo).

Analisando o dendrograma obtido, os *clusters* A e B representam cerca de 50% da amostra total de isolados. Enquanto nestes dois *clusters* a quantidade de genes de virulência por isolado que varia entre zero e quatro nos restantes *clusters* varia entre dois e nove. Os dois primeiros *clusters* contêm cerca de 62% dos isolados provenientes de colonização, 38% de faringite/amigdalite, 48% de infecção de pele/tecidos moles e 16% de doença invasiva (percentagem relativa ao número de isolados por origem). Estes resultados podem confirmar, de uma forma clara, que os isolados provenientes de colonização contêm menos genes de virulência quando comparados com as outras três origens em estudo.

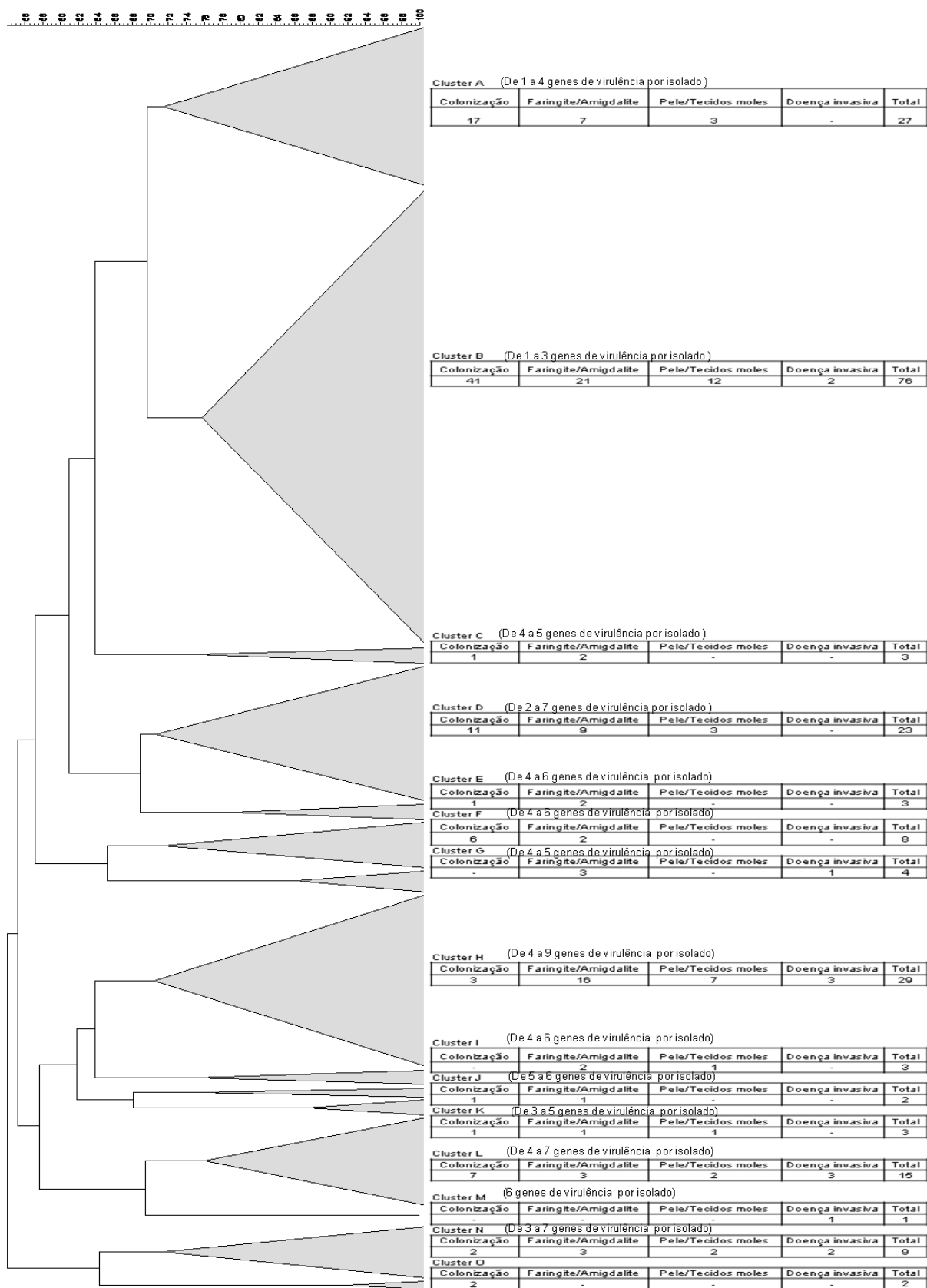


Figura 7 - Dendrograma representativo dos genes de virulência pesquisados para os 208 isolados de GAS. A semelhança foi calculada com o coeficiente *simple matching* e o método de aglomeração UPGMA. Em cada *cluster* está indicado o número de isolados nele associados e a distribuição dos mesmos pelas quatro origens distintas.

Estudos anteriores compararam isolados de GAS de doenças invasivas e não invasivas, tendo em conta o seu perfil de proteína M, *emm type*, e a presença de genes de virulência e concluíram que isolados de doença invasiva possuem, na generalidade, maior quantidade de genes de virulência e que a distribuição dos *emm-type* também seria diferente e estaria associada com a origem do isolado (Maripuu *et al.*, 2008, McMillan *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2006). Em 2008, Commons e seus colaboradores, ao efectuarem um estudo sobre a presença de superantígenos em GAS e a sua relação com os tipos *emm* concluíram que os genes não se distribuíam aleatoriamente pelos isolados, que existe uma correlação entre os genes de virulência e o *emm-type* e que grupos específicos de genes são mais comuns em determinados *emm-type* (Commons *et al.*, 2008). Os fenótipos M mais comumente associados a patologias parecem ser M1, M3, M6, M18 e M28 (Green *et al.*, 2005).

A determinação do *emm-type*, para os isolados analisados no presente trabalho, foi efectuada por Pires e seus colaboradores para 158 dos 208 GAS em análise. Os *emm-types* observados com mais frequência foram M1 (25%), M4 (12%), M6 (10%) e M28 (12%). Nos *clusters* A e B do dendrograma apresentado na Fig. 7 estão representados 50% dos isolados para os quais existem *emm-types* determinados, pelo que nos é possível comparar estes dois *clusters* com os restantes (*clusters* C a Q). Nos primeiros dois *clusters* as percentagens de isolados com fenótipos M1 (22,5%), M6 (23,5%) e M28 (5,26%) são sempre inferiores relativamente às percentagens observadas nos *clusters* de C a Q. Por outro lado, o fenótipo M4 aparece distribuído de forma equivalente nos dois grupos de *clusters* comparados. Assim, estes resultados parecem indicar o verificado por outros autores, ou seja, que fenótipos M1, M6 e M28 estão associados maioritariamente a isolados provenientes de patologias e não de colonização, uma vez que se encontram maioritariamente distribuídos pelos *clusters* de C a Q. Estes *emm-type*, por inferência, estão também associados a uma maior quantidade de genes de virulência por isolado.

3.2. Análise da expressão génica: estudos preliminares

Os ensaios de crescimento realizados no *Microbiology Workstation Bioscreen C*[®] geraram 60 curvas de crescimento (3 curvas para cada isolado) para o meio de cultura controlo (2YT) e para o meio de cultura seleccionado para simular as condições de infecção (BHI). Com o objectivo de determinar os tempos T1 e T2 para a recolha de células, foi feita a média das três curvas de crescimento obtidas para cada isolado e meio de crescimento. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 3. Na Figura 8 estão representados dois gráficos representando curvas de crescimento obtidas para cada meio de cultura, a título exemplificativo.

Tabela 3 - Média de horas, para a recolha de células, nos tempos T1 e T2, referentes às 20 estirpes seleccionadas.

Isolados	2YT		BHI	
	T1 (h)	T2 (h)	T1 (h)	T2 (h)
GAP 38	06:00	08:00	06:00	08:00
GAP 83	06:00	08:00	07:00	09:00
GAP 106	07:30	09:30	08:30	10:30
GAP 111	04:42	06:42	06:00	08:00
GAP 115	05:30	07:30	06:00	08:00
GAP 124	06:00	08:00	05:18	07:18
GAP 132	04:00	06:00	06:00	08:00
GAP 152	05:00	07:00	05:18	07:18
GAP 174	04:00	06:00	04:30	06:30
GAP 279	05:00	07:00	07:00	09:00
GAP 308	06:00	08:00	07:48	09:48
GAP 426	04:30	06:30	05:30	07:30
GAP 511	04:12	06:12	06:00	08:00
GAP 679	06:42	08:42	06:00	08:00
GAP 711	07:48	09:48	06:00	08:00
GAP 801	07:00	09:00	07:18	09:18
GAP 823	05:12	07:12	06:00	08:00
GAP 847	04:30	06:30	03:42	05:42
GAP 1006	07:00	09:00	05:30	07:30
GAP 1106	06:42	08:42	05:30	07:30

De um modo geral pode-se verificar, através da análise da Tabela 3 e da observação dos gráficos apresentados na Figura 8 que os isolados mantêm-se mais tempo na fase exponencial e atingem densidades ópticas superiores no meio de cultura BHI, como seria de esperar, uma vez que este meio é mais rico em nutrientes.

A análise da expressão génica foi realizada para as vinte estirpes seleccionadas para os seguintes genes de virulência: *speA*, *ssa*, *slaA* e *spd1*. Apenas se observou expressão para os genes *ssa* e *spd1*, indicando assim que os genes *speA* e *slaA* não estão a ser expressos nos meios de cultura analisados e/ou nos tempos de recolha seleccionados.

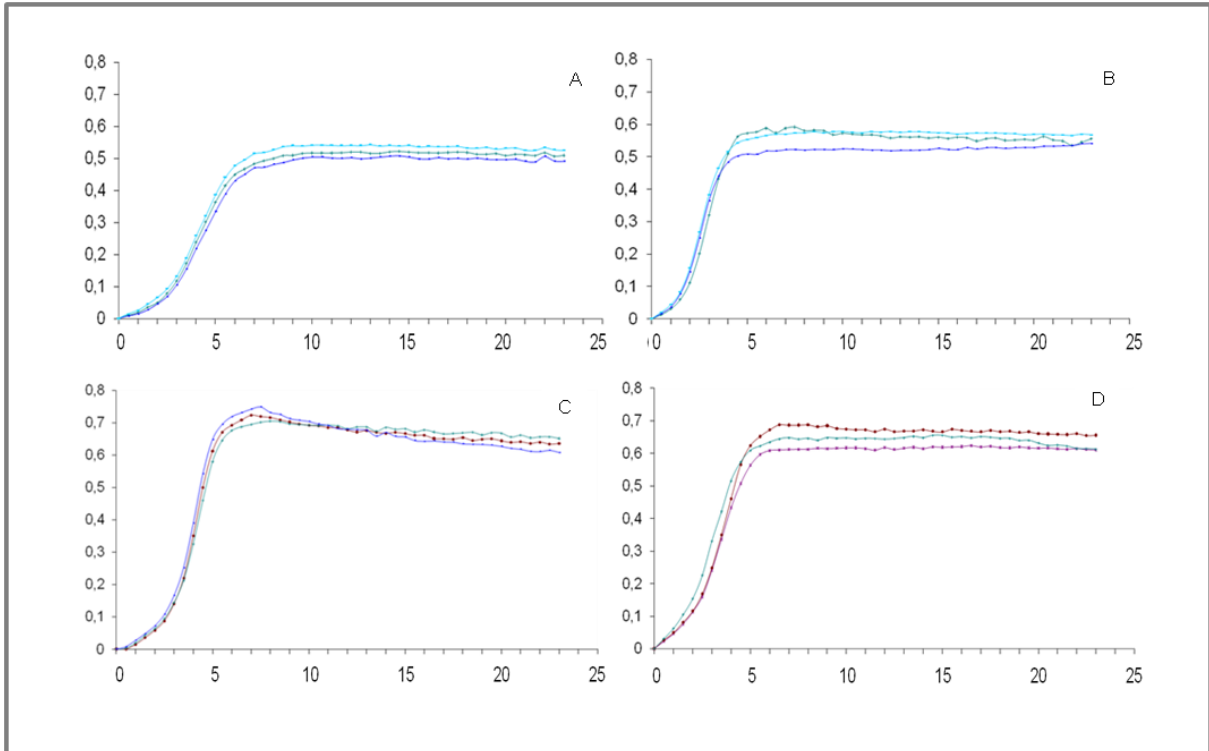


Figura 8 - Curvas de crescimento nos meios de cultura 2YT e BHI. O eixo dos xx representa o tempo em horas e o eixo dos yy representa a densidade óptica. Isolados GAP 68 (A) e GAP 426 (B) em meio de cultura 2YT, GAP 111 (C) e GAP 826 (D) em meio de cultura BHI. Cada gráfico apresenta as 3 réplicas de cada isolado.

A Figura 9 mostra os resultados da análise do nível de expressão génica (ver equação 1 no ponto 2.4.6 material e métodos). Dos nove isolados que apresentaram expressão, quatro são provenientes de colonização, (GAP 511, GAP 679, GAP 1006 e GAP 1106), três são de pele/tecidos moles (GAP 426, GAP 823, GAP 847) e os outros dois provêm de faringite/amigdalite e doença invasiva (GAP 174 e GAP 106 respectivamente). Relativamente ao nível de expressão génica, apenas para dois isolados (GAP 1106 e GAP 174) se observou expressão superior à observada para o gene constitutivo rRNA 16S. Para os restantes isolados, onde se observa um nível de expressão inferior ao do gene constitutivo (valores $NE < 1$), os genes em análise encontram-se sub-expressos em relação ao rRNA 16S. No entanto, este estudo preliminar não se revelou muito conclusivo, provavelmente por ter sido utilizado um número reduzido de isolados e por terem sido pesquisados apenas quatro genes de virulência. Deveriam ter sido utilizados os 208 isolados e pesquisados todos os genes incluídos na fase inicial deste trabalho. Assim sendo, não foi possível associar a expressão dos genes de virulência com a origem do isolado. No entanto, como se pode verificar pela análise dos resultados a maior expressão génica foi observada no meio de cultura BHI, o que seria de esperar uma vez que este meio simula as condições de infecção.

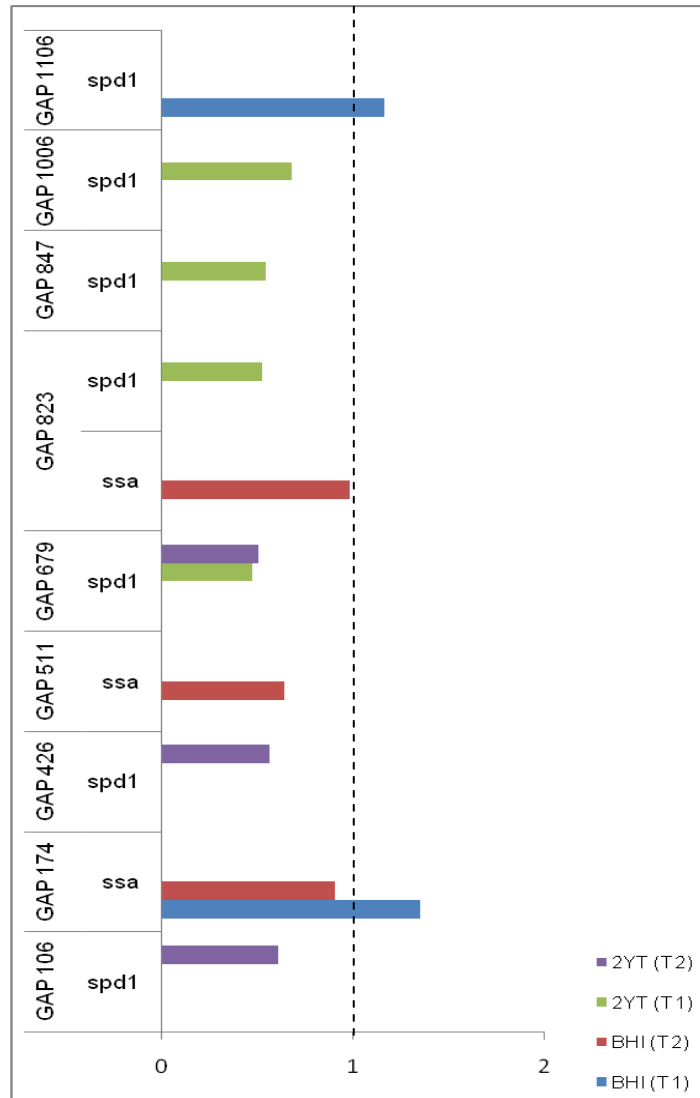


Figura 9 - Gráfico dos níveis de expressão para as estirpes seleccionadas. Apenas foram apresentados no gráfico os isolados onde se verificou expressão dos genes nos meio 2YT e BHI para os tempos T1 e T2. A linha a tracejado representa expressão equivalente à do gene constitutivo rRNA 16S (ver equação 1 no ponto 2.4.6 material e métodos).

Estudos anteriores, efectuados com soro de coelho como meio de crescimento, revelaram que mais de 90% dos isolados de *S. pyogenes* analisados expressam mais de um factor de virulência e que genes de virulência como o *speA* e *speC* aparecem associados a patologias graves como a escarlatina e o síndrome do choque tóxico, em contraste com a faringite, em foram encontrados numa frequência inferior (Musser *et al.*, 1991). Mais recentemente, Graham e seus colaboradores, elaboraram um estudo de análise transcritômica em GAS, utilizando um modelo de ratinho para simular infecções nos tecidos moles e verificaram que este agente patogénico recorre a uma expressão génica coordenada de forma a responder às mudanças ambientais, evitando as defesas do hospedeiro de forma a conseguir evadi-las e a persistir e proliferar nas células epiteliais (Chaussee *et al.*, 2008; Graham *et al.*, 2006). Uma vez que GAS infecta Humanos é provável que expresse diferentes conjuntos de genes que permitam a sua adaptação a cada hospedeiro.

No presente estudo não foi possível comprovar o que já é conhecido sobre expressão génica em *Streptococcus pyogenes* no entanto, é de referir que no isolado GAP 823, e nas condições em análise, expressou os genes *ssa* e *spd1*, o que parece indicar a importância destes genes para o processo infeccioso.

3.3. Indução de profagos em *S. pyogenes*

A análise das placas de indução fágica mostrou que apenas quatro dos vinte isolados seleccionados para este estudo produziram halos, indicando assim a possível presença de fagos. Os isolados que produziram halos, foram GAP 38, GAP 83, GAP 679 e GAP 823, nas estirpes indicadoras IGC1065.IG3c+, IGC Su3+ e GAP 109. Para a estirpe indicadora GAP 17, os resultados foram diferentes, apenas a GAP 38 e GAP 83 produziram halos, no entanto estes halos eram bastante menores que os observados nas outras placas.

Tabela 4 - Resultados das placas de indução fágica.

Isolados	Estirpes indicadoras			
	IGC1065.IG3c+	IGC Su3+	GAP 17	GAP 109
GAP 38	+++	+++	+	+++
GAP 83	++	++	+	++
GAP 679	++	++	-	+
GAP 823	+	+	-	++

Nota: A simbologia +++ a + representa a variação de dimensão do halo; - : ausência do halo.

Como se pode visualizar na Tabela 4 o halo mais evidente foi o formado pelo isolado GAP 38. Os resultados de PCR para a presença/ausência de genes de virulência revelaram que este isolado contém os genes *speC* e *spd1* que, como já foi descrito anteriormente, podem ser transportados pelo mesmo bacteriófago. Assim, o halo observado poderá corresponder à passagem desse fago do ciclo lisogénico ao ciclo lítico, após indução com mitomicina C, o que terá resultado na lise da estirpe indicadora. Os restantes isolados apresentados na Tabela não possuem nenhum conjunto de genes codificado pelo mesmo bacteriófago, pelo menos que se conheça, o que pode explicar a menor dimensão dos halos observados, quando comparados com o GAP 38, talvez o efeito inibitório se deva não à presença de fagos mas à produção de compostos com efeito similar (e.g. bacteriocinas ou ácidos).

O facto de apenas quatro dos vinte isolados produzirem halos, apesar de todos os isolados conterem genes de origem fágica, pode ser devido ao fago já não se encontrar completo no genoma bacteriano, ou seja, os genes podem ter sido adquiridos pela bactéria por meio de

fagos, no entanto, com o passar de gerações e com a replicação e recombinação do genoma bacteriano porções essenciais ao profago podem ter sido suprimidas e este não ter as condições necessárias para passar do ciclo lisogénico ao lítico, lisar as células e libertar-se para o exterior. Fagos não indutíveis podem também resultar de uma integração mal efectuada no cromossoma (Goshorn e Schlievert, 1989).

Embora promissor, o estudo de indução fágica em placa não foi muito conclusivo uma vez que os halos podem ter sido provocados por outros factores como enzimas ou ácidos produzidos pela bactéria e, assim sendo, este estudo teria sempre de ser sujeito a confirmação pela técnica de microscopia electrónica de transmissão e de varrimento. Idealmente deveriam ter sido analisados todos os isolados de forma a compreender as relações existentes entre genes de virulência e a presença de bacteriófagos funcionais.

4. Conclusões e Perspectivas futuras

No presente estudo foi efectuada a pesquisa de genes de virulência, em *S. pyogenes*, isolados de quatro origens distintas a fim de se verificar se existiam diferenças na presença dos genes referidos consoante a origem do isolado. Após a análise dos resultados concluiu-se que os genes de virulência encontram-se em maior percentagem quando se trata de isolados provenientes de patologias como faringite/ laringite, infecção da pele/tecidos moles ou doença invasiva. Estudos anteriores, efectuados noutros países, direccionados também para a pesquisa de genes de virulência obtiveram conclusões semelhantes (Commons *et al.*, 2008, Maripuu *et al.*, 2008, McMillan *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2006).

Embora o estudo de pesquisa de genes de virulência seja necessário torna-se insuficiente, sendo necessário completa-lo com uma análise de expressão génica. No presente estudo essa análise revelou-se pouco conclusiva pois não foi possível pesquisar os treze genes no número total de isolados e também porque, como se sabe, GAS é uma espécie β -hemolítica e espera-se que expresse mais factores de virulência quando se encontra em situações de infecção pelo que se deveria ter utilizado um meio de cultura que simulasse melhor as condições de infecção como o soro animal.

Futuramente, com o propósito de se obterem melhores resultados, o método de transcriptase reversa utilizado deve ser substituído pela técnica de PCR em tempo real ou, idealmente, *microarrays*. PCR em tempo real é um tipo de PCR quantitativo que pode ser usado para analisar as amostras de isolados provenientes por exemplo de colonização e de infecção dando informações sobre a expressão que ocorre nos diferentes meios, em tempo real tendo a vantagem de ser uma técnica menos dispendiosa. Por outro lado, a análise de expressão utilizando a técnica de *microarrays* para bactérias cultivadas *in vivo* parece ser uma boa alternativa para verificar a expressão do gene ajustada a todos os factores do meio envolvente, uma vez que o conhecimento actual sobre a expressão génica das bactérias é baseada principalmente em estudos realizados sob condições controladas de laboratório em que tipicamente apenas uma variável é experimentada de cada vez. Embora essa abordagem contribua para estudos de virulência não consegue simular todos os factores reais próprios do hospedeiro nos quais o agente patogénico tem que se desenvolver (Beyer-Sehlmeyer *et al.* 2005, Curran *et al.*, 2010; Graham *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008; Rosey *et al.*, 2007).

A análise de indução fágica revelou-se pouco conclusiva e não foi suficientemente abrangente para associar os bacteriófagos aos genes de virulência em estudo e

consequentemente às diferentes origens dos isolados. Posteriormente, e uma vez que a técnica se revelou eficiente, o estudo deve englobar a totalidade dos isolados.

Uma investigação adequada sobre o modo como os fagos actuam contribuirá não só para uma melhor compreensão dos factores de virulência, bem como da sua disseminação por diferentes microrganismos e ambientes.

As características genéticas das estirpes de *S. pyogenes* variam de acordo com a região geográfica, tendo também importante papel a densidade populacional da região e as condições climáticas, uma vez que em Portugal não existia um estudo direccionado para a presença de todos os genes de virulência em questão, este trabalho vem contribuir, para o melhor conhecimento dos factores de virulência de *S. pyogenes* neste país, e completar os estudos efectuados anteriormente podendo-se relacionar os genes de virulência pesquisados com o conhecimento já adquirido sobre outros aspectos como factores de resistência e a proteína M.

5. Bibliografia

- **Bioquimicabacterias.** [online]. <http://www.profcupido.hpg.ig.com.br/bioquimicabacterias.htm>. Acesso a 15 de Setembro de 2010.
- **Bisno, A. L., Brito, M. O. and Collins, C. M.** 2003. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect. Dis.* **3**:191–200.
- **Baldassarri, L., Creti, R., Imperi, M., Recchia, S., Pataracchia, M., Orefici, G.** 2007. Detection of genes encoding internalization-associated proteins in *Streptococcus pyogenes* isolates from patients with invasive diseases and asymptomatic carriers. *Journal of Clinical Microbiology.*;45(4):1284-7.
- **Banks, D.J., Beres S.B., Musser J.M.** 2002. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. *Trends in Microbiology.*;10(11):515-21.
- **Beyer-Sehlmeyer, G., Kreikemeyer, B., Hörster, A., Podbielski, A.** 2005. Analysis of the growth phase-associated transcriptome of *Streptococcus pyogenes*. *International Journal of Medical Microbiology.* 295(3):161-177.
- **Broudy, T.B., Pancholi, V., Fischetti, V.A.** 2002. The In Vitro Interaction of *Streptococcus pyogenes* with Human Pharyngeal Cells Induces a Phage-Encoded Extracellular DNase. *Society.* 70(6):2805-2811.
- **Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A., Bru, H.** 2003. Prophage Genomics. *Society.* 67(2):238-276
- **Carlos, A. R., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, T., Tenreiro, R.,** 2009. Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins. *Journal of Applied Microbiology* 108(5):1563-75.
- **Chaussee, M. A., Dmitriev, A.V., Callegari, E. A., Chaussee, M.S.** 2008. Growth phase-associated changes in the transcriptome and proteome of *Streptococcus pyogenes*. *Archives of microbiology.* 189(1):27-41.
- **Commons, R., Rogers, S., Gooding, T., Danchin, M., Carapetis, J., Robins-Browne, R., Curtis, N.** 2008. Superantigen genes in group A streptococcal isolates and their relationship with emm types. *Journal of Medical Microbiology.* 57(Pt 10):1238-46.
- **Creti, R., Imperi, M., Baldassarri, L., Pataracchia, M., Recchia, S., Alfaroni, G., Orefici, G.** 2007. emm Types, virulence factors, and antibiotic resistance of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Italy: What has changed in 11 years? *Journal of Clinical Microbiology.* 45(7):2249-56.
- **Cunningham, M.W.** 2008. Pathogenesis of group A streptococcal infections and their sequelae. *Advances in experimental medicine and biology.* 609(3):29-42.
- **Curran, T., Coulter, W. A., Fairley, D.J., McManus, T., Kidney, J., Larkin, M., Moore, J.E., Coyle, P. V.** 2010. Development of a novel DNA microarray to detect bacterial pathogens in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Journal of Microbiological Methods.*;80(3):257-61.
- **Efstratiou, A.** 2000. Group A streptococci in the 1990s. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 45 Suppl:3-12.
- **Frost, L, Leplae, R., Summer, A. e Toussaint, A.,** 2005. "Mobile genetic elements: the agents of open source evolution". *Nature microbiology*, Vol. 3. 722-727 e 730-731.
- **Garrity, G. M., Lilburn, T. G., Cole, J. R., Harrison, S. H., Euzéby, J. Tindall, B. J.** 2007. The Bacteria: Phylum Firmicutes: Class "Bacilli", in *Taxonomic Outline of the Bacteria and Archea (TOBA)*, Part 9.

- **Goshorn, S.C., Schlievert, P.M.** 1989. Bacteriophage association of streptococcal pyrogenic exotoxin type C. *Journal of bacteriology*. 171(6):3068-73.
- **Graham, M.R., Virtaneva, K., Porcella, S.F. Gardner, D. J., Long, R. D., Welty, D. M., Barry, W. T., Johnson, C. A., Parkins, L. D., Wright, F. A., Musser, J. M.** 2006. Analysis of the Transcriptome of Group A *Streptococcus* in Mouse Soft Tissue Infection. *American Journal Of Pathology*. 169(3):927-942.
- **Green, N.M., Beres, S.B., Graviss, E.A., Allison, J. E., Mcgeer, A. J., Vuopio-varkila, J., Lefebvre, R. B., Musser, J. M.** 2005. Genetic Diversity among Type emm28 Group A *Streptococcus* Strains Causing Invasive Infections and Pharyngitis. *Society*. 43(8):4083-4091.
- **Hyde, TB., Gay, K., Stephens DS, Vugia DJ, Pass M, Johnson S, Barrett NL, Schaffner W, Cieslak PR, Maupin PS, Zell ER, Jorgensen JH, Facklam RR.** Macrolide resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates. *JAMA*, 286: 1857-62, 2001.
- **Ikebe, T., Hirasawa, K., Suzuki, R., Ohya, H., Isobe, J., Tanaka, D., Katsukawa, C., Kawahara, R., Tomita, M., Ogata, K., Endoh, M., Okuno, R., Tada, Y., Okabe, N., Watanabe, H.** 2007. Distribution of emm genotypes among group A streptococcus isolates from patients with severe invasive streptococcal infections in Japan, 2001-2005. *Epidemiology and Infection*. 135(7):1227-9.
- **Kawamura, Y., X.-G. Hou, F. Sultana, H. Miura, and T. Ezaki.** 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.* 45:406–408.
- **Koonin, E.V. e Wolf, Y. I.** "Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world", *Nucleic Acids Research*. 19. 2008.
- **Lee, J.H., Uhl, J.R., Cockerill, F.R., Weaver, A.L., Orvidas, L.J.** 2008. Real-time PCR vs standard culture detection of group A beta-hemolytic streptococci at various anatomic sites in tonsillectomy patients. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 134(11):1177-81.
- **Lintges, M., Arlt, S., Uciechowski, P., Plümäkers, B., Reinert, R. R., Al-Lahham, A., Lütticken, R., Rink, L.** 2007. A new closed-tube multiplex real-time PCR to detect eleven superantigens of *Streptococcus pyogenes* identifies a strain without superantigen activity. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 297(6):471-8.
- **Luca-Harari B, Darenberg J, Neal S, Siljander, T., Strakova, L., Tanna, A., Creti, R., Ekelund, K., Koliou, M., Tassios, P. T., Van Der Linden, M., Straut, M., Vuopio-Varkila, J., Bouvet, A., Efstratiou, A., Schalén, C., Henriques-Normark, B., Jasir, A.** 2009. Clinical and microbiological characteristics of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *Journal of clinical microbiology*. 47(4):1155-65.
- **Maripuu, L., Eriksson, A., Norgren, M.** 2008. Superantigen gene profile diversity among clinical group A streptococcal isolates. *FEMS immunology and medical microbiology*. 54(2):236-44.
- **McMillan, D.J., Beiko, R.G., Geffers, R., Buer, J., Schouls, L. M., Vlamincx, B. J. M., Wannet, W. J. B., Sriprakash, K. S., Chhatwal, G. S.** 2006. Genes for the majority of group a streptococcal virulence factors and extracellular surface proteins do not confer an increased propensity to cause invasive disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 43(7):884-91.
- **Murray, P.R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenwer, F.C., Tenover, R. H.** 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. p. 299- 305. Sixth edition. ASM press. Washington, D.C.
- **Musser, J.M., Hauser, A. R., Kim, M.H., Schlievert, P. M., Nelson, K., Selander, R. K.** 1991. *Streptococcus pyogenes* causing toxic-shock-like syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88(7):2668-72.

- **Nagiec, M.J., Lei, B., Parker, S.K., Vasil, M. L., Matsumoto, M., Ireland, R. M., Beres, S. B., Hoe, N. P., Musser, J. M.** 2004. Analysis of a novel prophage-encoded group A *Streptococcus* extracellular phospholipase A(2). *The Journal of biological chemistry*. 279(44):45909-18.
- **Pires, R., Rolo, D., Gama-Norton L., Morais, A., Lito, L., Salgado, M.J., Johansson, C., Mollerberg, G., Henriques-Normark, B., Gonçalo-Marques, J e Santos-Sanches, I.** 2005. Group A streptococci from carriage and disease in Portugal: evolution of antimicrobial resistance and T antigenic types during 2000–2002. *Microb Drug Resist* 11: 360–370.
- **Pires, R., Rolo, D., Mato, R., Almeida, J. F., Johansson, C., Henriques-Normark, B., Morais, A., Brito-Avô, A., Gonçalo-Marques, J e Santos-Sanches, I.** 2009. Resistance to bacitracin in *Streptococcus pyogenes* from oropharyngeal colonization and noninvasive infections in Portugal was caused by two clones of distinct virulence genotypes. *FEMS Microbiol Lett* 296.:235-240.
- **Pitcher, D. G., N. A. Saunders, and R. J. Owen.** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters Applied Microbiology* 8:151–156.
- **Reda, K. B., Kapur V., Mollick J. A, Lamphear J. G., Musser J. M, Rich R.R.** 1994. Molecular Characterization and Phylogenetic Distribution of the Streptococcal Superantigen Gene (ssa) from *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* 62:1867-1874.
- **Rivera, A., Rebollo, M., Miró, E., Mateo, M., Navarro, F., Gurguí, M., Mirelis, B., Coll, P.** 2006. Superantigen gene profile, emm type and antibiotic resistance genes among group A streptococcal isolates from Barcelona, Spain. *Journal of medical microbiology*. 55(Pt 8):1115-23.
- **Rosey, A-L., Abachin, E., Quesnes, G., Cadilhac, C., Pejin, Z., Glorion, C., Berche, P., Ferroni, A.** 2007. Development of a broad-range 16S rDNA real-time PCR for the diagnosis of septic arthritis in children. *Journal of microbiological methods*. 68(1):88-93.
- **Schmitz, F. J., Beyer, A., Charpentier, E., Henriques-Normark, B., Schade, M., Fluit, C., Hafner, D., Novak, R.** Toxin-Gene Profile Heterogeneity among Endemic Invasive European Group A Streptococcal Isolates. *J. Infect .Dis.* 188:1578-1584.
- **Steer, A.C., Danchin, M.H., Carapetis, J.R.** 2007. Group A streptococcal infections in children. *Journal of paediatrics and child health*. 43(4):203-13.
- **Talay, S. R., Valentin-Weigand P., Timmis K. N., Chhatwal G. S.** 1994. Domain Structure and Conserved Epitopes of Sfb Protein, the Fibronectin-Binding Adhesion of *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.*13: 531-539.
- **Tinsley, C., Bille, E. e Nassif, X.** “Bacteriophages and pathogenicity: more than just providing a toxin?”, *Microbes and Infection*, 8:1366-1267. 2006.
- **Tyler, S.D., Johnson, W.M., Huang, J.C., Ashton, F. E., Wang, G., Low, D. E., Rozee, K. R.** 1992. Streptococcal erythrogenic toxin genes: detection by polymerase chain reaction and association with disease in strains isolated in Canada from 1940 to 1991. *Journal of clinical microbiology*. 30(12):3127-31.
- **Virulence Factors of Pathogenic Bacteria. [online].** <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Streptococcus>. Acesso a 20 de Setembro de 2010.
- **Zar, J. H.** 1996. *Biostatistical analysis*. 3rd edition. Prentice-Hall International Editions. London, United Kingdom.

6. Anexos

Tabela 1 – Descrição dos isolados utilizados no trabalho experimental relativamente a origem, perfis de PFGE e registo dos resultados obtidos para a pesquisa de genes de virulência.

Isolados	Origem	Adultos/ Crianças	Idade	Sma I	emm-type	prrF1	spd1	slaA	speA	speC	speH	spel	speJ	speK	speL	speM	ssa
GAP 1	Colonização	Adulto		C	emm 87.0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
GAP 3	Colonização	Criança	4	A	emm 22.0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
GAP 5	Colonização	Adulto	21	A	emm 22.0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1
GAP 6	Colonização	Criança	2	CZ	emm stMrp6.0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
GAP 8	Colonização	Criança	4	CX	emm 1.0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
GAP 9	Colonização	Criança	4	CX	emm 1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
GAP 17	Colonização	Criança		C	emm 87.0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
GAP 21	Colonização	Criança	2	DQ	emm 1.0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 23	Colonização	Criança		O	emm 9.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 25	Colonização	Criança		D	emm 53.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 27	Colonização	Criança		D	emm 53.2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
GAP 30	Colonização	Criança	7	F	emm 28.0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
GAP 36	Faringite/Amigdalite	Criança	4	A		1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
GAP 37	Faringite/Amigdalite	Criança	4	B	emm 22	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
GAP 38	Faringite/Amigdalite	Criança	9	B	emm 22	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
GAP 39	Faringite/Amigdalite	Adulto	19	A	emm 22.0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
GAP 40	Faringite/Amigdalite	Criança	4	CX		0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
GAP 41	Infeção de Pele/Tecidos moles	Criança	9	B	emm 22.3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
GAP 50	Infeção de Pele/Tecidos moles	Adulto	69	C	emm 87.0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
GAP 51	Infeção de Pele/Tecidos moles	Criança	1	B	emm 22	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
GAP 53	Infeção de Pele/Tecidos moles	Adulto	30	D	emm 53.10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 55	Doença Invasiva	Adulto	66	D	emm 53.2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 57	Infeção de Pele/Tecidos moles	Criança	4	D		0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
GAP 59	Infeção de Pele/Tecidos moles	Criança	14	C	emm 53.2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
GAP 63b	Colonização	Criança	4	AK	emm 28.0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
GAP 65	Colonização	Adulto	30	AP	emm 12.0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0
GAP 66	Colonização	Criança		AO	emm 4.0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
GAP 75	Colonização	Criança		X	emm 1.0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
GAP 78	Faringite/Amigdalite	Criança	5	AP	emm 12	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
GAP 80	Faringite/Amigdalite	Criança	8	C	emm 87.0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
GAP 81	Faringite/Amigdalite	Criança	20 meses	DA		1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
GAP 83	Faringite/Amigdalite	Adulto	28	CX		0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0
GAP 88	Faringite/Amigdalite	Adulto	33	DQ	emm 1.0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
GAP 90	Faringite/Amigdalite	Criança	6	F		1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
GAP 91	Faringite/Amigdalite	Criança	5	Q	emm 28.0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0
GAP 102	Doença Invasiva	Adulto	76	AL	emm 9.0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
GAP 103	Doença Invasiva	Criança	2	T	emm 58.0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0

Isolados	Origem	Adultos/ Crianças	Idade	Sma I	emm0type	prtF1	spd1	slaA	speA	speC	speH	spel	speJ	speK	speL	speM	ssa
GAP 105	Infecção de Pele/Tecidos moles	Adulto	67	AM	emm 6.0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
GAP 106	Doença Invasiva	Adulto	49	AJ	emm 3.1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
GAP 111	Doença Invasiva	Criança	6 meses	X	emm 1.0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
GAP 112	Infecção de Pele/Tecidos moles	Adulto	71	AB	emm 12	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0
GAP 113	Infecção de Pele/Tecidos moles	Adulto	39	AC	emm 28.0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
GAP 115	Infecção de Pele/Tecidos moles	Adulto	21	AD	emm 6	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
GAP 116	Infecção de Pele/Tecidos moles	Criança	1	AE		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
GAP 117	Doença Invasiva	Adulto	23	T	emm 88.2	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GAP 119	Doença Invasiva	Adulto	77	AD	emm 6.0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GAP 120	Doença Invasiva	Adulto	78	AC	emm 28.0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
GAP 121	Infecção de Pele/Tecidos moles		NT	BG		0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
GAP 123	Doença Invasiva	Criança	1	DA	emm 75.0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
GAP 124	Doença Invasiva	Adulto	30	AI	emm 102.3	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GAP 125	Infecção de Pele/Tecidos moles	Adulto	55	F	emm 28.1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GAP 126	Doença Invasiva	Adulto	66	X	emm 1.0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
GAP 128	Infecção de Pele/Tecidos moles		NT	AE	emm 104.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
GAP 129	Faringite/Amigdalite	Adulto		AI		1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GAP 131	Faringite/Amigdalite	Adulto		AG		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
GAP 132	Faringite/Amigdalite	Adulto		AG		0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
GAP 133	Faringite/Amigdalite	Adulto		X		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
GAP 134	Faringite/Amigdalite	Adulto		AB		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
GAP 135	Faringite/Amigdalite	Adulto		AE		1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
GAP 136	Faringite/Amigdalite	Criança		T		0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
GAP 137	Faringite/Amigdalite	Criança		AO		1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GAP 139	Faringite/Amigdalite	Criança		AH		1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GAP 140	Faringite/Amigdalite	Criança		AP	emm 94	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
GAP 141	Faringite/Amigdalite	Criança		AD	emm 6	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
GAP 152	Colonização	Criança	5	CY	emm 75.0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
GAP 153	Colonização	Criança	5	DN	emm 75.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
GAP 161	Colonização	Criança	4	B	emm 22.0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
GAP 162	Colonização	Criança	5	AU	emm 22.0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
GAP 165	Faringite/Amigdalite	Criança	4	CY		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
GAP 174	Faringite/Amigdalite	Criança	4	CY	emm 75	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
GAP 180	Colonização	Criança	12	DN	emm 75.0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
GAP 181	Colonização	Criança	14	CY	emm 75.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
GAP 191	Colonização	Criança	7	DI	emm 75.0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
GAP 192	Colonização	Criança	6	F	emm 28.0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
GAP 212	Faringite/Amigdalite	Criança	9	X	emm 1.0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
GAP 245	Faringite/Amigdalite	Criança	7	AJ	emm 3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
GAP 248	Faringite/Amigdalite	Criança	3	AB	emm 12.0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 264	Faringite/Amigdalite	Criança	2	BQ	emm 89.0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
GAP 268	Infecção de Pele/Tecidos moles	nd	nd	CX		0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0
GAP 274	Colonização	Criança	5	DH	emm 4.0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
GAP 275	Colonização	Criança	4	DH	emm 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
GAP 277	Colonização	Criança	4	DL	emm 4.0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
GAP 279	Colonização	Criança	1	CZ	emm 4.0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1
GAP 290	Colonização	Criança	2	B	emm 22.0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
GAP 306	Faringite/Amigdalite	Criança	4	DL	emm 4.0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1

Isolados	Origem	Adultoos/ Crianças	Idade	Sma I	emm0type	prtF1	spd1	slaA	speA	speC	speH	spel	speJ	speK	speL	speM	ssa
GAP 308	Faringite/Amigdalite	Criança	5	CZ	emm 4	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1
GAP 312	Faringite/Amigdalite	nd	nd	BO		1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
GAP 314	Faringite/Amigdalite	nd	nd	DI	emm 75.0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
GAP 317	Faringite/Amigdalite	Criança	4	AC	emm 28.0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
GAP 319	Infecção de Pele/Tecidos moles	Criança	2	CP	emm 4.0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
GAP 340	Colonização	Criança		AB	emm 12.0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
GAP 350	Colonização	Adulto		AP	emm 94.0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
GAP 370	Colonização	Criança		BG	emm 3.2	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1
GAP 372	Colonização	Adulto		BG	emm st3720.0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
GAP 377	Colonização	Criança		BG		0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
GAP 402	Colonização	Criança		BK	emm 12.0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
GAP 403	Colonização	Criança		BK	emm 12	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
GAP 416	Infecção de Pele/Tecidos moles		NT	BG	emm 3.2	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
GAP 423	Infecção de Pele/Tecidos moles	nd	nd	DA		1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
GAP 426	Infecção de Pele/Tecidos moles		NT	T	emm 58.0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
GAP 429	Faringite/Amigdalite	nd	nd	DL	emm 4.0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
GAP 437	Infecção de Pele/Tecidos moles	nd	nd	F		0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
GAP 445	Infecção de Pele/Tecidos moles	nd	nd	CZ	emm 4.0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
GAP 447	Infecção de Pele/Tecidos moles		NT	BR	emm 74.0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
GAP 448	Infecção de Pele/Tecidos moles		NT	BR		0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GAP 449	Faringite/Amigdalite		NT	BR		0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0
GAP 450	Faringite/Amigdalite	nd	nd	DH	emm 4.0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
GAP 455	Faringite/Amigdalite		NT	BR		0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
GAP 468	Faringite/Amigdalite	Criança	6	BO	emm 11.0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
GAP 475	Faringite/Amigdalite	Criança	4	DI	emm 75.0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
GAP 478	Colonização	Criança	5	DL	emm 4.0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
GAP 483	Colonização	Criança	4	CZ	emm 4.0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1
GAP 504	Colonização	Criança	6	BP	emm 12.0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0
GAP 511	Colonização	Criança	12	BQ	emm 44.0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
GAP 512	Colonização	Criança	2	BO	emm 11.0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
GAP 514	Colonização	Criança	1	BO	emm 11.0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
GAP 540	Colonização	Criança		AD	emm 6.0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
GAP 548	Faringite/Amigdalite	Criança	6	CG	emm 9.0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
GAP 549	Faringite/Amigdalite	Criança	5	CH	emm 9.0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
GAP 550	Faringite/Amigdalite	Criança	8	CG		0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
GAP 561	Faringite/Amigdalite	Criança	6	CK		0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
GAP 569	Faringite/Amigdalite	Criança	2	CK		0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
GAP 575	Faringite/Amigdalite	Adulto	25	F	emm 28.0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
GAP 578	Faringite/Amigdalite	Criança	3	CN		1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
GAP 581	Faringite/Amigdalite	Criança	4	CZ	emm 4.0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
GAP 582	Faringite/Amigdalite	Adulto	27	BC	emm 77.0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
GAP 585	Faringite/Amigdalite	Criança	4	BK		1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
GAP 589	Faringite/Amigdalite	Criança	4	O		0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
GAP 590	Faringite/Amigdalite	Criança	11	CP		0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
GAP 591	Faringite/Amigdalite	Adulto	40	BC		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
GAP 605	Faringite/Amigdalite	Criança	6	AL		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 607	Faringite/Amigdalite	Criança	7	BP	emm 12.0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
GAP 652	Colonização	Criança		AJ	emm 3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Isolados	Origem	Adultoos/ Crianças	Idade	Sma I	emm0type	prtF1	spd1	slaA	speA	speC	speH	spel	speJ	speK	speL	speM	ssa
GAP 653	Colonização	Criança		AJ	emm 3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
GAP 679	Colonização	Criança		AD	emm 1.0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
GAP 704	Colonização	Criança		AD	emm 89.0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
GAP 711	Colonização	Criança		BJ	emm 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
GAP 714	Colonização	Criança		DY	emm 6.0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
GAP 715	Colonização	Criança		DY	emm 6.0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
GAP 721	Colonização	Criança		CK	emm 2.0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
GAP 723	Colonização	Criança		AM	emm 6	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
GAP 724	Colonização	Criança		AG	emm 29.2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
GAP 726	Colonização	Adulto		BJ		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
GAP 730	Colonização	Criança		AL	emm 9.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
GAP 737	Faringite/Amigdalite	Adulto	34	BJ	emm 2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 738	Faringite/Amigdalite	Criança	3	AO	emm 4.0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 760	Faringite/Amigdalite	Adulto	36	AD	emm 1.0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
GAP 766	Faringite/Amigdalite	Criança	3	AU	emm 9.0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 798	Faringite/Amigdalite	Criança	5	CP	emm 4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
GAP 800	Faringite/Amigdalite	Criança	5	AK		1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
GAP 801	Faringite/Amigdalite	Criança	7	AK		0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
GAP 802	Faringite/Amigdalite	Criança	2	AJ	emm 1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
GAP 807	Faringite/Amigdalite	nd	nd	BP		0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
GAP 808	Faringite/Amigdalite	nd	nd	BP	emm 75.0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0
GAP 814	Faringite/Amigdalite	nd	nd	AC	emm 28	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 818	Infeção de Pele/Tecidos moles		NT	DY	emm 6.0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
GAP 819	Infeção de Pele/Tecidos moles		NT	DY	emm 6.0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
GAP 821	Infeção de Pele/Tecidos moles		NT	AD	emm 1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
GAP 822	Doença Invasiva	nd	nd	DN		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
GAP 823	Infeção de Pele/Tecidos moles	nd	nd	CZ	emm 4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
GAP 826	Infeção de Pele/Tecidos moles	nd	nd	CX	emm 1.0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 827	Faringite/Amigdalite	Criança	3	CH	emm 4.0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
GAP 829	Faringite/Amigdalite	Criança	4	CH	emm 44.0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
GAP 835	Faringite/Amigdalite	Criança	4	CP	emm 4.0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
GAP 839	Faringite/Amigdalite			BE	emm 44.0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
GAP 841	Faringite/Amigdalite			BE	emm 44.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 845	Infeção de Pele/Tecidos moles			X	emm 1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 847	Infeção de Pele/Tecidos moles			AH	emm 58.0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
GAP 849	Infeção de Pele/Tecidos moles			X	emm 1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 851	Faringite/Amigdalite			AU	emm 9.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
GAP 853	Colonização			X		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
GAP 854	Colonização			X	emm 1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
GAP 868	Colonização			AK		1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
GAP 906	Colonização			AB		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
GAP 1005	Colonização			AC		1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1006	Colonização			AC		1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
GAP 1019	Colonização			BC		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1022	Colonização			T	emm 58	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
GAP 1029	Colonização			T		1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1049	Colonização			CN	emm 89	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1057	Colonização			AO		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Isolados	Origem	Adultoos/ Crianças	Idade	Sma I	emm0type	prtF1	spd1	slaA	speA	speC	speH	spel	speJ	speK	speL	speM	ssa
GAP 1074	Colonização			CG	emm 9.0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
GAP 1075	Colonização			AO	emm 4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
GAP 1082	Colonização			BE	emm 89.0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1084	Colonização			AO	emm 89	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1087	Colonização			BE		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1088	Colonização			AB	emm 11.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1089	Colonização			AO	emm 12.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1091	Colonização			BJ	emm 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1093	Colonização			CK	emm 4.0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
GAP 1094	Colonização			AB	emm 4.0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1095	Colonização			BE	emm 4.0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
GAP 1097	Colonização			AD	emm 4.0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
GAP 1098	Colonização			AD	emm 12.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1100	Colonização			AO	emm 3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
GAP 1106	Colonização			AO	emm 2.0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
GAP 1131	Colonização			CK		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
GAP 1136	Colonização			CH	emm 44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
GAP 1137	Colonização			CN	emm 89	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1141	Colonização			BC	emm 77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1149	Colonização			AL	emm 9.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
GAP 1159	Colonização			AG	emm 91.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
GAP 1161	Colonização			AK	emm 88	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
GAP 1194	Colonização			BG	emm 48.1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
GAP 1195	Colonização			X	emm 89	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAP 1204	Colonização			Q	emm 28	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
GAP 1238	Colonização			X	emm 12.49	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
GAP 1242	Colonização			AO	emm 1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Legenda: O número 1 corresponde à presença e o 0 à ausência do gene de virulência. As linhas sombreadas indicam os 20 isolados seleccionados para o estudo da expressão génica.