

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



***STREPTOCOCCUS PYOGENES* COMO AGENTE
DE INFECÇÃO DA PELE E TECIDOS MOLES**

Catarina Teresa Condinho Pato

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



***STREPTOCOCCUS PYOGENES* COMO AGENTE
DE INFEÇÃO DA PELE E TECIDOS MOLES**

Dissertação orientada por Professor Doutor Mário Ramirez
e Professora Doutora Manuela Carolino

Catarina Teresa Condinho Pato

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011



***STREPTOCOCCUS PYOGENES* COMO AGENTE
DE INFEÇÃO DA PELE E TECIDOS MOLES**

Catarina Teresa Condinho Pato

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011

Esta tese foi realizada na Unidade de Microbiologia Molecular e Infecção do Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (IMM-FML) sob a orientação directa do Professor Doutor Mário Ramirez. A Professora Doutora Manuela Carolino foi a orientador interna designada no âmbito do *Mestrado em Microbiologia Aplicada* da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Mário Ramirez, o meu orientador neste trabalho, agradeço toda a sua disponibilidade para orientar esta dissertação, pelos conhecimentos transmitidos e pela confiança em mim depositada.

Ao Professor Doutor José Melo-Cristino, Director do Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Lisboa, agradeço a oportunidade de me ter integrado na sua equipa de laboratório.

À Professora Doutora Manuela Carolino, a minha orientadora interna, pela disponibilidade e pela revisão final do trabalho.

A todos os meus colegas do Instituto de Microbiologia, nomeadamente à Ana Friães e à Catarina Costa, pela orientação em laboratório e pelo esclarecimento de todas as dúvidas.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo.

RESUMO

Em Portugal, os estudos epidemiológicos em *Streptococcus pyogenes* englobam sobretudo estirpes responsáveis por infecções do aparelho respiratório superior e por infecções invasivas. No entanto, não há registo de estudos focados em estirpes de *S. pyogenes* recolhidas de infecções de pele e tecidos moles. Este estudo baseou-se na caracterização de 320 estirpes recolhidas em vários hospitais do país, durante o período de 2003 a 2009, a partir de amostras de pus de lesões cutâneas, como feridas e abscessos. A caracterização das estirpes foi efectuada por diferentes métodos de tipagem, nomeadamente serotipagem T, tipagem *emm*, determinação dos perfis de toxinas e determinação dos perfis de macro-restricção obtidos por electroforese em campo pulsado (PFGE). Em todos os métodos utilizados verificou-se uma elevada diversidade da população (índice de diversidade de Simpson ≥ 0.86). As estirpes do tipo *emm89* (n=62) foram as mais frequentes, seguidas por estirpes do tipo *emm1* (n=55). Quando consideradas em conjunto, estas estirpes correspondem a 36,6% da população total e constituem os dois principais grupos definidos por comparação dos perfis de PFGE. Assim como estes, verificou-se que a maioria dos grupos definidos por PFGE são principalmente constituídos por estirpes do mesmo tipo *emm*. Relativamente aos perfis de toxinas, observou-se que estirpes com o mesmo tipo *emm*, normalmente, apresentam um perfil igual ou semelhante. Também se determinou a resistência a alguns antimicrobianos de interesse clínico ou epidemiológico e os respectivos génotipos. No total, observou-se uma resistência aos macrólidos de 10,3%, com uma dominância de estirpes de fenótipo cMLS_b em relação ao fenótipo M. A resistência à tetraciclina foi observada em 47 estirpes, das quais 12 eram também resistentes aos macrólidos. Tendo em conta os diferentes tipos *emm* detectados e o número de estirpes correspondentes, a implementação da vacina experimental 26-valente em todas as faixas etárias poderia prevenir 67,8% das infecções de pele e tecidos moles em Portugal.

Palavras-chave: *Streptococcus pyogenes*; infecções da pele e tecidos moles; métodos de tipagem; antimicrobianos; vacinas.

ABSTRACT

In Portugal, epidemiological studies of *Streptococcus pyogenes* concentrate mostly on isolates recovered from pharyngitis and invasive infections. However, there is no record of studies focused on *S. pyogenes* isolates recovered from skin and soft tissue infections. This work aimed to characterize 320 isolates recovered in several hospitals across the country, from skin lesions, like wounds and abscesses. The typing methods used were T typing, *emm* typing, exotoxin profiling and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) profiling. In all of these, a very diverse population was detected (Simpson's index of diversity ≥ 0.86). The most prevalent *emm* type was *emm89* (n=62) followed by *emm1* (n=55). Together, isolates of these *emm* types accounted 36.6% of the population and composed the two major clusters defined by comparison of PFGE profiles. Like these clusters, the majority of clusters are composed mostly of isolates with the same *emm* type. Toxin profiling revealed that isolates with the same *emm* type, usually share the same or a similar toxin profile. We also determined the resistance to a panel of antibiotics of clinical and epidemiological interest, as well as the associated resistance genotypes. Erythromycin resistance was observed in 33 isolates (10%), of which 11 presented the M phenotype, while 22 were constitutively resistant to clindamycin (cMLS_B phenotype). Tetracycline resistance was detected in 47 isolates (14.7%), of which 12 were also resistance to erythromycin. According to the different *emm* types detected, the implementation in all age groups of the experimental 26-valent M protein-based vaccine could prevent 67.8% of skin and soft tissue infections in Portugal.

Key-words: *Streptococcus pyogenes*; skin and soft tissue infections; typing methods; antibiotics; vaccines.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Descrição do agente etiológico e da doença	1
1.2. Identificação de <i>S.pyogenes</i> e condições de cultura.....	2
1.3. Tipagem epidemiológica	2
1.3.1. Serotipagem T	3
1.3.2. Tipagem <i>emm</i>	3
1.3.3. Perfil de toxinas.....	4
1.3.4. Electroforese em campo pulsado.....	5
1.4. Susceptibilidade a antimicrobianos e respectivos genótipos de resistência	5
1.5. Vacinas	6
1.6. Objectivos.....	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS	8
2.1. Informação das estirpes	8
2.2. Serotipagem T	8
2.3. Tipagem <i>emm</i>	8
2.3.1. Amplificação	8
2.3.2. Digestão do produto de PCR.	9
2.3.3. Extracção de DNA.....	10
2.4. Determinação do perfil de toxinas.....	11
2.5. Efectroforese em campo pulsado	12
2.5.1. Extracção e imobilização do DNA bacteriano	12
2.5.2. Digestão.....	12
2.5.3. Separação	13
2.5.4. Análise dos perfis genómicos.....	13
2.6. Hibridação “Southern blot”	13
2.7. Determinação da susceptibilidade a antimicrobianos	15
2.8. Detecção dos genes de resistência aos macrólidos	16
2.9. Detecção dos genes de resistência à tetraciclina.....	16
2.10. Análise estatística.....	17
3. RESULTADOS	18
3.1. Idade e sexo dos indivíduos de onde foram recolhidas as estirpes.....	18
3.2. Tipagem <i>emm</i>	18

3.2.1. Prevalência de estirpes dos tipos <i>emm1</i> e <i>emm89</i>	19
3.2.2. Tipo <i>emm</i> vs idade dos indivíduos de onde foram recolhidas as estirpes.....	19
3.3. Serotipagem T	20
3.4. Perfis de toxinas estreptocócicas	20
3.5. Resistência a antimicrobianos e respectivos génotipos associados.	21
3.6. Electroforese em campo pulsado.....	23
3.7. Comparação dos métodos de tipagem.	25
4. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	35
5. REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

1.1. Descrição do agente etiológico e da doença

As bactérias da espécie *Streptococcus pyogenes* também designadas por estreptococos do grupo A (GAS) são agentes patogénicos de carácter Gram positivo que infectam exclusivamente o ser humano (Cunningham *et al.*, 2000). São os principais agentes bacterianos responsáveis por faringo-amigdalites de crianças em idade escolar, sendo estimado que ocorram globalmente mais de 600 milhões de casos por ano (Carapetis *et al.*, 2005). São também por ano, responsáveis por mais de 111 milhões de casos de infecções da pele e tecidos moles como impétigo, pioderma gangrenoso, erisipela e escarlatina (Carapetis *et al.*, 2005; Cunningham *et al.*, 2000). No entanto, a maior morbidade e mortalidade resulta das infecções invasivas e das sequelas auto-imunes. Entre as infecções invasivas estão a celulite, a miosite e a fascíte necrozante, estando esta última frequentemente associada a bacteriémia e síndrome de choque tóxico estreptocócico (STSS) (Cunningham *et al.*, 2000). Estima-se que ocorram anualmente entre 8950-11500 casos de infecção invasiva nos Estados Unidos da América que resultam em cerca de 1300 mortes (O'Loughlin *et al.*, 2007). Na Europa, a taxa de infecções invasivas por GAS durante o período 2003-2004 foi de 3 em cada 100 mil habitantes (Lamagni *et al.*, 2008).

As sequelas mais comuns são a febre reumática e a glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica (Cunningham *et al.*, 2000). A febre reumática é uma sequela das faringo-amigdalites por GAS que se desenvolve quando estas não são devidamente tratadas. Trata-se de uma doença auto-imune que resulta do mimetismo molecular entre a proteína M e vários constituintes dos tecidos humanos. Este mecanismo resulta da activação não específica das células T com proliferação das células T auto-reativas e do facto dos anticorpos dirigidos à proteína M da superfície bacteriana reconhecerem também a miosina, tropomiosina, queratina e N-acetilglucosamina que constituem as válvulas cardíacas e membranas sinoviais (Dale *et al.*, 1986). Embora se verifique um decréscimo na incidência de febre reumática nos países desenvolvidos, esta é a maior causa de mortalidade associada a doenças cardiovasculares em países em desenvolvimento. A Organização Mundial de Saúde estima que 12 milhões de pessoas sofram desta sequela, das quais 400000 morrem todos os anos (WHO report, 1992). Relativamente à glomerulonefrite aguda, não se sabe exactamente o mecanismo pelo qual a doença é despoletada, porém, assim como se verifica para a febre reumática, já foram descritas semelhanças entre os constituintes do rim e da superfície bacteriana de GAS (Bisno *et al.*, 2003).

1.2. Identificação de *S.pyogenes* e condições de cultura.

Em laboratório, o crescimento de *S. pyogenes* é óptimo em meios de gelose enriquecidos com sangue. Após 24 horas de incubação a 37°C, podem observar-se colónias brancas de 1-2mm com grandes halos de β -hemólise (hemólise total dos eritrócitos presentes no meio). A identificação presuntiva faz-se utilizando a classificação de Lancefield, que permite a diferenciação entre espécies de estreptococos β -hemolíticos. Este método baseia-se nas diferenças imunológicas dos polissacarídeos da parede celular (grupo A, B, C, F e G) ou nos ácidos lipoteicoicos (Grupo D) (Murray, 2005). A maioria dos estreptococos isolados de infecções humanas que aglutinam com o soro A da classificação de Lancefield correspondem à espécie *S. pyogenes*. Sendo por este motivo que se designam estes cocos como estreptococos do grupo A. Porém, raramente, algumas estirpes de *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* e *Streptococcus anginosus* recolhidas de humanos podem também apresentar o carboidrato A (Facklam, 2002). Nestes casos, se não se recorrer a outros métodos, a estirpe pode ser incorrectamente identificada.

A determinação da susceptibilidade à bacitracina é também frequentemente utilizada como teste para distinguir estirpes de *S. pyogenes* de outros estreptococos β -hemolíticos (Maxted, 1953). A maioria das estirpes de *S.pyogenes* são susceptíveis a este antimicrobiano, no entanto, já foram descritas estirpes resistentes (Silva-costa *et al.*, 2006). Por esta razão, este método deve também ser complementado com outros.

1.3. Tipagem epidemiológica

Os surtos de doenças infecciosas, incluindo as provocadas por GAS, resultam normalmente da exposição a uma fonte comum do agente etiológico. Epidemiologicamente, os organismos envolvidos num surto são relacionados devido a uma origem comum, partilhando factores de virulência, propriedades bioquímicas e características genóticas. Porém, quando recolhidos de diferentes produtos, em diferentes períodos e locais podem ser diferenciados através de vários métodos de tipagem.

Os métodos de tipagem regularmente utilizados podem basear-se em características fenotípicas ou moleculares. Os métodos fenotípicos tendem a ser mais simples, mais baratos e mais rápidos. Embora sejam vantajosos para a rápida identificação de estirpes responsáveis por surtos, não são os mais apropriados para estudos filogenéticos devido ao seu insuficiente poder discriminatório. Por exemplo, genes que codificam proteínas da superfície bacteriana têm tendência a evoluir rapidamente devido a uma maior pressão selectiva. Este fenómeno pode levar a que estirpes com um ancestral comum não sejam identificadas como tal ou então

que estirpes que não possuem um ancestral comum, devido a fenômenos de transferência horizontal, possam ser consideradas proximamente relacionadas (Feil *et al.*, 2004).

Os métodos moleculares ao contrário dos fenotípicos fornecem informação sobre a relação entre estirpes o que permite determinar os focos de infecção, detectar fenômenos de infecção cruzada, compreender a evolução das populações microbianas, permitir acompanhar a disseminação geográfica e temporal de clones de estirpes com determinadas características e monitorizar e avaliar programas de vacinação (Olive *et al.*, 1999).

Neste estudo, o método fenotípico utilizado foi a serotipagem T. A nível molecular recorreu-se à tipagem *emm*, à determinação do perfil de toxinas e ainda à determinação dos perfis de macro-restrição pelo método de electroforese em campo pulsado (PFGE).

1.3.1. Serotipagem T

A serotipagem T é uma classificação serológica desenvolvida por Lancefield há mais de 50 anos (Lancefield *et al.*, 1946). Esta técnica baseia-se nas diferenças estruturais de uma proteína presente na superfície bacteriana que por ser resistente à tripsina foi designada de proteína T. Apesar de não existirem soros suficientes para detectar todas as variedades existentes da proteína T, este método continua a ser frequentemente utilizado.

Recentemente verificou-se que este antigénio é um dos constituintes dos pili em *S. pyogenes* (Mora *et al.*, 2005). Pensa-se que os pili em *S. pyogenes* sejam importantes estruturas no estabelecimento de infecção, nomeadamente no processo de adesão às células que revestem o epitélio respiratório da faringe e na capacidade de formação de biofilmes (Manetti *et al.*, 2007).

1.3.2. Tipagem *emm*

O método de tipagem *emm* consiste na determinação da sequência de DNA do gene *emm* que codifica a região N-terminal da proteína M. A proteína M localiza-se superfície celular e é considerada um dos principais factores de virulência em *S. pyogenes* principalmente devido à sua capacidade anti-fagocítica (Bisno *et al.*, 1979). Esta proteína é composta por duas cadeias polipéptidicas ancoradas na membrana celular, que atravessam a parede celular e aparecem com fibrilhas na superfície celular. As cadeias contêm blocos (A-D), que diferem no tamanho e na sequência de aminoácidos (Figura 1). A extremidade C-terminal da

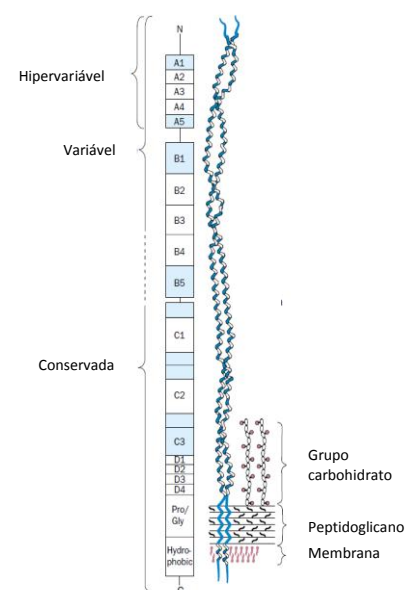


Figura 1. Proteína M6
Adaptado de Bisno *et al.*, (2003)

molécula localizada no interior da parede e membrana celular é altamente conservada entre diferentes estirpes de GAS. A porção N-terminal que se estende para o exterior, acaba em 11 aminoácidos que variam consoante as estirpes. Esta área, acompanhada do segmento adjacente da região A constitui a região hipervariável desta proteína (Bisno *et al.*, 2003). Foi com base nas diferenças desta região entre estirpes que Lancefield desenvolveu um sistema de classificação serológica com o objectivo de distinguir estirpes de GAS (Lancefield, 1927). Contudo, esta técnica, tem algumas desvantagens, tal como a difícil preparação e manutenção dos soros e a detecção de um número cada vez maior de estirpes não tipáveis. Devido a estas limitações e com o avanço tecnológico começou-se a recorrer à amplificação e sequenciação da região hipervariável por PCR. A sequência obtida é comparada com outras da base de dados do "Centers for Disease Control and Prevention" (<http://www.cdc.gov/ncidod/bioyech/strep/strepblast.htm>). Quando existe um elevado nível de semelhança ($\geq 95\%$) com a extremidade 5' de uma sequência conhecida, atribui-se à sequência o mesmo tipo *emm*.

1.3.3. Perfil de toxinas

Entre os factores de virulência de *S. pyogenes* estão também as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (proteínas Spe) frequentemente associadas ao choque tóxico estreptocócico (STSS). Estas exotoxinas funcionam como superantígenos (SAg) pois apresentam a capacidade de se ligarem simultaneamente ao complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II) e aos receptores das células T (TCR) (Figura 2). A ligação leva à activação das células T independentemente da presença de antígeno, o que resulta numa secreção maciça de citocinas inflamatórias como o interferão- γ , interleucina-1 e factor de necrose tumoral α . A libertação descontrolada destes moduladores pode levar à activação do complemento, das cascatas de coagulação e fibrinolíticas, que resulta em hipotensão e falência de vários órgãos, como se verifica em casos de STSS (Bisno *et al.*, 2003).

No total já foram descritos em GAS, 11 superantígenos: SpeA, SpeC, SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL, SpeM, superantígeno estreptocócico A (Ssa) e a exotoxina estreptocócica mitogénica Z (SmeZ). As proteínas SpeB e SpeF, apesar de inicialmente descritas como

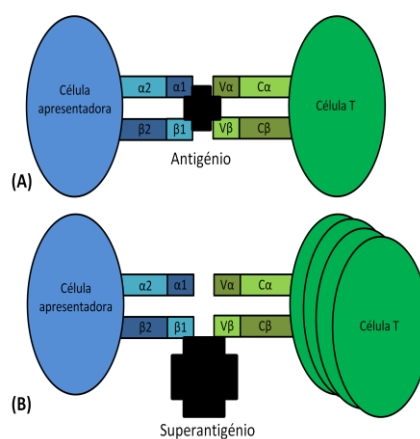


Figura 2. Interação entre o MHC classe II do hospedeiro das células apresentadoras de antígenos com os receptores das células T. (A) Na apresentação do antígeno após o processamento convencional. (B) Na presença de superantígenos. Adaptado de Sriskandan *et al.* (2006).

exotoxinas devido a uma contaminação com SmeZ, são de facto uma protease e uma desoxirribonuclease, respectivamente (Gerlach *et al.*, 2001; Kapur *et al.*, 1993).

A maioria dos genes que codificam superantigénios estão associados a bacteriófagos, com excepção dos genes *speG*, *speJ* e *smeZ*. Consideram-se estes últimos genes como cromossomais, devido à sua presença em todas as estirpes analisadas em alguns estudos (Proft *et al.*, 2000; Proft *et al.*, 2003) e à sequenciação do genoma de uma estirpe M1 (SF370), em que não se detectou nenhuma associação destes genes com elementos móveis (Ferreti *et al.*, 2001).

1.3.4. Electroforese em campo pulsado

A técnica de PFGE é um método de tipagem molecular que consiste na digestão do DNA total imobilizado em discos de agarose. A digestão é feita com uma endonuclease que fragmenta o DNA em locais de ocorrência pouco frequente. Os fragmentos, quando separados em geles de agarose por electroforese em campo pulsado, originam perfis específicos que através de um software adequado podem ser comparados e relacionados com elevada reprodutibilidade (Silva-Costa *et al.*, 2008). Este método tem sido amplamente utilizado na tipagem de GAS devido à capacidade de distinguir estirpes com o mesmo tipo *emm* (Carriço *et al.*, 2006).

1.4. Susceptibilidade a antimicrobianos e respectivos genótipos de resistência

Os antimicrobianos são a opção mais utilizada no tratamento de infecções bacterianas. Desde o início da sua utilização que têm sido descritos casos de resistência e disseminação dos vários mecanismos associados. Tendo em conta que a escolha do antibiótico pode ser decisiva no curso da infecção, é essencial existir um controlo regular dos níveis de resistência para que a terapêutica empírica adoptada seja a mais adequada.

No caso de faringo-amigdalites causadas por GAS, o antibiótico mais utilizado na terapêutica continua a ser a penicilina. Porém, devido a alergias ou à facilidade de administração, os macrólidos e as lincosamidas são importantes escolhas alternativas. Em casos de infecções graves da pele e tecidos moles recorre-se à clindamicina (lincosamida) em associação com os β -lactâmicos para inibir a produção de exotoxinas (Allen *et al.*, 2010). Quando se detectam estirpes resistentes aos macrólidos e às lincosamidas, as fluoroquinolonas são uma alternativa possível (Malhotra *et al.*, 2009).

A azitromicina é o macrólido mais utilizado na terapêutica de infecções por GAS. Em laboratório utiliza-se a eritromicina para determinar a susceptibilidade aos macrólidos. Esta classe de antimicrobianos inibe a síntese proteica por ligação reversível ao RNA ribossomal 23S

da subunidade 50S dos ribossomas de organismos susceptíveis, o que resulta no bloqueio da reacção de translocação durante o alongamento da cadeia polipeptídica (Roberts *et al.*, 1999).

Os mecanismos de resistência aos macrólidos mais frequentes são a modificação do local alvo e produção de uma bomba de efluxo (Leclercq *et al.*, 2002). A modificação do local alvo é feita por uma metilase (proteína Erm) codificada pelos genes *erm*. Esta proteína metila um resíduo de adenina na subunidade 23S do ribossoma e impede a ligação dos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B (fenótipo MLS_B). Em *S. pyogenes*, o fenótipo MLS_B pode ser mediado por dois genes *erm*: o gene *erm(B)* e o gene *erm(TR)*, pertencente à classe *erm(A)*. A expressão destes genes pode ser constitutiva ou indutível pela presença de eritromicina, dando origem aos fenótipos cMLS_B ou iMLS_B, respectivamente (Leclercq *et al.*, 2002). O segundo mecanismo que confere resistência aos macrólidos em GAS é a presença de uma bomba de efluxo associada à membrana. Esta bomba é codificada pelos genes *mef* [*mef(A)* ou *mef(E)*] e exporta para o exterior as moléculas de antibiótico o que confere resistência aos macrólidos (Roberts *et al.*, 1999; Sutcliffe *et al.*, 1996).

Relativamente às tetraciclinas, embora não sejam geralmente utilizadas na terapêutica, a resistência a este antimicrobiano é analisada em laboratório por estar frequentemente associada com a resistência à eritromicina. As tetraciclinas actuam por inibição da síntese proteica ao impedirem a associação do tRNA ao ribossoma bacteriano (Chopra *et al.*, 2001). A resistência às tetraciclinas tem vindo a ser descrita por vários estudos em bactérias comensais e patogénicas maioritariamente devido a aquisição dos genes *tet*. Estes genes, à semelhança do que se verifica para os macrólidos, conferem resistência por dois mecanismos, efluxo do antibiótico e protecção ribossomal. Em bactérias de carácter Gram positivo os mais frequentes são os genes *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)* (Chopra *et al.*, 2001). Os genes *tet(K)* e *tet(L)* codificam bombas de efluxo, que se associam à membrana citoplasmática e exportam as moléculas de tetraciclina para o exterior das células, o que reduz a sua concentração intracelular protegendo os ribossomas da acção dos antimicrobianos (Chopra *et al.*, 2001). Os genes *tet(M)* e *tet(O)* codificam proteínas de protecção ribossomal citoplasmáticas com homologia aos factores de alongação EF-TU e EF-G. A ligação destas proteínas aos ribossomas provoca uma alteração conformacional que impede a ligação das tetraciclinas (Sanchez-Pescador *et al.*, 1988).

1.5. Vacinas

Devido ao elevado número de infecções por GAS, foi proposto o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz que se espera vir a ter um grande impacto na saúde de milhões de pessoas. As vacinas propostas podem ser classificadas em duas categorias: as que contêm

determinantes de virulência conservados em diferentes serótipos (C5a-peptidase, SpeB, proteínas de ligação à fibronectina, região C-terminal da proteína M) e as que se baseiam na região variável N-terminal da proteína de superfície M (Bisno *et al.*, 2005). Com base na extremidade N-terminal da proteína M de estirpes de diferentes tipos foi desenvolvida uma vacina 26-valente que se estima conferir protecção na América do Norte contra 85% das estirpes responsáveis por faringite, 92.5% das estirpes associadas a febre reumática e 87.6% das estirpes invasivas, incluindo 100% das estirpes associadas a fascíte necrozante (McNeil *et al.*, 2005; Shulman *et al.*, 2009). Esta vacina já completou a fase I e II dos ensaios clínicos em adultos, sendo bem tolerada, imunogénica e não despoletando reacções cruzadas. Actualmente está a ser considerada para ensaios clínicos em crianças, que representam um dos grupos alvo desta vacina (Dale *et al.*, 2008).

1.6. Objectivos

O conhecimento das características das estirpes mais prevalentes e o relacionamento entre estirpes de diferentes infecções é essencial para adequar a terapêutica utilizada e desenvolver novas medidas de prevenção. Devido à ausência em Portugal de estudos epidemiológicos focados em estirpes recolhidas de infecções de pele e tecidos moles, este estudo pretende:

- Caracterizar estirpes de GAS recolhidas em Portugal entre 2003 e 2009 de amostras de pus de feridas e abscessos, através de métodos fenotípicos (serotipagem T) e moleculares (tipagem *emm*, determinação dos perfis por PFGE e determinação dos perfis de toxinas) a fim de avaliar diversidade da população bacteriana.
- Avaliar e comparar as diversas metodologias utilizadas.
- Determinar o número de estirpes resistentes aos macrólidos e analisar a distribuição destas e dos respectivos genótipos de resistência na população. Averiguar também a associação descrita entre estirpes do fenótipo cMLS_B e a resistência à tetraciclina.
- Comparar as propriedades moleculares das principais linhagens com estudos que incluam estirpes recolhidas de outros tipos de infecção.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Informação das estirpes

Este estudo englobou 320 estirpes de *S. pyogenes* recolhidas em vários hospitais do país, durante o período 2003-2009, que foram isoladas a partir de amostras de pús de lesões cutâneas, como feridas e abscessos.

A identificação das estirpes foi feita nos respectivos hospitais e confirmada no laboratório da Unidade de Microbiologia e Infecção, pela morfologia das colónias, β -hemólise e susceptibilidade à bacitracina. No caso de estirpes resistentes a este antibiótico verificou-se a presença do antigénio característico na parede celular (Streptococcal Grouping Kit, Oxoid, Basingstoke, UK).

Antes de se iniciar o processo de tipagem, as estirpes foram repicadas a partir de uma colónia em meio TSA (Tryptic Soy Agar) (Oxoid, Basingstoke, UK). Posteriormente foram conservadas a -80°C em meio TSB (Tryptic Soy Broth) (Oxoid, Basingstoke, UK) com 15% (V/V) de glicerol.

2.2. Serotipagem T

Para determinar o serótipo T das estirpes, inoculou-se cerca de 10 μL de meio de preservação onde as estirpes estavam conservadas, em 5mL de Todd-Hewitt (Oxoid, Basingstoke, UK) e deixou-se a incubar a 30°C durante a noite. No dia seguinte, centrifugou-se a 3220g durante 15min à temperatura ambiente e desprezou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 4 gotas de Todd-Hewitt (Oxoid, Basingstoke, UK) e recorrendo aos reagentes do kit (Auxiliary Reagents for Haemolytic Streptococcus Typing, Denka Seiken, Tóquio, Japão), adicionaram-se 4 gotas de extracto pancreático suíno, 1 gota de vermelho fenol e 2 gotas de solução de ajuste pH. Misturou-se e incubou-se a 37°C durante 1h. Finalmente, centrifugou-se novamente a 3220g durante 15min à temperatura ambiente e desprezou-se o sobrenadante. Fez-se uma nova suspensão em 500 μL de PBS 1X a partir da qual se efectuou a aglutinação com os soros específicos. A aglutinação foi feita numa lâmina com 5 soros polivalentes (T, U, W, X e Y) e 19 monovalentes (1, 2, 3, 4, 5/27/44, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14/49, 18, 22, 23, 25, 28, B3264 e Imp.19) (Haemolytic Streptococcus Group A Typing-sera, Denka Seiken, Toquio, Japão).

2.3. Tipagem *emm*

2.3.1. Amplificação

A tipagem *emm*, como já foi referido, permite a identificação da região hipervariável do gene *emm* que codifica a proteína M. Este método consiste na amplificação, purificação, e

sequenciação da região N-terminal do gene *emm*. Todos os passos, incluindo a identificação do tipo *emm*, foram executados de acordo com os protocolos e recomendações do CDC (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.htm>).

A amplificação foi feita por reacção em cadeia de polimerase (PCR) num volume total de 50µL, utilizando 1,5 µL de sobrenadante de lisado bacteriano como fonte de DNA molde. Para preparar o lisado bacteriano recolheu-se, com uma ansa, algumas colónias a partir de placa e suspenderam-se em 300µL de solução de cloreto de sódio (NaCl 0,85%). Seguidamente, colocou-se o tubo a 70°C durante 15min. Centrifugou-se a amostra a 18000g durante 2min e desprezou-se o sobrenadante. Fez-se uma nova suspensão do sedimento em 50µL de TE 1X (Tris 10mM; EDTA 1mM, pH8), 6µL de mutanolisina (5 U/µL, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e 2µL de hialuronidase (12,3mg/mL, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Após 30min a 37°C, ferveu-se a 100°C durante 10min. Os lisados foram conservados a -20°C até se efectuar o PCR. Os restantes componentes do PCR foram adicionados de modo a obter uma concentração final de tampão de PCR “green GoTaq flexi” a 1X (Promega, Madison, WI, USA), 0.02 U/µL de DNA polimerase GoTaq (Promega, Madison, WI, USA), 0,2 mM de cada nucleotídeo (Fermentas, Vilnius, Lituania) e 1,5mM de MgCl₂ (Promega, Madison, WI, USA). Os primers utilizados foram o *emm1* e *emm2*, (Quadro 1, em anexo) ambos a uma concentração final de 1,4pmol/µL. O ciclo de PCR consiste numa temperatura inicial de 94°C durante 1min, seguido de 10 ciclos de 15s a 94°C, 30s a 46.5°C e 1min e 15s a 72°C, 20 ciclos de 15s a 94°C, 30s a 46.5°C, e 1min e 15s a 72°C com um incremento de 10s para cada ciclo subsequente. No final deixa-se 10min a 72°C.

Os produtos de PCR foram purificados com o Kit “High Pure PCR product purification Kit” (Roche, Mannheim, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante e depois enviados para sequenciar (Macrogen, Coreia do Sul e Holanda) com o primer *emmseq2* (Quadro 1, em anexo). Utilizam-se as primeiras 240 bases da sequência para interrogar utilizando o BLAST disponível da base de dados do CDC (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>). Quando existe uma elevada semelhança (≥95%) com a extremidade 5’ de uma sequência conhecida, atribui-se o mesmo tipo *emm*.

2.3.2. Digestão do produto de PCR.

A digestão e separação dos produtos da reacção de PCR para amplificar a região do gene *emm* que é utilizada na tipagem, permite comparar de uma forma mais económica os tipos *emm* de diferentes estirpes. Considerando que perfis iguais correspondem ao mesmo tipo *emm*, é possível através da análise e comparação destes prever o tipo *emm*. A digestão

dos produtos de PCR foi feita simultaneamente com as endonucleases HincII (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e HaeIII (Fermentas, Vilnius, Lituânia) [2,5U de cada para 5µL de produto de PCR num volume total de 6,1µL que se fez com buffer Tango 10X (Fermentas, Vilnius, Lituânia)]. Os produtos desta digestão foram separados num gel de 3% (m/v) [2% de agarose NuSieve (Lonza, Rockland, USA) e 1% agarose normal (Bio-Rad, Munique, Alemanha)]. Das estirpes com perfis iguais, enviou-se uma para sequenciar.

2.3.3. Extração de DNA

Por vezes, devido a uma qualidade insuficiente ou a uma rápida degradação do DNA, o lisado bacteriano preparado de acordo com as recomendações do CDC não permitiu a amplificação do gene *emm*. Nestes casos, recorreu-se à extração de DNA por outro método. Adicionou-se 10µL de stock de congelação a 5mL de Todd-Hewitt e incubou-se a 37°C. No dia seguinte, centrifugou-se a cultura a 3220g durante 15min a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e fez-se uma nova suspensão em 468,2µL de TE1X (Tris 10 mM pH7,5; EDTA 1mM pH8,0). Após se transferir para um tubo de 2mL, adicionou-se 30µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) (10%, Bio-Rad, Munique Alemanha), 3µL de proteinase K (20mg/mL; Roche, Manheim, Alemanha), 60µL de mutanolisina (5U/µL; Sigma-Adrich, Steinheim, Alemanha), 20µL de hialuronidase (12,3mg/mL; Sigma-Adrich, Steinheim, Alemanha) e 18,8µL de lisozima (20mg/mL; Sigma-Adrich, Steinheim, Alemanha). Agitou-se no vortex e incubou-se durante 1h a 37°C. Seguidamente, adicionou-se 15µL de ribonuclease (20mg/mL; Sigma-Adrich, Steinheim, Alemanha) e incubou-se a 37°C durante 30min. Finalmente adicionou-se 100µL de NaCl 5M e 80µL NaCl CTAB [10% de brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB) em NaCl 0,7M]. Levou-se ao vortex e após incubação durante 10min a 65°C, adicionaram-se 800µL clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Centrifugou-se durante 5min a 18000g e transferiu-se a fase aquosa para outro tubo de 2mL. Adicionaram-se 600µL fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), levou-se ao vortex e voltou-se a centrifugar a 18000g durante mais 5min. Novamente, transferiu-se a fase aquosa para outro tubo, desta vez de 1,5mL, e neste caso adicionaram-se 600µL de isopropanol. Ao agitar é por vezes possível observar as fibras de DNA. Centrifugou-se, mais uma vez, durante 5min a 18000g e desprezou-se o sobrenadante. Em seguida, adicionaram-se 500µL de etanol 70% a -20°C. Repetiu-se este último passo e deixou-se secar ao ar. Por fim, fez-se a suspensão do DNA em 50µL de TE 1X. Com este método obteve-se concentrações de DNA muito superiores ao necessário para realizar o PCR, por isso foi necessário quantificar o DNA e diluir para 200ng/µL. Utilizando-se consoante as reacções entre 200 e 300ng (1-1,5µL).

2.4. Determinação do perfil de toxinas.

A presença dos genes *speF*, *ssa*, *smeZ*, *speH*, *speK*, *speJ*, *speG*, *speC*, *speK*, *speL*, *speI*, *speB*, *speA* foi detectada através de 2 PCRs multiplex. Foram utilizados pares de primers específicos para cada gene com capacidade de amplificar todas as variantes alélicas descritas de acordo com as 13 sequências genómicas publicadas (GenBank AE004092, AE009949, AE014074, AM295007, BA000034, CP000003, CP000017, CP000056, CP000259-CP000262, CP000829) e também com as sequências das variantes alélicas do *speA*, *speC* e *smeZ* disponíveis no GenBank.

A amplificação dos genes *speF*, *ssa*, *smeZ*, *speH*, *speK*, *speJ* e *speG* foi efectuada num volume total de 25 µL, com tampão de PCR 1X “green GoTaq flexi” (Promega, Madison, WI, USA), MgCl₂ a 5mM, nucleotídeos a 0,2 mM, cada, 0.08U de DNA polimerase GoTaq (Promega) e 1µL de DNA (lisado bacteriano preparado como descrito para a determinação do *emm*). Os pares de primers utilizados foram *speF1/speF2*, *ssa1/ssa2*, *smeZ-F/smeZ-R2*, *speH1/speH3*, *speK-f/speK-r2*, *speJg-f2/speJg-r* e *speG-f/spe-r* com uma concentração final de 0,8pmol/µL, 0,2pmol/µL, 1,8pmol/µL, 0,32pmol/µL, 0,4 pmol/µL, 0,12pmol/µL e 0,24pmol/µL, respectivamente (Quadro 1, em anexo).

A amplificação dos genes *speC*, *speM*, *speL*, *speI*, *speB*, *speA* foi também efectuada num volume total de 25 µL, com tampão de PCR “green GoTaq flexi” a 1X (Promega), MgCl₂ a 5mM (Promega), nucleotídeos a 0,2 mM cada (Fermentas), 0.06U de DNA Polimerase GoTaq (Promega) e 1µL de DNA (lisado bacteriano preparado como descrito para a determinação do *emm*). Os pares de primers utilizados foram *speC-f2/speC-r2*, *speK-f/speM-r*, *speL-f/speL-r*, *speI1/speI3*, *speB1/speB2*, *speA-f2/spe-r2* a uma concentração final de 0,2pmol/µL, 0,24pmol/µL, 0,24pmol/µL, 0,2pmol/µL, 0,1pmol/µL, 0,16pmol/µL, respectivamente (Quadro 1, em anexo).

O programa de PCR para o primeiro multiplex descrito consistiu numa temperatura inicial de desnaturação de 95°C durante 2min, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 1min, 54°C, durante 30s e 72°C durante 1min e 30s. No segundo multiplex descrito, o programa utilizado foi o mesmo, com excepção da temperatura de “annealing”, que é de 62°C em vez de 54°C. Os produtos de PCR do primeiro e do segundo multiplex foram separados em géis de agarose de 1% e 2%, respectivamente. Como controlo positivo para cada reacção misturou-se o DNA de uma estirpe M1 (SF370) com o DNA de outras estirpes com os restantes genes que se estavam a testar. A estirpe M1 foi obtida da “Coleccion Española de Cultivos Tipo” (Valencia, Espanha, CECT 5109) e contém os genes *speB*, *speF*, *speG*, *smeZ*, *speC*, *speH*, *speI* e *speJ*.

2.5. Efectroforese em campo pulsado

2.5.1. Extracção e imobilização do DNA bacteriano

Inoculou-se 15µL do “stock” congelado em 5mL de Todd-Hewitt (Oxoid, Basigstoke, UK) e colocou-se, durante a noite na estufa a 37°C. Centrifugou-se a 3320g durante 15min a 4°C, desprezou-se o sobrenadante e fez-se uma nova suspensão em 5mL de TEN (Tris 100mM; EDTA 100mM; NaCl 150mM, pH7,5). Voltou-se a centrifugar nas mesmas condições e fez-se uma nova suspensão em 1mL de TEN. Seguidamente, transferiu-se para um tubo de 1,5mL e centrifugou-se novamente durante 15min a 3320g. Desprezou-se o sobrenadante e fez-se uma nova suspensão em 200µL de TEN.

Para adequar a concentração de DNA, leu-se a densidade óptica a 620nm e calculou-se o volume de TEN a adicionar a cada amostra ($V_{add} = OD \times 40 \times 240 - 240$).

Para fazer os discos, misturou-se 150µL de “low melting agarose” 1,5% (m/V) (Bio-rad, Munique, Alemanha) diluída em PIV (Tris 10mM pH8; NaCl 1M) a 150µL de suspensão bacteriana com a concentração adequada e equilibrada a 41°C. Após levar ao vortex, colocaram-se sucessivamente gotas de 20 µL numa superfície lisa forrada com parafilme, que solidificaram após 5 min a -20°C. Para a lise das células adicionou-se aos discos uma solução constituída por 0,67mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 16,67mg/mL de ribonuclease A (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e 16,67U/mL de mutanolizina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e EC (Tris 6mM pH7,5; EDTA 100mM pH7,5; NaCl 1M, desoxicolato de sódio 5mM; N-lauril sarcosine de sódio 17mM; Brij 58 0,5% m/v; MgCl₂ 1mM). Incubou-se a 37°C durante pelo menos durante 5h.

Seguidamente, colocaram-se os discos em tampão ES (EDTA 0,5mM pH7,5; N-Lauril sarcosina de sódio 34mM) com 0,5 mg/mL de proteinase K (Roche, Menheim, Alemanha) durante 24h a 50°C. Procedeu-se a lavagens com tampão TE (1X) (10mM Tris pH7,5; 1mM EDTA pH8). Até se fazer a digestão, os discos ficaram armazenados nesta solução a 4°C.

2.5.2. Digestão

Para a digestão, os discos foram colocados durante a noite ou com 7,5 U de Smal (Fermentas, Vilnius, Lituania) a 30°C num volume final de 45µL, ou com 3,75U de Crf9I (Fermentas, Vilnius, Lituania) a 37°C num volume total de 20µL. Os tampões utilizados na digestão foram tango 10X (Fermentas, Vilnius, Lituania) no caso da Smal e tampão Crf9I (Fermentas, Vilnius, Lituania) para a enzima Crf9I, respectivamente. Antes se de efectuar a digestão com as endonucleases fez-se um equilíbrio de uma hora à temperatura de digestão em 500µL (Smal) ou 100µL (Crf9I) de tampão de restrição, tango 10X ou tampão Crf9I, respectivamente. A utilização da enzima Crf9I, restringiu-se a estirpes de fenótipo M. A

expressão deste fenótipo, resulta frequentemente da presença do gene *mef(A)* que se localiza no mesmo elemento genético de uma metiltransferase (Figueiredo *et al.*, 2006). A *Sma*I ao ser sensível à metilação, não digere o DNA metilado.

2.5.3. Separação

Após digestão, adicionou-se “loading buffer” aos discos e colocaram-se num gel de agarose 1% (p/V) (BioRad, Munique, Alemanha) assim como o marcador de peso molecular “Lambda ladder PFGE marker” (New England BioLabs, UK). A corrida ocorreu durante 23h em tampão TBE 0.5X (Tris-borate-EDTA) (BioRad, Munique, Alemanha), num aparelho CHEF-DR III (BioRad, Munique, Alemanha), a 6,0 V/cm³ com um tempo inicial de 5s e um tempo final de 35s.

2.5.4. Análise dos perfis genómicos

Os perfis de macro-restrição obtidos para cada estirpe foram analisados e comparados com recurso ao programa informático BioNumerics (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Desta forma construíram-se dendrogramas utilizando o coeficiente de Dice (com as definições de optimização e tolerância de 1,0 e 1,5%, respectivamente) e o método de agrupamento hierárquico UPGMA (“unweighted pair group method with arithmetic means”). Consideraram-se como grupos de PFGE, grupos de 5 ou mais estirpes com semelhança igual ou superior a 80%.

2.6. Hibridação “Southern blot”

Através desta técnica pretendeu-se confirmar a presença ou ausência dos genes *speM*, *speL*, *speB* e *speF*. Começou-se por preparar o DNA genómico em discos de agarose, digeriu-se com *Sma*I e separou-se por electroforese em campo pulsado nas condições descritas no ponto 2.5. Seguidamente, transferiu-se o DNA para uma membrana de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Biociences, Bucks, UK) por sobreposição do gel de PFGE num sistema de vácuo (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia). Ligou-se o aparelho a 40mmHg e cobriu-se o gel com solução de depurinação (HCL 0,25M) durante 10min. Seguidamente, removeu-se o restante da solução de depurinação e adicionou-se solução de desnaturação (NaOH 0,4M; NaCl 1,5M). Deixou-se nestas condições durante 2h e 30min com o cuidado de não deixar a superfície do gel secar. Após retirar a solução de desnaturação com uma pipeta retirou-se o gel de agarose e desligou-se o vácuo. Lavou-se a membrana com SSC 6X (Citrato de Sódio 90mM; NaCl 0,9M; pH7) e deixou-se ao ar entre 5 a 15 minutos. De modo a fixar o DNA, expôs-se a membrana a radiações UV durante 20s no “UV crosslinker” (Alfagene, Cambridge, UK).

As sondas utilizadas correspondem aos produtos de PCR resultantes da amplificação de um fragmento interno de cada gene após purificação. Para a amplificação em separado dos

genes *speM*, *speL* e *speF*, utilizaram-se as mesmas condições. Os primers utilizados foram os mesmos que os utilizados nos multiplex para a detecção das exotoxinas (Quadro 1, em anexo). A concentração final dos componentes foi, tampão 1X “green Gotaq flexi” (Promega), DNA polimerase GoTaq a 0,02U (Promega), nucleótidos a 0,2mM (Fermentas), MgCl₂ a 1,5mM (Promega) e primers a 0,4 pmol/μL, num volume total de 50μL com 3μL de DNA (lisado bacteriano preparado como descrito para a determinação do tipo *emm*). O programa foi semelhante ao utilizado para amplificação das toxinas no multiplex. No caso dos gene *speM* e *speL*, utilizou-se uma temperatura de hibridação de 62°C e no caso do gene *speF* de 54°C. As condições para a amplificação do *speB* diferem das anteriores. Num volume total de 50μL com 3 μL de DNA (lisado bacteriano extraído como descrito na determinação do tipo de *emm*), utilizou-se uma concentração final de tampão “green GoTaq flexi” 1X (Promega), 0,02U/μL de DNA polimerase GoTaq (Promega), 0,2mM de nucleótidos (Fermentas) e 0,4 pmol/μL de primer. O programa começou a uma temperatura de 94°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de 1min a 94°C, 2min a 58°C e 1min a 72°C.

A marcação e hibridação foram efectuadas com o marcador de ácidos nucleicos ECL e os reagentes do sistema de detecção (GE Health care, Buckinghamshire, UK) de acordo com as instruções de fabricante. Começou-se por lavar a membrana com SSC 5X (Citrato de sódio 75mM; NaCl 0,75M; pH7) e coloca-la na garrafa de hibridação com cerca de 20mL do SSC 5X utilizado na lavagem. Incubou-se a 42°C com rotação durante 15min. Desprezou-se o SSC 5X e adicionou-se a solução de hibridação (tampão de Hibridação; 5% m/v de agente bloqueante; NaCl 0,5M). Incubou-se a 42°C com rotação durante 1 hora. Entretanto, diluiu-se a sonda para 10ng/μL em 15μL com água fornecida com o kit e adicionou-se 4 μL marcador “DNA controlo” (Kit). Ferveu-se durante 5min e colocou-se em gelo. De seguida, adicionou-se 19μL de “Labelling reagent” (Kit) e 19μL de glutaraldeído (Kit). Após incubação a 37°C durante 20min, adicionou-se 1mL de solução de hibridação, misturou-se e colocou-se na garrafa de hibridação com a membrana. Incubou-se durante a noite a 42°C com rotação. No dia seguinte, removeu-se a solução de hibridação e lavou-se a membrana 2 vezes com rotação durante 20min a 42°C com solução de lavagem primária (Ureia 6M; SDS 0,4%; SSC 0,5X). Retirou-se a membrana da garrafa de hibridação e lavou-se com SSC 2X (Citrato de Sódio 30mM; NaCl 0,3M; pH7) durante 5min à temperatura ambiente. Para a fase da detecção, misturou-se num tubo, 7,5mL de solução de detecção 1 com 7,5mL de solução de detecção 2 (Kit) e adicionou-se de imediato a mistura à membrana. Após 1 minuto a agitar a membrana de modo a cobri-la amplamente com a solução, guardou-se a solução num tubo e colocou-se a membrana numa mica de plástico com o DNA para cima, tendo o cuidado de eliminar as bolhas de ar. Sucessivamente colocou-se a mica numa cassette.

Numa câmara escura colocou-se uma chapa de autoradiografia dentro da cassete por cima da mica de modo a cobrir toda a membrana. O tempo de exposição variou de 30min a 5h. No final do procedimento, a membrana ficou armazenada a 4°C numa mica com a solução de detecção para uma eventual reutilização.

2.7. Determinação da susceptibilidade a antimicrobianos

Para determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos utilizou-se a metodologia de Kirby-bauer de acordo com as recomendações do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006). Este método consiste na difusão de antibióticos presentes em discos de papel que são colocados na superfície de uma placa com meio Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, UK), suplementada com 5% (V/V) de sangue de carneiro desfibrinado (ProBiológica, Belas, Portugal) e semeada com uma determinada estirpe. Para se semear a estirpe na placa onde se colocam os discos, ajustou-se visualmente a turbidez do inóculo numa suspensão de NaCl 0,85% a uma suspensão 0,5 da escala de Macfarland. Após aplicar os discos, colocou-se a placa na estufa durante a noite a 37°C com atmosfera de 5% CO₂. A leitura efectuou-se de acordo com os critérios de interpretação do “Clinical and Laboratory Standard Institute” (Quadro 1).

Quadro1. Critérios de interpretação dos antibióticos utilizados segundo as normas do CLSI^a

	Conteúdo disco (µg)	Susceptível (mm)	Intermédio (mm)	Resistente (mm)
Penicilina	10	≥24	-	-
Eritromicina	15	≥21	16-20	≤15
Clindamicina	2	≥19	16-18	≤15
Tetraciclina	30	≥23	19-22	≤18
Cloranfenicol	30	≥21	18-20	≤17
Levofloxacina	5	≥17	14-16	≤13
Linezolide	30	≥21	-	-
Vancomicina	30	≥17	-	-

^a Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S16. Wayne, PA: CLSI, 2006.

Para os resultados intermédios efectuou-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) com E-teste de acordo com as instruções do fabricante (bioMérieux, Marcy-l’Etoile, França). O E-teste é uma tira com um gradiente de concentração de um determinado antibiótico. À semelhança do que se fez para os discos, utilizaram-se placas de meio Muller-Hinton com 5% de sangue, semeadas com um inóculo ajustado ao valor 0,5 da escala de McFarland.

O fenótipo de resistência aos macrólidos foi determinado através do método de duplo disco, em que se colocam os discos de eritromicina e clindamicina a 20mm de distância (Figura 3). Estão descritos dois fenótipos distintos, M e MLS_B. O fenótipo MLS_B pode, por sua vez ser constitutivo (cMLS_B) ou indutível (iMLS_B) (Figura 3).

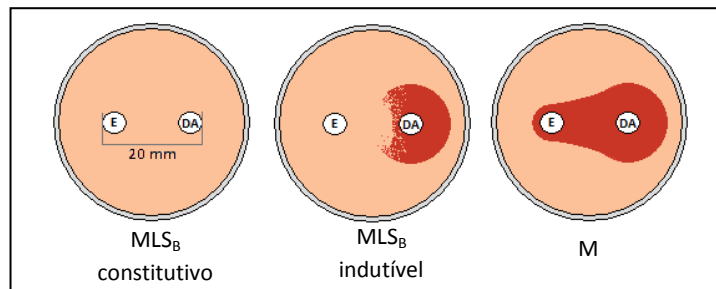


Figura 3. Fenótipos de resistência aos macrólidos em *Streptococcus pyogenes*. (E), eritromicina, (DA), clindamicina.

2.8. Detecção dos genes de resistência aos macrólidos

A detecção dos genes de resistência aos macrólidos, *mef*, *erm(B)* e *erm(TR)* foi feita por PCR multiplex num volume total de 10 μ L utilizando como molde o lisado bacteriano preparado por incubação com mutanolisina e hialuronidase de acordo com os protocolos e recomendações do CDC como descrito para a determinação do tipo *emm* (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.htm>). Os componentes utilizados e as suas concentrações finais foram respectivamente: tampão de PCR “Super Tth” (Enzyme Technologies, UK) a 1X, DNA polimerase Super Tth a 0,0625U (Enzyme Technologies, UK) e nucleótidos a 2mM cada (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Os pares de primers utilizados foram *mefA/E1/mefA/E2*, *ermB1/ermB2*, *ermTR1/ermTR2*, com concentração de 0,05pmol/ μ L, 0,25pmol/ μ L e 0,4pmol/ μ L, respectivamente (Quadro 1, em anexo). O ciclo de PCR iniciou-se com um período de 5min a 94°C, ao qual se segue 40 ciclos, de 30s a 94°C, 30s a 51°C e 1min a 72°C.

Em todas as estirpes em que se detectou o gene *mef* fez-se um PCR adicional para distinguir o *mef(A)* do *mef(E)*. Com 1 μ L dos mesmos moldes de DNA preparou-se uma reacção com um volume total de 20 μ L composta por tampão “green GoTaq flexi” a 1X (Promega, Madison, USA), 0.004U/ μ L de DNA polimerase GoTaq (Promega, Madison, USA), 0.125 mM de cada nucleotídeo (Fermentas, Vilnius, Lituania) e 3mM de MgCl₂ (Promega, Madison, USA). Os primers utilizados foram o *mefR* a 1,7pmol/ μ L em conjunto com *mef1* e *mef2*, ambos a uma concentração final de 1pmol/ μ L. (Quadro 1, em anexo). O ciclo de PCR iniciou-se com um período de 4min a 94°C, ao qual se segue 30 ciclos, de 1min a 94°C, 1min a 56°C e 1min a 72°C. Para finalizar, 10min a 72°C.

2.9. Detecção dos genes de resistência à tetraciclina

Para a detecção dos genes que conferem resistência à tetraciclina [*tet(L)*, *tet(M)*, *tet(K)* e *tet(O)*] foi necessário realizar dois PCRs distintos.

A presença dos genes *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(K)* foi testada num PCR multiplex com um volume total de 50 μ L em que se adiciona 2 μ L de lisado bacteriano preparado por incubação

com mutanolisina e hialuronidase de acordo com os protocolos e recomendações do CDC, como descrito para a determinação do tipo *emm*. A concentração final dos componentes utilizados foi tampão “green GoTat Flexi” 1X (Promega, Madison, WI, USA), 0,2mM de cada nucleotídeo (Fermentas, Vilnius, Lituania), 2mM de MgCl₂ (Promega) e 0,05U de DNA polimerase GoTaq (Promega). Os 3 pares de primers utilizados foram tetL-up/tetL-rev, tetM-up/tetM-rev e tetK-up/tetK-rev, todos a uma concentração final de 0,2pmol/μL (Quadro 1, em anexo). O programa utilizado consiste em 35 ciclos de 1min a 95°C, 1 min a 50°C e 1min e 30s a 72°C. Por fim 5min a 72°C. A presença de *tet(O)* foi analisada à parte com os primers tetO-up/tetO-rev (Quadro 1, em anexo) em que a concentração final dos componentes no PCR e a quantidade de DNA molde foram iguais às utilizados no multiplex. O programa apenas diferiu na temperatura de hibridação, que é de 55°C em vez de 50°C.

2.10. Análise estatística

Para determinar a significância estatística entre resultados recorreu-se sempre que possível ao teste de Fisher, bilateral (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>).

Utilizou-se o teste de Cochran-Armitage (Altman, 1999) de forma a avaliar se existia alguma tendência significativa para os valores de resistência aos macrólidos e às tetraciclina ao longo dos anos.

Os resultados dos métodos de tipagem foram comparados através do cálculo do índice de diversidade de Simpson e do coeficiente de Wallace, assim como os respectivos intervalos de confiança a 95% (IC95%) (www.COMPARINGPARTITIONS.INFO). O índice de diversidade de Simpson (SID) indica a diversidade de uma população. Este índice é definido como a probabilidade de duas estirpes escolhidas aleatoriamente de uma amostra apresentarem classificações diferentes num determinado método de tipagem (Grudmann *et al.*, 2001). Por exemplo, quanto maior o SID relativamente ao tipo *emm*, menor é a probabilidade de duas estirpes escolhidas ao acaso apresentarem igual tipo *emm*. O coeficiente de Wallace indica a probabilidade de duas estirpes consideradas relacionadas por um determinado método de tipagem ficarem também relacionadas quando se recorre a outro método de tipagem (Wallace *et al.*, 1983).

3. RESULTADOS

3.1. Idade e sexo dos indivíduos de onde foram recolhidas as estirpes

Das 320 estirpes de *S.pyogenes* estudadas, 154 (48,1%) foram recolhidas a partir de infecções em indivíduos do sexo feminino e 166 de infecções em indivíduos do sexo masculino (51,9%). As idades variaram dos 7 dias aos 97 anos. Através da análise por décadas de idades verificou-se que a maioria dos casos ocorreu em crianças entre os 0 e 9 anos de idade (21,3%) (informação não apresentada). Para analisar a relação entre idade e o sexo dos indivíduos dos quais foram recolhidos as estirpes, separaram-se as estirpes em três classes: crianças (<18), adultos (18-64) e idosos (>64) (Figura 4). Até aos 64 anos de idade, embora não seja estatisticamente significativo, indivíduos do sexo masculino foram os mais afectados (Teste de Fisher: $p=0.32$). Nos idosos (>64) a maioria das estirpes foram recolhidas de indivíduos do sexo feminino.

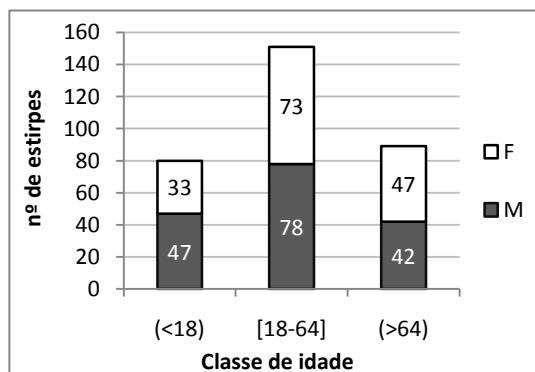


Figura 4. Relação do número de estirpes por classes de idades e sexo dos indivíduos infectados.

3.2. Tipagem *emm*

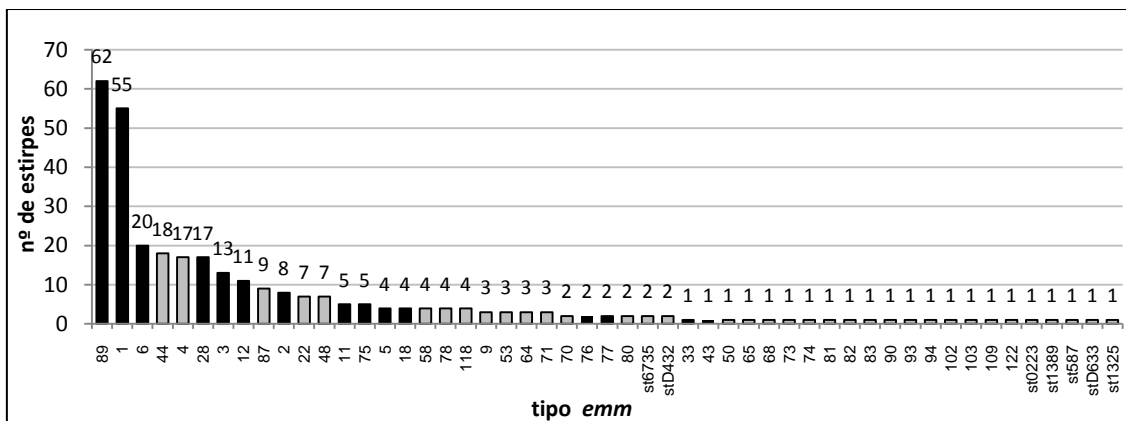


Figura 5. Tipos *emm* mais prevalentes na população. As barras a preto correspondem aos tipos *emm* incluídos na futura vacina 26-valente. O rótulo por cima das barras corresponde ao número de estirpes observadas do respectivo tipo *emm*.

Neste estudo foram identificadas estirpes de 51 tipos *emm* (SID= 0,916 [IC 95% 0,899-0,933]). Duas estirpes apresentaram seqüências novas que foram submetidas à base de dados: um novo tipo do gene *emm* (st1325) e um novo subtipo do gene *emm87* (*emm87.6*). As estirpes dos tipos *emm89* (n=62 estirpes) e *emm1* (n=55 estirpes) foram as mais frequentes, constituindo em conjunto, 36,6% da população. Em seguida, as estirpes mais frequentes foram as dos tipos *emm6* (n=20), *emm44* (n=18), *emm4* (n=17) e *emm28* (n=17) que em conjunto com as dos tipos *emm89* e *emm1* correspondem a 59.1% do número total de estirpes (Figura

5). Dos 26 tipos *emm* incluídos na futura vacina que está de momento em ensaios clínicos, 15 foram identificados neste estudo e correspondem a 67.8% do número total de estirpes (Figura 5).

3.2.1. Prevalência de estirpes dos tipos *emm1* e *emm89*

Como apresentado na figura 6, entre 2003 e 2004, existiram grandes alterações na proporção de estirpes dos tipos *emm1* e *emm89*. Isto ocorre provavelmente devido ao reduzido número de estirpes recolhidas durante estes anos. Em 2005 o número de estirpes do tipo *emm1* foi ligeiramente superior ao número de estirpes do tipo *emm89*. Nos restantes anos, estirpes do tipo *emm89* foram sempre as mais prevalentes. De 2006 para 2007 verifica-se um aumento de estirpes com ambos os tipos, seguido em 2008 de uma estabilização no número de estirpes do tipo *emm1* e um contínuo aumento no número de estirpes do tipo *emm89*. Em 2009, embora não seja significativo, estirpes de ambos os tipos *emm* diminuíram na população (teste de Fisher: *emm1* [$p=0,10$]; *emm89* [$p=0,24$]).

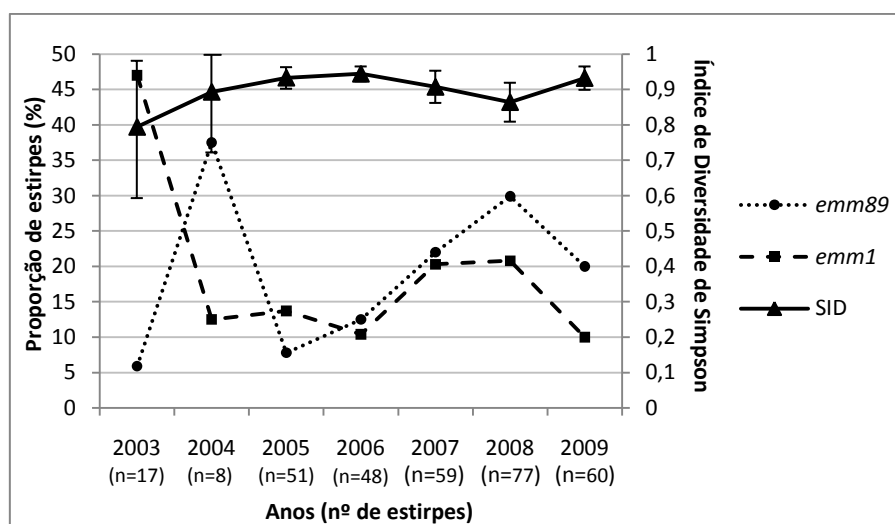


Figura 6. Relação entre a distribuição das estirpes dos dois tipos *emm* mais prevalentes e o índice de diversidade de Simpson para todos os tipos *emm* da população.

3.2.2. Tipo *emm* vs idade dos indivíduos de onde foram recolhidas as estirpes.

De modo a avaliar se existia alguma relação entre o tipo *emm* das estirpes e a idade dos indivíduos de onde estas foram recolhidas, analisaram-se estas duas características em conjunto para as estirpes dos tipos *emm* mais prevalentes (≥ 5 estirpes). De facto, as estirpes da maioria dos tipos *emm* apresentados no gráfico da figura 7 causam infecções nas 3 classes de idades. Para as estirpes dos tipos *emm28*, *emm22* e *emm48* embora se tenham recolhido poucas ou nenhuma de crianças, estas diferenças não são significativas (teste de Fisher: *emm28* [$p=0,08$]; *emm22* e *emm48* [$p=0,20$]).

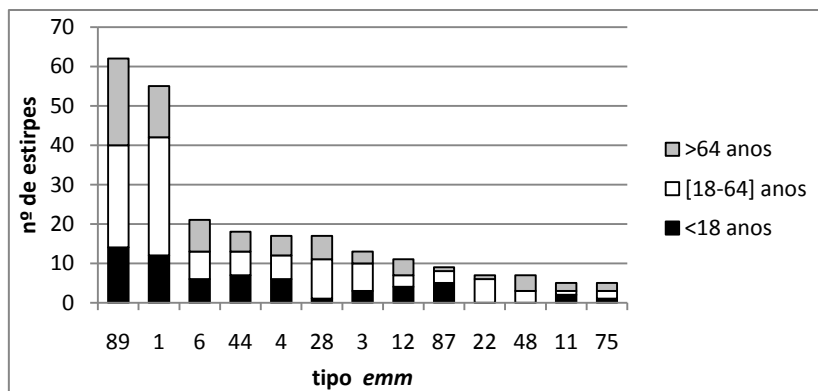


Figura 7. Relação entre as estirpes dos tipos *emm* mais prevalentes e as idades dos indivíduos infectados.

3.3. Serotipagem T

Relativamente à serotipagem T identificaram-se 19 serótipos ou conjugações de serótipos diferentes (SID=0,864 [IC 95% 0,846-0,882]) (Figura 8). No total, 23,4% das estirpes (n=75) foram consideradas não tipáveis. Em seguida, 19% (n=61) aglutinaram com o soro TB3264 sendo maioritariamente estirpes do tipo *emm* 89, e 17% aglutinaram com o soro T1, sendo estas maioritariamente do tipo *emm*1 (Quadro 2, em anexo).

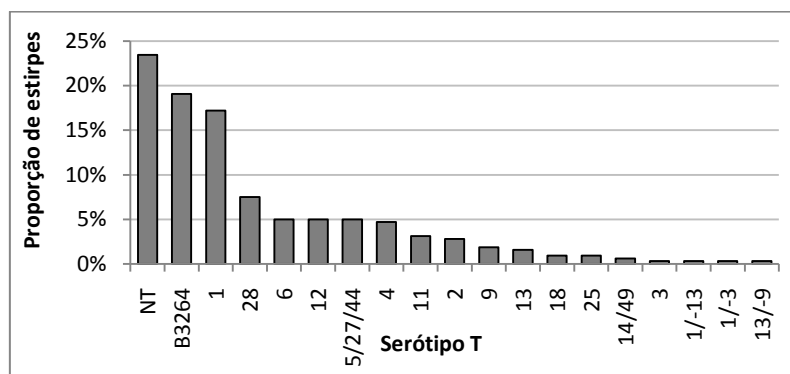


Figura 8. Prevalência das estirpes com os diferentes serótipos T.

3.4. Perfis de toxinas estreptocócicas

Para as 320 estirpes deste estudo foram identificados 50 perfis de toxinas distintos (SID=0,934 [IC 95% 0,922-0,946]) (Quadro 3, em anexo). Em todas, à excepção de uma, detectou-se a presença dos genes *speB* e *speF*. A ausência destes genes nessa estirpe foi confirmada através de hibridação por “Southern blot”. Os genes *smeZ*, *speG*, *speJ*, frequentemente considerados cromossomais, foram detectados em 95,9% (n=307), 94,1% (n=301), e 40,3% (n=129) do total de estirpes, respectivamente (Quadro 4, em anexo). Dos genes codificados em fagos, o mais prevalente foi o *speC* (57,8%, n=185), seguido do *speA* (32,8%, n=105), *ssa* (20,6%, n=66), *speH* (16,3%, n=52) e *speK* (16,3%, n=52), *speI* (14,1%, n=45), *speM* (6,9%, n=22) e *speL* (5,9%, n=19) (Quadro 4, em anexo).

Ao comparar os perfis de toxinas das estirpes dos tipos *emm* mais prevalentes, verificou-se uma consistente presença ou ausência de determinados genes de toxinas em estirpes com o mesmo tipo *emm* (Quadro 3 e 4, em anexo).

Tendo em conta os resultados apresentados no quadro 4, em anexo, a presença do gene *speA* foi detectada apenas em estirpes de 4 tipos *emm* distintos, sendo esta presença, significativa em estirpes dos tipos *emm1*, *emm6* e *emm3*. Em contraste com o gene *speA*, o gene *speC* está disperso por estirpes de vários tipos *emm*. No entanto, em nenhuma das estirpes do tipo *emm3*, foi detectada a presença deste gene. Os genes *speG* e *smeZ*, considerados cromossomais, foram amplamente detectados nas estirpes do estudo. Curiosamente, nenhuma estirpe do tipo *emm4* apresenta o gene *speG* e nenhuma estirpe do tipo *emm2* apresenta o gene *smeZ*. Relativamente ao gene *speJ*, com excepção das estirpes do tipo *emm89*, encontra-se presente em todas as estirpes dos outros tipos *emm* em que foi identificado. O gene *speK* parece ser característico das estirpes do tipo *emm6*, pois foi o único tipo *emm* em que este gene foi detectado em todas as estirpes. A presença do gene *ssa* foi detectada em todas as estirpes dos tipos *emm4* e *emm3*.

Os genes *speH* e *speI* foram ambos detectados em 45 estirpes (14,1%) e considerados significativamente associados a estirpes dos tipos *emm44*, *emm12*, *emm48* e *emm11*, embora tenham sido também detectados em estirpes de outros tipos. O gene *speI* nunca foi detectado na ausência do gene *speH*. A presença conjunta dos genes *speL* e *speM* foi detectada em 19 estirpes (5,9%) e estatisticamente associada a estirpes dos tipos *emm2* e *emm75*. Em 3 estirpes, todas do tipo *emm58*, apenas se detectou o gene *speM*. A ausência do gene *speL* e a presença do gene *speM* foi confirmada por hibridação "Southern blot". Pelo contrário, o gene *speL* nunca foi detectado na ausência do gene *speM*.

3.5. Resistência a antimicrobianos e respectivos génotipos associados.

Todas as estirpes do estudo eram susceptíveis à penicilina, ao linezolid e à vancomicina. Relativamente ao cloranfenicol encontrou-se uma estirpe resistente. À levofloxacina detectaram-se duas estirpes não susceptíveis, cujos resultados foram confirmados através de E-teste (CIM=6 e 3 mg/mL).

A resistência aos macrólidos foi detectada em 10.3% do total de estirpes analisadas (n=33). Durante os anos incluídos no estudo verificou-se uma diminuição na proporção de estirpes resistentes (Figura 9), porém sem significância estatística (teste de Cochran-Armitage, p=0.18). No primeiro ano (2003) foi quando se verificou o valor mais elevado de resistência (29,4%). Em 2004 ocorreu uma grande diminuição (12,5%), seguida de um aumento para 19,6% em 2005. De 2005 para 2007 os valores decresceram (19,6% em 2005, 16,7% em

2006, 5,1% em 2007), sendo esta diminuição mais acentuada de 2006 para 2007. Entre 2007 e 2008 houve uma estagnação (5,1% em 2007, 5,2% em 2008) e em 2009 voltou-se a verificar uma descida na resistência (3,3%) (Figura 9). Embora a diminuição dos valores ao longo dos anos não tenha sido significativa pelo teste de Cochran-Armitage, se utilizarmos o teste de Fisher para comparar os períodos de 2003 a 2006 e 2007 a 2009, verifica-se que a diminuição foi significativa (teste de Fisher: $p < 0.0001$). Esta discordância é provavelmente devida ao reduzido número de estirpes nos primeiros anos de estudo, nomeadamente em 2003 e 2004, que se traduz num elevado erro associado. Este factor pode também ser a explicação para o valor irregularmente baixo de resistência em 2004, relativamente a 2003 e 2005 (Figura 9). De facto, a diminuição dos valores de 2003 para 2004 e o subsequente aumento de 2004 para 2005 não foram significativos (teste de Fisher: $p = 0,62$; $p = 1,00$, respectivamente).

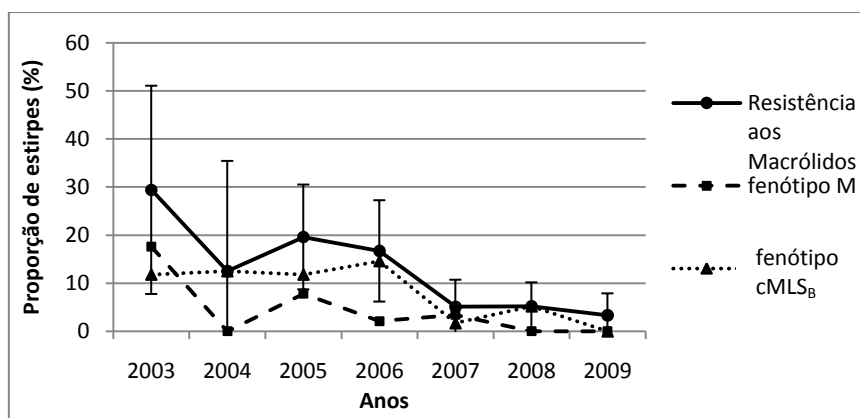


Figura 9. Resistência à eritromicina e respectivos fenótipos associados.

Das 33 estirpes resistentes aos macrólidos, 22 apresentaram o fenótipo cMLS_B (66,7%) e 11 apresentaram o fenótipo M (33,7%). O fenótipo cMLS_B, com excepção nos anos 2003 e 2007, foi o mais comum (Figura 9). Entre 2003 e 2006 as alterações registadas para os valores de resistência aos macrólidos foram sobretudo devido às alterações no número de estirpes de fenótipo M. A partir de 2006, o número de estirpes de fenótipo cMLS_B foi o principal determinante na variação da resistência total (Figura 9). Em todas as estirpes de fenótipo cMLS_B foi detectada a presença do gene *erm*(B). Na população bacteriana em estudo, estas estirpes são maioritariamente dos tipos *emm*11 ou *emm*28. Das 11 estirpes que apresentavam fenótipo M, detectou-se em 10, a presença do gene *mef*(A). Noutra foi detectada a presença de *mef*(E), que curiosamente corresponde também à única estirpe resistente ao cloranfenicol. A resistência aos macrólidos por *mef*A (fenótipo M) parece não ser característica de nenhum tipo *emm* específico, estando distribuída por estirpes do tipo *emm*1, *emm*4, *emm*9, *emm*12, *emm*18 e *emm*89 (Quadro 2, em anexo).

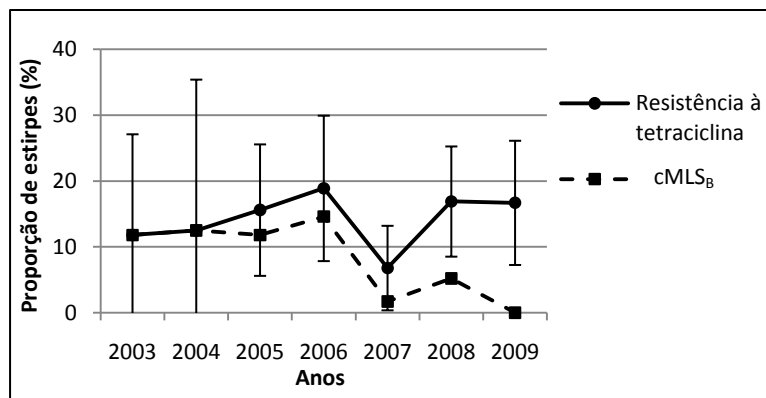


Figura 10. Resistência à tetraciclina.

A resistência à tetraciclina foi observada em 47 estirpes (14,7%). No total dos anos não se verificou nenhuma tendência significativa na evolução dos valores (teste de Cochran-Armitage, $p=0,48$) (Figura 10). A diminuição dos valores de 2006 para 2007 (teste de Fisher: $p=0,08$), assim como o aumento em 2008 (teste de Fisher: $p=0,12$) não foram estatisticamente significativos. Na maioria destas estirpes, a resistência à tetraciclina foi devida à presença exclusiva do gene *tet(M)* (89,4%). Em 3 estirpes para além da presença do gene *tet(M)* foi também detectada a presença do gene *tet(L)* e em duas estirpes detectou-se apenas a presença do gene *tet(O)* (Quadro 2, em anexo).

Das 47 estirpes resistentes à tetraciclina, 12 apresentaram também resistência aos macrólidos: 10 de fenótipo cMLS_B e 2 de fenótipo M. Os genes *erm(B)* (fenótipo cMLS_B) e o gene *tet(M)* foram detectados em conjunto em todas as estirpes dos tipos *emm11* e *emm76*. Embora se tenha detectado o gene *erm(B)* em 70,6% das estirpes de *emm28*, apenas uma foi também resistente à tetraciclina.

Relativamente à bacitracina, detectaram-se 12 estirpes resistentes, todas do tipo *emm28* e com fenótipo cMLS_B.

3.6. Electroforese em campo pulsado

O dendrograma obtido com base nos perfis de macro-restrição das 320 estirpes por PFGE é constituído por 17 grupos ($n \geq 5$ estirpes; coeficiente de Dice $\geq 80\%$) (SID=0,916 [IC95% 0,899-0,933]) que incluem 85% do total das estirpes ($n=272$) (Figura 11). As 48 estirpes restantes (15%), ou apresentaram perfis únicos ou estavam incluídas em grupos com menos de 5 estirpes. Os dois maiores grupos definidos por PFGE, A e B, em concordância com a tipagem *emm*, são principalmente constituídos por estirpes TB3264/*emm89* e T1/*emm1*, respectivamente (Quadro 2). Apenas 5 dos 17 grupos de PFGE principais foram homogêneos no tipo *emm* (B, C, F, G e N) (Quadro 2). Todos os outros incluíram estirpes com pelo menos dois tipos *emm* distintos ainda que um fosse sempre predominante.

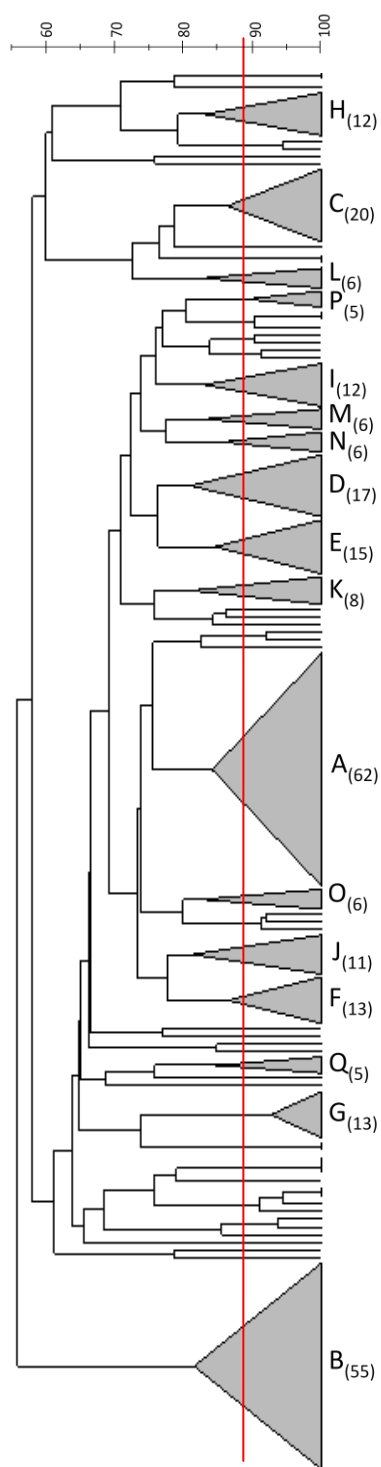


Figura 11. Dendrograma obtido no software Bionumerics (coeficiente de Dice com optimização de 1% e tolerância 1,5%), através do método UPGMA. Os grupos são definidos como conjuntos ≥ 5 estirpes com semelhança nos perfis $\geq 80\%$.

Quadro 2. Grupos obtidos por comparação dos perfis de PFGE, e informação das estirpes que os incluem.

Grupos de PFGE ^a	emm-T (nº de estirpes)	genótipo Macrólidos	Perfil de SAg ^b (nº de estirpes)
A(62)	89-B3264(57) 89-NT (3) 75-25(1)	<i>mef(A)</i> (1)	19(3), 20(14), 22(35), 34(10)
B(55)	1-1(54) 1-NT(1)	<i>mef(A)</i> (2) <i>erm(B)</i> (1)	2(11), 7(42), 43(1), 51(1)
C(20)	6-6(15) 6-NT(5)		1(17), 6(1), 37(2)
D(17)	4-4 (13) 44-5/27/44 (2) 77-13(1) 90-13(1)		9(2), 17(12), 20(1), 30(1)
E(15)	44-5/27/44 (12) 44-NT (1) 4-4 (1) 75-NT (1)		24(9), 27(1), 28(1), 30(1), 46(3)
F(13)	28-28 (12) 28-NT (1)	<i>erm(B)</i> (11) <i>erm(B)</i> (1)	15(1), 24(5), 20(7)
G(13)	3-NT (13)		5(11), 53(2)
H(12)	12-12 (6) 12-NT (3) 76-12 (2) 94-B3264(1)	<i>erm(B)</i> (2)	12(6), 25(5), 26(1)
I(12)	64-NT (2) 64-3 (1) 71-9 (2) 58-NT (1) 68-NT (1) 74-NT (1) 75-NT (1) 87-28 (1) st1325-NT (1) StD432-NT (1)		2(1), 20(1), 26(1), 27(1), 34(5), 42(2), 49(1)
J(11)	48-NT(6) 48-28(1) 28-NT (1) 89-B3264(1) st6735-1/3(1) stD633-NT(1)		3(1), 12(4), 20(2), 22(3), 31(1)
K(8)	2-2(7) 81-12(1)		21(1), 23(5), 36(1), 48(1)
L(6)	11-NT(3) 11-11(2) 80-11(1)	<i>erm(B)</i> (3) <i>erm(B)</i> (2)	4(1), 12(4), 34(1)
M(6)	18-18(3) 71-NT(1) 73-13(1) 9-9(1)	<i>mef(A)</i> (1)	3(3), 7(1), 25(1), 29(1)
N(6)	87-28(5) 87-NT(1)		2(1), 13(1), 15(3), 27(1)
O(6)	28-12(3) 22-2(2) 43-NT(1)		8(1), 10(1), 16(1), 18(3)
P(5)	22-12(3) 2-2(1) 87-28(1)	<i>erm(B)</i> (2)	14(2), 16(1), 23(1), 40(1)
Q(5)	118-13(2) 118-1(1) 118-NT(1) 44-11(1)		22(1), 32(2), 34(1), 41(1)

^a As designações dos grupos corresponde a letras atribuídas arbitrariamente e ao número de estirpes em subscripto.

^b ver quadro 3, em anexo.

Relativamente aos perfis de toxinas, não existem grupos de PFGE homogêneos. Embora existisse frequentemente um perfil predominante, todos os grupos são constituídos por estirpes com vários perfis distintos.

Das 33 estirpes resistentes aos macrólidos, apenas 26 se encontram em grupos definidos por comparação dos perfis de PFGE: 22 de fenótipo cMLS_B e 4 de fenótipo M. As restantes, ou apresentam perfis únicos ou estão em grupos com menos de 5 estirpes. As estirpes de fenótipo cMLS_B [*erm*(B)] foram principalmente agrupadas nos grupos F e L, que por sua vez eram maioritariamente constituídos por estirpes T28/*emm*28 e T11/*emm*11, respectivamente. Em contraste, não existe nenhum grupo de PFGE constituído maioritariamente por estirpes de fenótipo M [*mef*(A)], estando estas 4 estirpes dispersas em 3 grupos, nomeadamente o A, o B e o M (Quadro 2).

3.7. Comparação dos métodos de tipagem.

A determinação dos coeficientes de Wallace permitiu a análise e comparação dos métodos utilizados. O método com maior capacidade de prever o tipo *emm* é o PFGE ($W_{\text{PFGE} \rightarrow \text{emm}} = 0,922$ [0,892-0,953]). O inverso, também se verifica para a previsão do grupo de PFGE ($W_{\text{emm} \rightarrow \text{PFGE}} = 0,921$ [0,890-0,953]). O tipo *emm*, não é um bom indicador do perfil de toxinas ($W_{\text{emm} \rightarrow \text{SAg}} = 0,5$ [0,433-0,566]) como também não o é o grupo de PFGE ($W_{\text{PFGE} \rightarrow \text{SAg}} = 0,484$ [0,417-0,551]). O tipo T é consideravelmente pior que qualquer dos dois métodos anteriores para estimar o perfil de toxinas ($W_{\text{T} \rightarrow \text{SAg}} = 0,288$ [0,247-0,329]). A capacidade do perfil de toxinas em prever o tipo *emm* ($W_{\text{SAg} \rightarrow \text{emm}} = 0,662$ [0,593-0,731]) é semelhante à capacidade de prever o grupo de PGFE ($W_{\text{SAg} \rightarrow \text{PFGE}} = 0,640$ [0,570-0,710]). Do mesmo modo, os melhores métodos para preverem o serótipo T são a tipagem *emm* ($W_{\text{emm} \rightarrow \text{T}} = 0,883$ [0,830-0,935]), e a determinação dos grupos de PFGE ($W_{\text{PFGE} \rightarrow \text{T}} = 0,845$ [0,788-0,903]). A determinação do perfil de toxinas é consideravelmente pior que qualquer dos métodos anteriores ($W_{\text{SAg} \rightarrow \text{T}} = 0,616$ [0,548-0,685]).

4. DISCUSSÃO

Com este trabalho caracterizou-se a população de *S. pyogenes* responsável por infecções da pele e tecidos moles. O estudo englobou 320 estirpes recolhidas em vários hospitais do país, durante o período de 2003 a 2009, a partir de pus de lesões cutâneas como feridas e abscessos. Para todas as estirpes foram determinados os tipos *emm*, serótipos T, perfis de toxinas e perfis de macro-restrição obtidos por PFGE. Também se determinaram os níveis de susceptibilidade a vários antimicrobianos, assim como os respectivos genótipos de resistência associados.

Os indivíduos de que foram recolhidas as 320 estirpes estudadas correspondem a uma população em que 48.1% (n=154) são indivíduos do sexo feminino e 51.9% (n=166) são do sexo masculino. Este resultado é consistente com um estudo europeu com estirpes invasivas, em que 53% dos indivíduos também eram do sexo masculino (Lamagni *et al.*, 2008). No nosso estudo, embora não tenha sido significativo, enquanto em crianças e adultos as estirpes foram recolhidas maioritariamente de indivíduos do sexo masculino, em idosos as estirpes foram recolhidas sobretudo de indivíduos do sexo feminino. Este facto pode ter sido devido à população idosa em Portugal ser constituída maioritariamente por mulheres. De acordo com os dados do Instituto Nacional de Estatística (www.ine.pt), em Portugal, entre 2003 e 2009, a proporção homens/mulheres em indivíduos com menos de 65 anos é de 0,99 e em idosos é de 0,72.

Relativamente à caracterização do tipo *emm*, estirpes dos tipos *emm89* e *emm1* foram as mais prevalentes. Para avaliar o impacto destas na diversidade total da população comparou-se para cada ano a prevalência destas estirpes com o índice de diversidade de Simpson de todos os tipos *emm* (Figura 6, ponto 3.2.1). Verificou-se que entre 2006 e 2008 a diminuição do índice de diversidade de Simpson, ainda que ligeira, é concomitante com o aumento de estirpes destes tipos *emm*. Nestes anos, as estirpes dos tipos *emm89* e *emm1* podem ter beneficiado de alguma vantagem adaptativa ou aumentaram em prevalência apenas devido às flutuações naturais nas composições das populações microbianas. Em 2009, verificou-se uma diminuição não significativa no número destas estirpes o que justifica o aumento de diversidade dos tipos *emm* na população. Normalmente, o aumento do índice de diversidade de Simpson numa amostra é devido ao aparecimento de estirpes de diferentes tipos *emm*. Porém, se não se verificar alteração do número de estirpes ou do número de tipos *emm* identificados, o aumento deste índice numa amostra pode resultar do aumento no número de estirpes dos tipos *emm* menos prevalentes e subsequente diminuição do número de estirpes dos tipos *emm* mais prevalentes. As flutuações observadas neste estudo parecem estar

relacionadas com a segunda explicação. Em 2009 o número de estirpes é semelhante ao verificado em 2008 e não há alteração no número de tipos *emm* (23 em 2008 e 23 em 2009). O aumento da diversidade resulta principalmente da diminuição das estirpes dos tipos *emm89*, *emm1* e *emm6* com consequente aumento de estirpes dos tipos *emm12*, *emm4* e *emm58* (informação não apresentada). Uma hipótese explicativa para este fenómeno, à semelhança do discutido acima para os tipos *emm1* e *emm89*, é que estirpes dos tipos *emm12*, *emm4* e *emm58* tenham adquirido alguma vantagem que lhes permitiu competir com as estirpes dos tipos *emm* mais prevalentes. Frequentemente, estirpes dos tipos *emm12* e *emm4* estão associadas com a resistência aos macrólidos (Silva-Costa *et al.*, 2008), mas neste caso isso não se verifica.

De igual modo ao que se verificou em Portugal no período estudado, em Itália, para estirpes invasivas recolhidas entre 1994 a 2002, estirpes do tipo *emm89* seguidas de estirpes do tipo *emm1* foram as mais prevalentes (Creti *et al.*, 2007). Na Suécia, no período entre 2002 e 2004, também em estirpes invasivas, estirpes do tipo *emm89* foram também as mais prevalentes (Darenberg *et al.*, 2007). Em Portugal, durante o período de 2000 a 2005 para estirpes invasivas, as estirpes do tipo *emm89* foram apenas as 6^{as} mais prevalentes entre as estirpes estudadas (6.3%), enquanto as estirpes do tipo *emm1* foram as mais frequentes (20.6%) (Friães *et al.*, 2007).

A vacina 26-valente já desenvolvida e que está em fase de ensaios clínicos foi construída com base nos tipos *emm* mais prevalentes na América do Norte. Teoricamente, esta vacina iria prevenir 84,5% das faringites, 92,5% das infecções associadas a febre reumática e 87,6% das infecções invasivas, incluindo 100% das fasciites necrozantes (McNeil *et al.*, 2005; Shulman *et al.*, 2009). Com base no estudo realizado, a implementação desta vacina em Portugal para todas as faixas etárias, poderia apenas prevenir 67,8% das infecções da pele e tecidos moles por GAS. Esta diferença de valores entre a América do Norte e Portugal pode ser explicada pela diferente distribuição de estirpes de diferentes tipos *emm*, que como se sabe, tende a sofrer modificações consoante a região e o período estudado (Steer *et al.*, 2009).

Também se analisou a relação entre estirpes dos tipos *emm* mais prevalentes e as idades dos indivíduos de onde estas foram recolhidas. Embora pareça existir algumas diferenças, como no caso de estirpes do tipo *emm28* que praticamente não foram detectadas em crianças, estas não são significativas. De facto, na maioria dos artigos publicados que analisam esta relação, também não se consegue definir associações significativas (Ekelund *et al.*, 2005). Porém, um estudo europeu, que inclui estirpes de pele e tecidos moles, descreveu

uma maior prevalência de estirpes do tipo *emm28* em doentes dos 30 aos 39 anos e dos 70 aos 79 (Luca-Harari *et al.*, 2009) o que não foi confirmado neste estudo.

Relativamente aos serótipos T, há muito tempo que está descrita uma associação com os diferentes tipos *emm* (Johnson *et al.*, 1993). De facto, segundo o nosso estudo, a determinação do tipo *emm* é o melhor método para prever o serótipo T, seguido da determinação dos perfis de PFGE. O número de estirpes não tipáveis (23,45%) foi superior aos 14% identificados em estirpes invasivas durante 2000-2005 em Portugal (Friães *et al.*, 2007). À semelhança do que aconteceu quando se utilizava o método de aglutinação para a determinação da proteína M, este factor tem sido alvo de diversificação, tornando impossível a caracterização de todas as estirpes apenas com os soros existentes. Devido a este problema tem-se explorado novos métodos que permitam avaliar a variabilidade da proteína T, nomeadamente o desenvolvimento de um PCR que permita distinguir diferentes tipos T, ou a sequenciação da região genética onde esta proteína está codificada, designada “fibronectin collagen T antigen” (FCT). A região FCT difere entre estirpes com diferentes proteínas T e consequentemente em estirpes com diferentes proteínas M (Köller *et al.*, 2010). Nesta região estão também codificadas outras proteínas com capacidade de ligação à fibronectina e cuja função pode ser decisiva no estabelecimento da infecção (Podbielski *et al.*, 2007). Embora já existam estudos que utilizam a região FCT como marcador epidemiológico (Köller *et al.*, 2010), é necessário elucidar qual a relação efectiva com os tipos T definidos serologicamente, assim como a capacidade deste factor para discriminar estirpes consideradas relacionadas por outros métodos de tipagem.

Relativamente à terapêutica, a penicilina continua a ser o principal antibiótico utilizado em infecções por *S. pyogenes*. *In vitro*, nunca foram detectadas estirpes de *S.pyogenes*, resistentes à penicilina o que também se verificou neste estudo. Em doentes alérgicos aos β -lactâmicos, os macrólidos e as lincosamidas são as alternativas mais frequentes para o tratamento das infecções por GAS. Segundo o nosso estudo, apesar de não ser estatisticamente significativo, houve uma diminuição nos valores de estirpes resistentes aos macrólidos. Com uma média total de 10,3% de resistência, os valores variaram entre 29,4 % e 3,3% em 2003 e 2009, respectivamente. O valor médio foi semelhante ao que se verificou em estirpes faríngeas recolhidas em Portugal entre 2004 e 2006 (13.2%) (Silva-Costa *et al.*, 2008). Neste período já se verificava uma diminuição descrita desde 1998, quando se detectou 34,6 % de resistência à eritromicina (Silva-Costa *et al.*, 2005). A diminuição na resistência também tem sido descrita noutros países. Em Espanha, nomeadamente Barcelona, a resistência passou de 34,2% em 2001-2004 para 7,4% em 2007-2008 (Ardanuy *et al.*, 2010).

Por outro lado, em contraste ao verificado em Portugal e Espanha, na Grécia houve um aumento na resistência aos macrólidos entre 2003 e 2006. Este aumento foi explicado pelo elevado consumo de macrólidos durante esses anos (Michos *et al.*, 2009). Como este, muitos estudos relacionam os níveis de consumo de macrólidos com a curva de resistência à eritromicina (García-Rey *et al.*, 2002; Gagliotti *et al.*, 2006; Bergman *et al.*, 2004). Em Portugal esta relação não se verificou. Entre 2003 e 2009, embora se tenha verificado a diminuição da resistência em estirpes responsáveis por infecções da pele e tecido moles, o consumo de macrólidos, segundo os dados disponíveis do infarmed (<http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/>), manteve-se estável (Figura 12). Uma explicação para a diminuição da resistência pode ser o desenvolvimento de imunidade pela população humana contra um número limitado de antígenos T e proteínas M associadas às estirpes resistentes (Silva-Costa *et al.*, 2005).

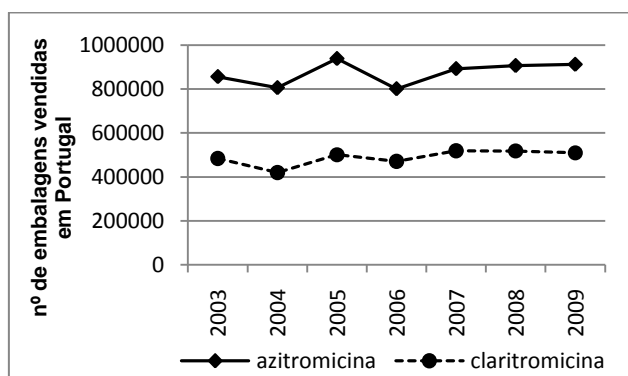


Figura 12. Consumo de macrólidos em Portugal. Valores de acordo com relatórios do Infarmed.

Um grupo no Japão propôs que o decréscimo dos valores de resistência aos macrólidos também pode ser devido ao aumento do uso de fluoroquinolonas. Ao induzirem a resistência à levofloxacina, os mutantes perderam os genes *mef(A)* ou *erm(TR)* (Billal *et al.*, 2009). Poderia igualmente ser verdade em Portugal se houvesse um claro aumento na resistência às fluoroquinolonas, porém, só foram identificadas duas estirpes não susceptíveis, ambas TB3264/*emm89* e isoladas em 2009. Ao contrário do que se verificou no nosso estudo a resistência às fluoroquinolonas (levofloxacina) tem sido associada a estirpes do tipo *emm6* (Malhotra-Kumar *et al.*, 2009; Montes *et al.*, 2010; Pires *et al.*, 2010). No entanto, experiências *in vitro* demonstraram que todos os tipos *emm* estão igualmente propensos à indução da resistência às fluoroquinolonas (Billal *et al.*, 2007).

Em casos de infecções graves da pele e tecidos moles, de modo a inibir a produção de toxinas, a clindamicina é utilizada em conjunto com β -lactâmicos (Allen *et al.*, 2010). Consequentemente, embora o fenótipo M seja importante, estirpes de fenótipo cMLS_B, ao apresentarem resistência a 3 classes de antibióticos, limitam mais as possibilidades

terapêuticas. No estudo realizado, 66,7% das estirpes resistentes aos macrólidos são de fenótipo cMLS_B. À semelhança do que se verificou em Portugal e Espanha para estirpes recolhidas de faringites, as estirpes de fenótipo cMLS_B são principalmente dos tipos *emm28* e *emm11* (Silva-Costa *et al.*, 2008; Perez-trallero *et al.*, 2007).

Relativamente às estirpes do tipo *emm28*, todas as que apresentavam fenótipo MLS_B, eram também resistentes à bacitracina. Estas estirpes são as responsáveis pela limitação do teste susceptibilidade a este antibiótico como método para diferenciação de *S. pyogenes* de outros estreptococos β-hemólíticos. Isto já foi descrito anteriormente em Espanha (Perez-Trallero *et al.*, 2004), Portugal (Silva-Costa *et al.*, 2006), França (Malhotra *et al.*, 2003) e Bélgica (Mihaila-Amrouche *et al.*, 2004).

No dendrograma obtido pela análise dos perfis de PFGE, as estirpes de fenotipo cMLS_B estão principalmente agrupadas em dois grupos (F e L), maioritariamente constituídos por estirpes dos tipos *emm28* e *emm11*, respectivamente. No entanto, as estirpes de fenotipo M estão dispersas por vários grupos e apresentam vários tipos *emm* (Figura 11 e Quadro 2, ponto 3.5). Tendo em conta que 91% das estirpes com fenótipo M apresentavam o gene *mef(A)*, a observação anterior está de acordo com um estudo que alerta para a grande mobilidade do elemento genético que contem o gene *mefA* (Kataja *et al.*, 1999). A única estirpe com este fenótipo que apresenta o gene *mef(E)* corresponde à única que é resistente ao cloranfenicol. Embora não se tenha encontrado nenhum estudo relacionado, esta observação sugere uma possível associação entre o gene *mef(E)* e os genes que conferem resistência ao cloranfenicol.

É importante referir que em nenhuma das estirpes resistentes aos macrólidos se detectou mais de que um determinante de resistência a este antimicrobiano [*erm* ou *mef*]. Porém, já foi descrita a presença de ambos os mecanismos, metilação e bomba de efluxo, na mesma estirpe (Silva-Costa *et al.*, 2006).

Contrariamente ao que se verifica para os macrólidos, os níveis de resistência à tetraciclina permaneceram uniformes ao longo dos anos. A resistência à tetraciclina é considerada um importante cofactor na selecção da resistência à eritromicina (Nielson *et al.*, 2004). O paralelismo observado, entre resistência à tetraciclina e o número de estirpes de fenótipo MLS_B (Figura 10, ponto 3.4) pode ser explicado pela disseminação de elementos genéticos que resultam da inserção do gene *erm(B)* em transposões conjugativos da família Tn916 que contêm o gene *tet(M)* (Brenciani *et al.*, 2007). Esta associação já foi observada em Portugal para estirpes faríngeas recolhidas no período entre 1998 e 2003 (Silva-Costa *et al.*, 2005). No entanto, a partir de 2006 os valores de resistência detectados para a tetraciclina foram superiores aos verificados para os macrólidos. Como a diminuição da resistência aos macrólidos foi devido à diminuição de ambos os fenótipos e não só do fenotipo M, este facto

pode ser explicado pelo aumento de estirpes resistentes à tetraciclina que são susceptíveis aos macrólidos, ou que se tornaram susceptíveis, por perda do gene *erm(B)*.

Também está descrita uma relação entre a presença de *tet(O)* e os genes *mef(A)* ou *erm(A)* (Giovanetti *et al.*, 2003), porém, ambas as estirpes onde se detectou este gene de resistência à tetraciclina (T12/*emm50*; T13/*emm50*) são susceptíveis aos macrólidos.

A resistência ao cloranfenicol detectada numa estirpe é concordante com os 0.6% detectados num estudo na Grécia (Michos *et al.*, 2009). Como a estirpe em questão foi recolhida em 2005 e nos anos seguintes não houve mais nenhuma estirpe resistente, significa que provavelmente as estirpes com estas características não se estão a expandir.

Como já foi descrito, a técnica de PFGE consiste na utilização de enzimas de corte raro para obter perfis que, após comparados, permitem estabelecer relações entre estirpes. Segundo os resultados do quadro 2 (ponto 3.5), a maioria dos grupos obtidos por PFGE são constituídos principalmente por estirpes de um determinado tipo *emm*. Isto justifica que a comparação dos perfis de PFGE seja o melhor método para prever o tipo *emm* e vice-versa. Recorreu-se a esta técnica pois foi sugerido que a tipagem *emm* por si só não é suficiente para discriminar diferentes estirpes de GAS (Carrico *et al.*, 2006). De facto, é possível a observação de estirpes do mesmo tipo *emm* em diferentes grupos de PFGE, como por exemplo estirpes do tipo *emm87* nos grupos I, N e P ou estirpes do tipo *emm75* nos grupos A, E e I.

Os superantigénios em GAS são frequentemente associados às patologias mais severas destes microrganismos. A ideia de que a severidade de infecção está relacionada com a presença destes genes, tem sido alvo de vários estudos. Actualmente são conhecidos 11 genes codificantes de SAgS, dos quais 9 são associados a bacteriófagos. Estes elementos são frequentemente detectados nos genomas de estirpes de GAS sequenciadas, sendo muitas polilissogénicas (Beres *et al.*, 2002). Atribui-se à transferência horizontal destes fagos e dos factores de virulência associados, o aparecimento e disseminação de clones potencialmente virulentos (Vlaminckx *et al.*, 2007). A detecção destes genes como método de tipagem epidemiológica tem-se revelado extremamente discriminatório em relação a outros métodos, nomeadamente tipagem *emm* (Lintges *et al.*, 2010; Maripuu *et al.*, 2008; Meisal *et al.*, 2010), como se pôde comprovar neste estudo.

Como já foi referido, as proteínas codificadas pelos genes *speB* e *speF*, embora tenham sido consideradas toxinas, não o são. O gene *speB* codifica uma protease e o gene *SpeF* uma DNase. Neste estudo, estes genes estão ausentes apenas numa estirpe do tipo *emm1*. A sua ausência foi confirmada por hibridação “Southern blot”. Estas deleções já foram anteriormente encontradas em estirpes caracterizadas no Instituto de Microbiologia e o facto

de terem sido recolhidas de infecções, significa que estas mutações provavelmente não comprometem a capacidade infecciosa.

Sem se considerar os genes *speB* e *speF*, os genes codificantes de SAg mais prevalentes correspondem ao gene *smeZ* e ao gene *speG*. Em concordância com os resultados obtidos por Meisal *et al.* (2010) e tendo em conta apenas as estirpes dos tipos *emm* mais prevalentes, o gene *speG* está ausente apenas em estirpes do tipo *emm4*, enquanto o gene *smeZ* está ausente em todas as estirpes do tipo *emm2* e em algumas do tipo *emm44* (Quadro 4, em anexo) (Meisal *et al.*, 2010). Estes resultados defendem a hipótese de que estes dois genes são cromossomais. Estudos anteriores detectaram estes genes em 100% das estirpes (Proft *et al.*, 2000; Proft *et al.*, 2003). A ausência do gene *speG* em estirpes do tipo *emm4* e a ausência do gene *smeZ* em estirpes dos tipos *emm2* e *emm44* poderia ser explicada devido a polimorfismos ainda não descritos nos locais de ligação dos primers (Proft *et al.*, 2000). Porém, Ferreti *et al.* (2001) através de um estudo de sequenciação genómica, mostrou não haver associação entre estes genes e elementos móveis. Estes genes podem ter pertencido inicialmente a bacteriófagos e devido à existência de uma barreira à sua disseminação, como por exemplo a proteína M de estirpes dos tipos *emm2* e *emm44*, não ter sido possível a entrada destes elementos.

Também neste estudo o gene *speJ* foi detectado em 40,3% das estirpes, sobretudo em estirpes dos tipos *emm1*, *emm44*, *emm28* e *emm87*, o que é consistente com outros trabalhos (Commons *et al.*, 2008; Meisal *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2006). Porém, estes resultados contrastam com os resultados obtidos por Proft *et al.* (2003), que detectou o gene *speJ* em 100% das estirpes estudadas, sugerindo que este superantígeno é também cromossomal. Esta discrepância não foi devida a uso de diferentes primers, pois os resultados obtidos por Commons *et al.* (2008) mantiveram-se quando se repetiu os PCRs com os primers utilizados por Proft *et al.* (2003). Provavelmente as estirpes analisadas por Proft *et al.* (2003) não correspondiam a uma amostra representativa da população.

Relativamente aos genes associados a bacteriófagos, o gene *speC* foi o mais prevalente, seguido do gene *speA*. As duas toxinas codificadas por estes genes são das mais estudadas devido à frequente associação ao síndrome de choque tóxico estreptocócico (Hauser *et al.*, 1991). O gene *speC* foi maioritariamente detectado em estirpes dos tipos *emm89*, *emm6*, *emm4*, *emm28* e *emm48*, consistente com os resultados obtidos por Rivera *et al.*, (2006). O gene *speA*, como noutros estudos, está presente sobretudo em estirpes dos tipos *emm1*, *emm6* e *emm3* (Commons *et al.*, 2008; Rivera *et al.*, 2006; Meisal *et al.*, 2010). A seguir ao gene *speA*, o gene codificante de SAg mais prevalente foi o gene *ssa*, que foi detectado em estirpes do tipo *emm44*, *emm4*, *emm3* e *emm87*. A presença do gene *speK* foi associada a

estirpes dos tipos *emm6*, *emm28* e *emm3* consistentemente com estudos anteriores (Commons *et al.*, 2007; Meisal *et al.*, 2010).

A maioria das estirpes em que se detectou o gene *speH*, também se detectou o gene *speI*. Estes genes, tal como verificado neste estudo, são frequentemente descritos em conjunto em estirpes de *emm44*, *emm12*, *emm48* e *emm11* (Meisal *et al.*, 2010). Esta associação é explicada por estes genes apresentarem posições adjacentes no mesmo bacteriófago (ϕ 370.2) (Ferreti *et al.*, 2001). Porém, a ausência do gene *speI* em 7 estirpes com o gene *speH*, sugere que ocorre perda do gene *speI* durante a integração no genoma ou que existe outro fago que possui apenas o gene *speH*.

Os genes *speL* e *speM*, excepto em 3 estirpes, foram sempre detectados em conjunto. À semelhança do que se verifica para os genes *speI* e *speH*, os genes *speL* e *speM* apresentam posições adjacentes no mesmo bacteriófago (ϕ speL/speM) (Smoot *et al.*, 2002). Nas 3 estirpes em que não se verificou esta associação, apenas se detectou o gene *speM*. Curiosamente as 3 estirpes apresentam o tipo *emm58*. No, entanto, esta característica não é comum a todas estirpes do tipo *emm58* porque também foi detectada outra estirpe do tipo *emm58* que nem sequer apresenta nenhuma destas toxinas. As possíveis explicações para este fenómeno são a perda do gene *speL* durante a integração no genoma ou a existência de um fago apenas com o gene *speM*. Esta situação, de presença do gene *speM* e ausência do gene *speL* está descrita em 3 estudos (Maripuu *et al.*, 2008; Meisal *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2006). Em dois destes, os primers utilizados para o gene *speM* podem ter hibridado com o gene *speK* pelo que o suposto gene *speM* pode ser, de facto, o gene *speK* (Maripuu *et al.*, 2008; Rivera *et al.*, 2006).

Como já foi referido, estirpes com o mesmo tipo *emm*, normalmente apresentam um perfil de toxinas igual ou semelhante (Quadro 4, em anexo). Esta associação pode ser explicada pela influência directa ou indirecta da proteína M na entrada dos bacteriófagos, nomeadamente os que codificam superantigénios (Mylvaganam *et al.*, 2000). Mesmo assim, o perfil de toxinas apresenta uma capacidade significativamente melhor de prever o tipo *emm* do que o contrário. Ou seja, é mais provável duas estirpes com igual perfil de toxinas terem o mesmo tipo *emm*, que duas estirpes do mesmo tipo *emm* apresentarem igual perfil de toxinas.

À semelhança do que se verifica para o perfil de toxinas em relação ao tipo *emm*, o mesmo se verifica em relação ao grupo de PFGE, ou seja o perfil de toxinas é um melhor indicador do grupo de PFGE que o inverso. Isto é explicado pela existência, no mesmo grupo de PFGE, de estirpes com pelo menos dois perfis de toxinas distintos, embora normalmente exista um predominante.

A análise dos perfis de toxinas associados às estirpes dos tipos *emm89* e *emm1*, não permite explicar a maior prevalência destas estirpes. Não são as que apresentam maior número de genes de toxinas e também não apresentam nenhum padrão característico comum a ambas que permita a sua distinção de estirpes de outros tipos *emm* menos prevalentes.

A ausência de um perfil de toxinas característico que permita explicar a razão porque algumas estirpes são mais prevalentes, também se verifica na maioria dos estudos que analisam o perfil de SAgS entre estirpes invasivas e não invasivas com o objectivo de esclarecer a razão da existência de infecções tão diversas (Rivera *et al.*, 2006). Quando se detectam diferenças, os autores defendem que estas são principalmente devido à associação das toxinas com os diferentes tipos *emm* que por vezes, diferem entre estirpes invasivas e não invasivas (Ekelund *et al.*, 2005). De facto, ao comparar os perfis das estirpes de pele e tecidos moles com outras estirpes caracterizadas no Instituto de Microbiologia, parece que estirpes com o mesmo tipo *emm* apresentam um perfil semelhante, independentemente da sua origem (informação não apresentada).

Já foram avançadas hipóteses para explicar a diversidade e severidade das infecções independentemente da presença ou expressão de determinados genes que codificam factores de virulência de GAS. Chatellier *et al.* (2000) demonstraram que estirpes M1T1 geneticamente semelhantes e com igual perfil de toxinas são responsáveis por infecções desde faringite a infecções invasivas. Este resultado alerta para a importância das características do hospedeiro no desenvolvimento da infecção por GAS. Kotb *et al.* (2002) verificaram que alguns superantigénios são preferencialmente apresentados por determinados alelos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II. Este fenómeno significa que a variação alélica do MHC no hospedeiro pode influenciar a ligação dos superantigénios e consecutivamente as diferentes susceptibilidades dos indivíduos à infecção por estreptococos do grupo A. Isto ocorre devido à diferente magnitude da resposta inflamatória aos mesmos SAg quando estes são apresentados por diferentes alelos de MHC classe II (Chatellier *et al.*, 2000). Neste estudo não foram avaliadas estas características dos indivíduos que apresentaram infecções.

6. CONCLUSÃO

A caracterização de estirpes de *S. pyogenes* responsáveis por infecções da pele e tecidos moles revelou a existência de uma população bacteriana com uma elevada diversidade. A maior prevalência de estirpes dos tipos *emm89* e *emm1* em infecções de pele e tecidos moles, indica que em Portugal durante os anos 2003 a 2009, estas estirpes são as que apresentam uma maior capacidade para se disseminar e estabelecer infecção.

A prevenção de cerca de 68% das infecções de pele e tecidos moles pela vacina 26-valente pode não justificar a sua implementação. O mais adequado, poderia ser em conjunto com resultados de estirpes de outras origens, proceder a uma alteração dos tipos de proteína M incluídos na vacina.

Dos métodos de tipagem utilizados, os que mais se relacionam são a tipagem *emm* e a determinação dos perfis de PFGE. Para inferir as relações filogenéticas entre as estirpes do estudo, a determinação dos perfis de PFGE e a construção do respectivo dendrograma é o método que nos fornece mais informação. Porém, se o objectivo for comparar com estirpes de outros estudos caracterizadas noutros laboratórios, o melhor método é a tipagem *emm*, uma vez que é a mais difundida.

A diminuição da resistência aos macrólidos ao longo dos anos é uma observação vantajosa para a terapêutica destas infecções. Porém há que ter o cuidado de manter a vigilância para estes antibióticos, assim como esclarecer a razão desta diminuição.

Relativamente às toxinas, embora se deva ter em conta as características do hospedeiro, ainda não existe informação suficiente para excluir completamente a hipótese de que estas são também importantes na determinação da severidade das infecções por GAS. Os mecanismos de regulação destes genes não são totalmente conhecidos e a maioria dos estudos apenas detectam a sua presença por PCR. É também essencial avaliar os níveis de expressão em diferentes condições. Provavelmente estes mecanismos estão relacionados e até eventualmente condicionados pela interacção das proteínas codificadas na região FCT (proteína T) com as diferentes células do hospedeiro (Podbielski *et al.*, 2007).

Ainda sobre as estirpes com os tipos *emm* mais prevalentes, estas são frequentemente descritas como responsáveis por infecções invasivas, o que sugere que as estirpes responsáveis por infecções mais graves podem ter origem em estirpes que colonizam a pele e que serão o reservatório natural das que causam infecções da pele e tecidos moles. Esta hipótese é apoiada por estudos com estirpes invasivas, que apontam as lesões da pele como o principal factor de predisposição para o desenvolvimento de infecção invasiva (Ekelund *et al.*, 2005; Hello *et al.*, 2010). Para provar esta hipótese é essencial prosseguir com os estudos

epidemiológicos em estirpes de GAS recolhidas de vários produtos biológicos e implementar outros métodos de tipagem, como por exemplo, o “Multi Locus Sequence Typing” de modo a melhor avaliar a relação genética entre as estirpes.

5. REFERÊNCIAS

1. **Allen, U. D., Moore, D. L., and Canadian Paediatric Society. (2010).** Invasive group A streptococcal disease: Management and chemoprophylaxis. *Paediatric Infections Disease Notes*. 15:295-298.
2. **Altman DG.** Practical statistics for medical research. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC, 1999.
3. **Ardanuy, C., Domenech, A., Rolo, D., Calatayud, L., Tubau, F., Ayats, J., Martín, R., and Liñares, J. (2010).** Molecular characterization of macrolide- and multidrug-resistance *Streptococcus pyogenes* isolated from adult patients in Barcelona, Spain (1993-2008). *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1-10.
4. **Beall, B., Facklam, R. R., Elliott, J. A., Franklin, A. R., Hoenes, T., Jackson, D., Lacraire, L., Thompson, T., Viswanathan, R., et al. (1998).** Streptococcal *emm* types associated with T-agglutination types and the use of conserved *emm* gene restriction fragment patterns for subtyping group A streptococci. *J Med Microbiol*. 47:893–898.
5. **Bergman, M., Huikko, S., Pihlajamäki, M., Laippala, P., Palva, E., and Huovinen, P. (2004).** Effect of macrolide consumption on erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* in Finland in 1997–2001. *Clin Infectious Diseases*. 38:1251-6.
6. **Beres S. B., Sylva, G. L., Barbian, K. D., Lei, B., Hoff, J. S., Mammarella, N. D., Liu, M. L., Smoot, J. C., Porcella, S. F., Parkins, L. D., et al. (2002).** Genome sequence of a serotype M3 strain of group A Streptococcus: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:10078-10083.
7. **Billal, D. S., Fedorko, D. P., Yan, S., Hotomi, M., Fujihara, K., Nelson, N and Yamanaka, N. (2007).** *In vitro* induction and selection of fluoroquinolone-resistant mutants of *Streptococcus pyogenes* strains with multiple *emm* types. *J Antimicrob Chemother*. 59:28-34.
8. **Billal, D. S., Hotomi, M., Yan, S. S., Fedorko, D. P., Shimada, J., Fujihara, K., and Yamanaka, N. (2009).** Loss of erythromycin resistance genes from strains of *Streptococcus pyogenes* that have developed resistance to levofloxacin. *Diagnostic microbiology and Infectious Disease*. 64:225-228.
9. **Bisno, A. L. (1979).** Alternate complement pathway activation by group A streptococci: role of M-protein. *Infect immune*. 26:1172-76.
10. **Bisno, A. L., Brito, M, O., and Collins, C. (2003).** Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect. Dis*. 3:191-200.

11. **Bisno, A. L., Rubin, F. A., Cleary, P. P., and Dale, F. B. (2005).** Prospects for a group A Streptococcal vaccine: rationale, feasibility, and obstacles-report of a national institute of allergy and infectious diseases workshop. *Clinical Infectious Disease*. 41:1150-6.
12. **Brenciani, A., Bacciaglia, A., Vecchi, M., Vitali, L., Varaldo, P., and Giovanetti, E. (2007).** Genetic elements carrying *erm(B)* in *Streptococcus pyogenes* and association with *tet(M)* tetracycline resistance gene. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 51:1209-1216.
13. **Carapetis, J. R., Stees, A. C., Mulholland, E. K., and Weber, M (2005).** The global burden of group A streptococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 5:685-694.
14. **Carriço, J. A., Silva-Costa, C., Melo-Cristino, J., Pinto, F. R., Lencastre, H., Almeida, J. S., and Ramirez, M. (2006).** Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J. Clin. Microbiol*. 44:2524-2532.
15. **Chatellier, S., Ihendyane, N., Kansal, R. G., Khambaty, F., Basma, H., Norrby-Teglund, A., Low, D. E., McGeer, A., and Kotb, M. (2000).** Genetic relatedness and superantigen expression in group A streptococcus serotype M1 isolates from patients with severe and nonsevere invasive diseases. *Infect. Immun*. 68:3523-3534.
16. **Chopra, I., and Roberts, M. (2001).** Tetracycline antibiotics: mode of action, applicants, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65:232-260.
17. **Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006).** Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S16. Wayne, PA: CLSI.
18. **Commons, R., Rogers, S., Gooding, T., Danchin, M., Carapetis, J., Robins-Browne, R., and Curtis, N. (2008).** Superantigens in group A streptococcal isolates and their relationship with emm types. *Journal of Medical Microbiology*. 57:1238-1246.
19. **Creti, R., Imperi, M., Baldarassi, L., Pataracchia, M., Recchia, S., Alfarone, G., and Orefici, G. (2007).** *emm* types, virulence factors, and antibiotic resistance of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Italy: what has changed in 22 years? *J Clin Microbiol*. 45:2249-2256.
20. **Cunningham, M. W. (2000).** Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev*. 13: 470-511.
21. **Dale, J. B., and Beachey, E. H. (1986)** Sequence of myosin-crossreactive epitopes of Streptococcal M Protein. *Journal of Experimental Medicine*. 164:1785-1790

22. **Dale, J. B. (2008).** Current status of group A Streptococcal vaccine development. Hot topics in infection and immunity in children IV. *Springer*.53-63.
23. **Darenberg, J., Luca-Harari, B., Jasir, A., Sandgren, A., Pettersson, H., Schalen, C., Norgren, M., Romanus, V., Norrby-Teglund, A., and Normark, B. H. (2007).** Molecular and clinical characteristics of invasive group A streptococcal infection in Sweden. *Clin Infect Dis*.45:450–458.
24. **Ekelund, K., Darenberg, J., Norrby-Teglund, A., Hoffmann, S., Bang, D., Skinhoj, P. and Koradsen, H. B. (2005).** Variations in *emm* type among group A streptococcal isolates causing invasive or noninvasive infections in a nationwide study. *J Clin Microbiol*. 43: 3101-3109.
25. **Facklam, R. (2002)** What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clinical Microbiology Reviews*. 15: 613-630.
26. **Feil, E. J., and Enright, M. C. (2004).** Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Elsevier*. 7:308-313.
27. **Ferreti, J. J., McShan, W. M., Ajdic, D., Savic, D. J., Savic, G., Lyon, K., Primeaux, C., Sezate, S., Suvorov., et al (2001).** Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:4658-4663.
28. **Figueira-Coelho, J., Ramirez, M., Salgado, M. J., and Melo-Cristino, J. (2004).** *Streptococcus agalactiae* in a large Portuguese teaching hospital: antimicrobial susceptibility, serotype distribution, and clonal analysis of macrolide-resistance isolates. *Micro Drug Resist*. 10:31-36.
29. **Figueiredo, T. A., Aguiar, S. I., Melo-Cristino, J., and Ramirez, M. (2006)** DNA methylase activity as a marker for the presence of a family of phage-like elements conferring efflux-mediated macrolide resistance in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 50:3689-3694.
30. **Friães, A., Ramirez, M., Melo-Cristino, J., and the Portuguese Group for the Study of Streptococcal Infections (2007).** Nonoutbreak surveillance of Group A streptococci causing invasive disease in Portugal identified internationally disseminated clones among members of a genetically heterogeneous population. *Journal of Clinical Microbiol*. 45:2044-2047.
31. **Gagliotti, C., Nobile, L., Milandri, M., and Moro, M. L. (2006).** Macrolide Prescriptions and Erythromycin Resistance of *Streptococcus pyogenes*. *Clinical Infectious Disease*. 42:11153-6.
32. **García-Rey, C., Aguilar, L., Baquero, F., Casal, J., and Martín, J. E. (2002).** Pharmacoepidemiological analysis of provincial differences between consumption of

- macrolides and rates of erythromycin resistance among *Streptococcus pyogenes* isolates in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:2959-2963.
33. **Gerlach D., Schmidt, K. H., and Fleischer, B. (2001).** Basic streptococcal superantigens (SPEX/SMEZ or SPEC) are responsible for the mitogenic activity of the so-called mitogenic factor (MF). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 30:209-216.
 34. **Giovanetti, E., Brenciani, A., Lupidi, R., Roberts, M. C., and 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 47:2811-2849.
 35. **Grundmann, H., Hori, S., and Tanner, G. (2001).** Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(1):4190-4192.
 36. **Hauser, A. R., Stevens, D. L., Kaplan, E. L., and Schlievert, P. M. (1991).** Molecular analysis of pyrogenic exotoxins from *Streptococcus pyogenes* isolates associated with toxic shock-like syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 29:1562-1569.
 37. **Hello, S. L., Doloy, A., Baussman, F., Roques, N., Coudene, P., Rouchon, B., Lacassin, F., and Bouvet, A. (2010).** Clinical and microbial characteristics of invasive *Streptococcus pyogenes* disease in New Caledonia, a region in Oceania with a high incidence of acute rheumatic fever. *Journal of Clinical Microbiology*. 48:526-530.
 38. **Jasir A., A. Tanna, A. Efstratiou, and Schalén, C. (2001).** Unusual occurrence of M type 77, antibiotic-resistant group A streptococci in southern Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 39:586-590.
 39. **Johnson, D. R., and Kaplan, E. L. (1993).** A review of the correlation of T-agglutination patterns and M-protein typing and opacity factor production in the identification of group A streptococci. *J Med Microbiol.* 38:311-315.
 40. **Kapur V., Topouzis, S., Majesky, M. W., Li, L. L., Hamrick, M. R., Hamill, R. J., Patti, J. M., and Musser. (1993).** A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microb. Pathog.* 15:327-346.
 41. **Kataja, J., Huovinen, P., Skurnik, M., and the Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance, and Seppälä. (1999).** Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:48-52.
 42. **Köller, T., Manetti, A., Krekemeyer, B., Lembke, C., Margarit, I., Grandi, G., and Podbielski, A. (2010).** Typing of the pilus-protein-encoding FCT region and biofilm formation as novel parameters in epidemiological investigations of *Streptococcus*

- pyogenes* isolates from various infection sites. *Journal of Medical Microbiology*. 59:442-452.
43. **Kotb, M., Norrby-teglund, A., McGeer, A., El-Sherbini, H., Tevik, d., Khurshid, A., Green, K, Peeples, J., Wade, J., Thomson, G., Schwartz, B. and Low, D. E. (2002).** An Immunogenetic and molecular basis for differences in outcomes of invasive group A streptococcal infections. *Nature Medicine*. 8:1398–1404.
 44. **Lancefield, R. C. (1927).** The antigenic complex of *Streptococcus hemolyticus*. I. demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus hemolyticus*. *J. Exp. Med.* 47:9-10.
 45. **Lancefield, R. C., Dole, V. P. (1946).** The properties of T antigens extracted from group A hemolytic streptococci. *Esp. Med.* 84:449-471.
 46. **Lamagni, T. L., Darenberg, J., Luca-Harari, B., Siljander, T., Efstratiou, A., Henriques-Normark, B., Vuopio-Varkila, J., Bouvet, A., Creti, R., et al. (2008).** Epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *Journal of Clin. Microbiol.* 46:2359-67.
 47. **Leclercq R. (2002).** Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect dis.* 34:482-492.
 48. **Lintges, M., Arlt, S., Uciechowski, P., Plümäkers, B., Reinert, R. R., Al-Lahham, A., Lütticken, R., and Rink, L. (2007).** A new closed-tube multiplex real-time PCR to detect eleven superantigens of *Streptococcus pyogenes* identifies a strain without superantigen activity. *Int. J. Med. Microbiol.* 297: 471-478.
 49. **Lintges, M., Linden, M. Hilgers, R, Arlt, S., Al-Lahham, A., Reinert, R. R., Plücken, S., and Rink, L. (2010).** Superantigen genes are more important than the *emm* type for the invasiveness of Group A *Streptococcus* infections. *Journal of Infectious Diseases*. 202:20-28.
 50. **Luca-Harari, B., Darenberg, J., Neal, S., Siljander, T., Strakova, L., Tanna, A., Creti, R., Ekelund, K., Koliou, M., Tassios, P. et al., (2009).** Clinical and microbiological characteristics of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *Journal of clinical Microbiology*. 47(4):1115-1165.
 51. **Malhotra-Kumar, S., Wang, S., Lammens, C., Chapelle, S., and Goossens, H. (2003).** Bacitracin-resistant clone of *Streptococcus pyogenes* isolated from pharyngitis patients in Belgium. *Journal of clinical Microbiology*. 41:5282-5284.
 52. **Malhotra-Kumar, S., Heirstraeten, L. V., Lammens, C., Chapelle, S. and Goossens, H. (2009).** Emergence of high-level fluoroquinolone resistance in *emm6 Streptococcus*

- pyogenes* and *in vitro* resistance selection with ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 63:886-894.
53. **Manetti, A. G. O., Zingaretti, C., Falugi, F., Capo, S., Bombaci, M., Bagnoli, F., Gambellini, G., Bensi, G., Mora, M., Edwards, A. M., Musser, J. M., et al. (2007).** *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Molecular Microbiology*. 64:968-983.
 54. **Maripuu, L., Eriksson, A., and Norgren, M. (2008).** Superantigen gene profile diversity among clinical group A streptococcal isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 54:236-244.
 55. **Maxted W. R. (1953).** The use of bacitracin for Identifying group A haemolytic streptococci. *J. Clin. Path*. 6:224-226.
 56. **McNeil, S. A., Halperin, S. A., Langley, J. M., Smith, B., Warren, A., Sharratt, P., Baxendale, D. M., Reddish, M. A., Hu, M. C., Stroop, S. D., et al. (2005).** Safety and immunogenicity of 26-Valent group A *Streptococcus* vaccine in healthy adult volunteers. *Clinical Infectious Disease*. 41:1114-22.
 57. **Meisal, R., Andresson, I. K. G., Høiby, E. A., Aaberge, I. S., Michaelsen, T. E., and Caugant, D. A. (2010).** *Streptococcus pyogenes* isolates causing severe infections in Norway in 2006 to 2007: *emm* Types, multilocus sequence types, and superantigen profiles. *Journal of Clinical Microbiology*. 48:842-851.
 58. **Michos, A. G., Bakoula, C. G., Braoudaki, M., Koutouzi, F. I., Roma, E. S., Pangalis, A., Nikolopoulou, G., Kirikou, E., and Syriopoulou, V. P. (2009).** Macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes*: prevalence, resistance, determinants, and *emm* types. *Diagnostic Microbial and Infectious Disease*. 64:295-299.
 59. **Mihaila-Amrouche, L., Bouvet, A., and Loubinoux, J. (2004).** Clonal spread of *emm* type 28 isolates of *Streptococcus pyogenes* that are multiresistant to antibiotics. *J Clin Microbiol*. 42:3844–3846.
 60. **Montes, M., Tamayo, E., Orden, B., Larruskain, J., and Perez-Trallero, E. (2010).** Prevalence and clonal characterization of *Streptococcus pyogenes* clinical isolates with reduced fluoroquinolone susceptibility in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54:93-97.
 61. **Mora, M., Bensi, G., Capo, S., Falugi, F., Zingaretti, C., Manetti, A., Maggi, T., Tadde, A. R., Grandi, G., and Telford, J. L. (2005).** Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:15641-15646.

62. **Murray, P. R., Rosenthal, K. S. and Pfaller, M. A. (2005).** Medical Microbiology. 5th ed. Philadelphia, Elsevier Mosby.
63. **Mylvaganam, H., Bjorvatn, B. and Osland, A. (2000).** Distribution and sequence variations of selected virulence genes among group A streptococcal isolates from western Norway. *APMIS*. 108:771-778.
64. **Nielson, H. U., Hemmerun, A. M., Ekelund, K., Bang, D., Pallensen, L. v., and Frimodt-Moller, N. (2004)** Tetracycline and macrolide co-resistance in *Streptococcus pyogenes*: co-selection as a reason for increase in macrolide-resistant *S.pyogenes*? *Microb. Drug Resist.* 10:231-238.
65. **Olive, D. M., and Bean, P. (1999).** Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:1661-1669.
66. **O'Loughlin, R. E., Roberson, a., Cieslak, P. R., Lynfield, R., Gerhman, K., Craig, A., Albanese, B. A., Farley, M. M., Barrett, N, L., Spina, N, L., et al. (2007).** The epidemiology of invasive Group A Streptococcal infection and potential vaccine implications: United states, 2000-2004. *Clinical Infectious Diseases*. 45:853-62.
67. **Pedrosa, E. G. G., Morosini, M. I., Van der Linden, M., Ruiz-Garbajosa, P., Galan, J. C., Baquero, F., Reinert, R. R., and Cantón, R. (2008).** Polyclonal population structure of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain carrying *mef* and *mef* plus *erm*(B). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52, 1964-1969.
68. **Pérez-Trallero, E., Garcia, C., Orden, B. et al. (2004).** Dissemination of *emm28* erythromycin-, clindamycin- and bacitracin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 23:123–126.
69. **Pérez-Trallero, E., Montes, M., Orden, B., Tamayo, E., García-Arenzana, J. M., and Marimón, J. M. (2007).** Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus pyogenes* isolates displaying the MLS_B phenotype of macrolide resistance in Spain, 1999 to 2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51:1228-1233.
70. **Pires, R., Ardanuy, C, Dora, R., Morais, A., Brito-Avô, A., Gonçalo-Marques, J., Liñares, J., and Santos-Sanches, I. (2010).** Emergence of Ciprofloxacin-Nonsusceptible *Streptococcus pyogenes* isolates from healthy children and pediatric patients in Portugal. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 6(54):2677-2680.
71. **Podbielski, A. (2007).** Flexible architecture of the *Streptococcus pyogenes* FCT genome region: finally the clue for understanding purulent skin disease and long-term persistence? *Journal of Bacteriology*. 189:1181-1184.

72. **Proft, T., Moffatt, S. L., Weller, K. D., Paterson, A., Martin, D., and Fraser, J. D. (2000).** The streptococcal superantigen SMEZ exhibits wide allelic variation, mosaic structure, and significant antigenic variation. *J Exp Med.* 191:1765–1776.
73. **Proft, T., Webb, P. D., Handley, V., and Fraser, J. D. (2003).** Two novel Superantigens found in both Group A and Group C *Streptococcus*. *Infection and Immunity.* 71:1361-1369.
74. **Rivera A., Rebollo, M., Miró, E., Mateo, M., Navarro, F., Gurguí, M., Mirelis, B., and Coll, P. (2006).** Superantigen gene profile, *emm* type and antibiotic resistance genes among group A streptococcal isolates from Barcelona, Spain. *J. Med. Microbiol.* 55:1115-1123.
75. **Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J., and Seppala, H. (1999).** Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 43:2823-2830.
76. **Sanchez-Pescador, R., Brown, J. T., Roberts, M., and Urdea, M. S. (1988).** Homology of the TetM with translational elongation factors: implications for potential modes of tetM conferred tetracycline resistance. *Nucleic. Acids Res.* 16:1218.
77. **Schmitz, F. J., Beyer, A., Charpentier, E., Normark, B. H., Schade, M., Fluit, A. C., Hafner, D., and Novak, R. (2003).** Toxin-gene profile heterogeneity among endemic invasive European group A streptococcal isolates. *J Infect Dis.* 188:1578–1586.
78. **Silva-Costa, C., Ramirez, M., Melo-Cristino, J., and the Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens (2005).** Rapid inversion of the prevalences of macrolide resistance phenotypes paralleled by a diversification of T and *emm* types among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 49:2109-2111.
79. **Silva-Costa, C., Ramirez, M., and Melo-Cristino, J. (2006).** Identification of macrolide-resistant clones of *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Clin Microbiol Infect.* 12:513-518.
80. **Silva-Costa, C., Ramirez, M., Melo-Cristino, J., and the Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens (2008).** Decrease in macrolide resistance and clonal instability among *Streptococcus pyogenes*. *Clin Microbiol Infect.* 14:1152-1159.
81. **Shulman, S. T., Tanz, R. R., Dale, J. B., Beall, B., Kabat, W., Kabat, K., Cederlund, E., Patel, D., Rippe, J., Li, Z., et al. (2009).** Seven-year surveillance of North American pediatric Group A Streptococcal pharyngitis Isolates. *Clinical Infectious Diseases.* 49:78-84.

82. Smoot, L. M. McCormick, J. K., Smoot, J. C., Hoe, N. P., Strickland, I., Cole R. L., Barbian., K. D., Earhart, C. A., Ohlendorf, D. H. *et al* (2002). Characterization of two novel pyrogenic toxin superantigens made by an acute rheumatic fever clone of *streptococcus pyogenes* associated with multiple disease outbreaks. *Infect Immun.* 70:7095-7104.
83. Sriskandan, S., Faulkener, L., and Hopkins, P. (2007). *Streptococcus pyogenes*: insight into the function of the streptococcal superantigens. *Elsevier.* 39:12-19.
84. Steer, A. C., Law, I., Matatolu, L., Beall, B. W., and Carapetis, J. (2009). Global emm type distribution of group A streptococci; systematic review and implications for vaccine development. *Lancet.* 9:611-616.
85. Sutcliffe, J., Tait-Kamradt A. and Wondrack, L. (1996). *Streptococcus pneumonia* and *Streptococcus pyogenes* resistente to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:736-770.
86. Trzcinski, K., Cooper, B. S., Hryniewicz, W., and Dowson, C. G. (2000). Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 45:763–770.
87. Vlamincx, B. J. M., Schuren, F. H. J., Montijn, R. C., Caspers, M. P. M. Beitsma, M. M., Wannet, W. J. B., Schoulds, L. M., Verhoef, J., and Jansen, W. T. M. (2007). Dynamics in profage content of invasive and noninvasive M1 and M28 *Streptococcus pyogenes* isolates in the Netherlands from 1959 to 1996. *Infection and Immunity.* 75:3673-3679.
88. Wallace, D. L. (1983). A method for comparing two hierarchical clusterings: comment. *J. Am. Stat. Assoc.* 78:569-576.
89. WHO report (1992). WHO program for the prevention of rheumatic fever/rheumatic heart disease in 16 developing countries: report from phase I (1986-90). Bulletin of the World Health Organization. 70(2):213-218.

ANEXOS

Quadro 1. Nomes e respectivas seqüências dos primers utilizados

	Gene	Primers (5'→3')	Tamanho do produto de PCR (pb)	Referência
MACRÓLIDOS	<i>erm(B)</i>	ermB1.2 - GAAAARGTACTCAACCAAATA ermB2.3 - AGTAAAYGGTACTTAAATTGTTTAC	639	Figueira-Coelho <i>et al.</i> , 2004
	<i>erm(TR)</i>	ermTR1- CTTGTGGAAATGAGTCAACGG ermTR2 - TTGTTCAATGGATAATTTATC	552	
	<i>mef</i>	mefA/E1 - GGCAAGCAGTATCATTAAATCAC mefA/E2 - GACTGCAAAGACTGACTATAG	394	
	<i>mef(A)</i>	mefR - CCAATGATTTACACCGATT mef1 - AATACAACAATTGGAAACTT	1080	Pedrosa <i>et al.</i> , 2008
	<i>mef(E)</i>	mefR - CCAATGATTTACACCGATT mef2 - AAGGAGTTGTGGTTCTGA	480	
TETRACICLINA	<i>Tet(K)</i>	tetK-up - TATTTTGGCTTTGATTCTTTCAT tetK-rev- GCTATACCTGTTCCCTCTGATAA	1159	Trzcinski <i>et al.</i> , 2000
	<i>Tet(L)</i>	tetL-up - ATAAATTGTTTCGGGTCGGTAAT tetL-rev - AACAGCCAACTAATGACAATGAT	1077	
	<i>Tet(M)</i>	tetM-up- AGTTTTAGCTCATGTTGATG tetM-rev- TCCGACTATTTAGACGACGG	1862	
	<i>Tet(O)</i>	tetO-up - AGCGTCAAAGGGGAATCACTATCC tetO-rev- CGGCGGGGTTGGCAAATA	1723	
emm	<i>emm</i>	emm1-TATT(C/G)GCTTAGAAAATTA emm2- GCAAGTTCTTCAGCTTGT		http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emm-type.htm
		emmseq2-TATTCGCTTAGAAAATTAACAGG		Beall <i>et al.</i> , 1998
EXOTOXINAS	<i>speA</i>	speA-f2 – AAGAACC(A/T/G)AGAGATG(T/G)CAAC speA-r2 – ATAG(G/A)CTTTGGATACCATC(G/A)	202	Jasir <i>et al.</i> , 2001 adaptado
	<i>speB</i>	speB1 – TTCTAGGATACTCTACCAGC speB2 – ATTTGAGCAGTTGCAGTAGC	300	Jasir <i>et al.</i> , 2001
	<i>speC</i>	speC-f2 - CAGTCATACTGATTTCTACTATTTCCACC speC-r2 - CAAGATAAATATCGAAATGACTAAAGTTC	660	Friães <i>et al.</i> , não publicado
	<i>speF</i>	speF1 – CGAAATTAGAAAAGAGGAC speF2 – GGCTGAGCAAAAGTGTGTG	1193	Chatellier <i>et al.</i> , 2000
	<i>speG</i>	speG-f – GTATCTTTAGGCATTACTGATC speG-r – GTTTACTATCTTTAGTAGCAAG	340	Friães <i>et al.</i> , não publicado
	<i>speH</i>	speH1 – TTCAAGCAAATTTCTATAATAACAACC speH3 – AAAGTCTCCATTGCCAAAATAATAC	545	Friães <i>et al.</i> , não publicado
	<i>speI</i>	speI1 – TATGAGATGAGTAGTGTGGGAGTTATTA speI3 – GTTCCTGAATCGTAACCTTTCTTATC	411/412	Friães <i>et al.</i> , não publicado
	<i>speJ</i>	speJg-f2 – CGAGAGCTATATTACAACAAG speJg-r – CACTCCTGTACTAGATGAGG	386	Jasir <i>et al.</i> , 2001
	<i>speK</i>	speK-f – TATCGCTTGCTCTATACTACTGAGAGT speK-r2 – CTTATCTTAGCTGTTAATGTTGTAATTC	478/479	Lintges <i>et al.</i> , 2007 Friães <i>et al.</i> , não publicado
	<i>speL</i>	speL-f – GGACGCAAGTTATTATGGATGCTCA speL-r – TTAATAAGTCAGCACCTTCTCTTCTC	460	Lintges <i>et al.</i> , 2007
	<i>speM</i>	speK-f – TATCGCTTGCTCTATACTACTGAGAGT speM-r – ATGAGTGAATAAATCGGTAACTTTGTTG	587	Lintges <i>et al.</i> , 2007 Friães <i>et al.</i> , não publicado
	<i>ssa</i>	ssa1 – GTGTAGAATTGAGGTAATTG ssa2 – TAATATAGCCTGTCTCGTAC	706	Schmitz., <i>et al</i> 2003
	<i>smeZ</i>	smeZ-F – TAGAAGTAGATAATAATTCC smeZ-R2 – TTAGGAGT(C/T)AATTTCTATAT	628/629/ 616	Rivera <i>et al.</i> , 2006 adaptado

Quadro 2. Tipos de *emm*, número de estirpes correspondentes e genótipos de resistência aos macrólidos e tetraciclina.

<i>emm</i>	nº de estirpes	Tipo T (nº de estirpes)	Genótipo macrólidos (nº de estirpes)	Genótipo tetraciclina (nº de estirpes)
1	55	1 (54) NT(1)	<i>mefA</i> (2) <i>ermB</i> (1)	
2	8	2(8)		
3	13	NT (13)		
4	17	4 (13) 2 (1) NT(1)	<i>mefA</i> (3)	
5	4	NT (4)		<i>tetM</i> (2)
6	20	6 (15) NT (5)		
9	3	9 (3)	<i>mefA</i> (1)	
11	5	11 (2) NT (3)	<i>ermB</i> (2) <i>ermB</i> (3)	<i>tetM</i> (2) <i>tetM</i> (3)
12	11	11 (8) NT (4)	<i>mefA</i> (1)	
18	4	18 (3) 5/27/44(1)	<i>mefA</i> (1) <i>mefA</i> (1)	<i>tetM</i> (1)
22	7	12 (5) NT(2)	<i>ermB</i> (2)	<i>tetM</i> (3)
28	17	28 (15) NT(2)	<i>ermB</i> (11) <i>ermB</i> (1)	<i>tetM</i> (1)
33	1	NT		
43	1	NT		
44	18	5/27/44(15) 11(3) NT(1)		<i>tetM</i> (3)
48	7	28(1) NT (6)		
50	1	12		<i>tetO</i> (1)
53	3	NT		<i>tetM</i> (3)
58	4	NT		
64	3	3(1) NT(2)		<i>tetM</i> (1) <i>tetM</i> (2)
65	1	NT		<i>tetM</i> (1)
68	1	NT		
70	2	NT		<i>tetM</i> (1)

<i>emm</i>	nº de estirpes	Tipo T (nº de estirpes)	Genótipo macrólidos (nº de estirpes)	Genótipo tetraciclina (nº de estirpes)
71	3	9 (2) NT(1)		<i>tetM</i> (2)
73	1	13		
74	1	NT		
75	5	25(3) NT(2)		<i>tetM</i> (1)
76	2	12	<i>ermB</i> (2)	<i>tetM</i> (2)
77	2	13 (1) 13/9 (1)		<i>tetO</i> (1)
78	4	11		
80	2	11 (1) NT(1)		<i>tetM</i> (1)
81	1	12		
82	1	5/27/44		<i>tetM</i> (1)
83	1	NT		
87	9	28 (8) NT(1)		<i>tetM</i> (3)
89	62	B3264(59) NT(3)	<i>mefA</i> (1)	
90	1	13		
93	1	NT		<i>tetM</i> (1)
94	1	B3264		
102	1	1/-3		
103	1	14/49		
109	1	6		<i>tetM+tetL</i> (1)
118	4	13(2) 1 (1) NT (1)		<i>tetM+tetL</i> (1) <i>tetM</i> (1) <i>tetM</i> (1)
122	1	NT		<i>tetM</i> (1)
st0223	1	14/49		
st587	1	NT	<i>mefE</i> (1)	<i>tetM+tetL</i> (1)
st1325	1	NT		<i>tetM</i> (1)
st1389	1	B3264		
st6735	2	9(1) 1/-13 (1)		<i>tetM</i> (1) <i>tetM</i> (1)
stD432	2	NT (2)		<i>tetM</i> (2)
stD633	1	NT		

Quadro 3. Perfil de Toxinas, número de estirpes onde foram detectados e respectivos tipos *emm* associados. Neste quadro não foram considerados os genes *speB* e *speF*.

Perfil de SAg	Nº de estirpes	speA	speC	speG	speH	speI	speJ	speK	speL	speM	ssa	smeZ	Tipos de emm (nº de estirpes)
1	18	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	6(17), 74(1)
2	12	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	1(11), 87(1)
3	4	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	18 (3), stD633 (1)
4	5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	122(1), 18(1), 5(2), 80(1)
5	11	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	3(11)
6	1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	6(1)
7	44	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	1(43), 71(1)
8	2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	43(1), 82(1)
9	2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	44(2)
10	1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	22(1)
11	1	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	28(1)
12	14	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	11(4), 12(6), 48(4)
13	1	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	87(1)
14	2	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	22(2)
15	4	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	87(4)
16	2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	22(2)
17	16	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	4(16)
18	8	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	28(8)
19	3	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	89(3)
20	27	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	28(8), 68(1), 70(2), 89(15), 90(1)
21	1	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	75(1)
22	49	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	118(1), 48(3), 5(2), 50(1), 77(1), 78(4), 89(35), st0223(1), 11(1)
23	7	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	2(7)
24	12	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	44(12)
25	8	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	12(5), 73(1), 76(2)
26	2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	75(1), 94(1)

Quadro 3. Continuação

27	3	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	44(1), 87(1), stD432(1)
28	3	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	53(1), 75(2)
29	4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	22(1), 9(3)
30	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	4(1)
31	2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	65(1), st6735(1)
32	5	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	102(1), 103(1), 118(2), stD432(1)
33	1	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	80(1)
34	20	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	118(1), 53(2), 58(1), 64(3), 75(1), 89(9), st1325(1), st1389(1), st587(1)
35	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	109(1), 77(1)
36	1	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	2(1)
37	2	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	6(2)
38	1	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	22(1)
39	2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	3(2)
40	1	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	87(1)
41	3	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	44(3)
42	2	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	71(2)
43	1	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	1(1)
44	1	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	93(1)
45	3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	58(3)
46	1	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	33(1)
47	1	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	st6735(1)
48	1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	81(1)
49	1	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	87(1)
50	1	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	83(1)

Quadro 4. Relação entre as estirpes dos tipos *emm* mais prevalentes (≥5 estirpes) e os superantigénios. Neste quadro não foram considerados os genes *speB* e *speF*. A sublinhado estão a associações estatisticamente significativas calculadas com o teste bilateral de Fisher.

	Nº de estirpes	<i>speA</i> (%)	<i>speC</i> (%)	<i>speG</i> (%)	<i>speH</i> (%)	<i>speI</i> (%)	<i>speJ</i> (%)	<i>speK</i> (%)	<i>speL</i> (%)	<i>speM</i> (%)	<i>ssa</i> (%)	<i>smeZ</i> (%)
<i>emm89</i>	62	-	<u>53</u>	<u>62</u>	-	-	15	3	-	-	-	62
<i>emm1</i>	55	<u>55</u>	11	<u>55</u>	-	-	<u>55</u>	1	-	-	-	55
<i>emm6</i>	20	<u>20</u>	<u>19</u>	20	2	2	-	<u>20</u>	-	-	-	20
<i>emm44</i>	18	-	2	18	<u>17</u>	<u>14</u>	<u>18</u>	-	-	-	<u>15</u>	15
<i>emm4</i>	17	-	<u>16</u>	-	-	-	-	-	-	-	<u>17</u>	17
<i>emm28</i>	17	-	<u>17</u>	17	1	1	<u>17</u>	<u>9</u>	-	-	-	17
<i>emm3</i>	13	<u>13</u>	-	13	-	-	-	<u>11</u>	-	-	<u>13</u>	13
<i>emm12</i>	11	-	5	11	<u>11</u>	<u>11</u>	-	-	-	-	-	11
<i>emm87</i>	9	1	7	9	1	1	<u>9</u>	2	-	-	<u>6</u>	9
<i>emm2</i>	8	-	7	8	-	-	-	-	<u>8</u>	<u>8</u>	-	-
<i>emm48</i>	7	-	<u>7</u>	7	<u>4</u>	<u>4</u>	-	-	-	-	-	7
<i>emm11</i>	5	-	5	5	<u>4</u>	<u>4</u>	-	-	-	-	-	5
<i>emm75</i>	5	-	1	5	1	-	-	-	<u>3</u>	<u>3</u>	2	5
Outros	73	16	35	71	11	8	15	6	8	11	13	65
TOTAL	320	105(32.8)	185(57.8)	301(94.1)	52(16.3)	45(14.1)	129(40.3)	52(16.3)	19(5.9)	22(6.9)	66(20.6)	307(95.9)