



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Guilherme da Silva Lourenço Carvalho

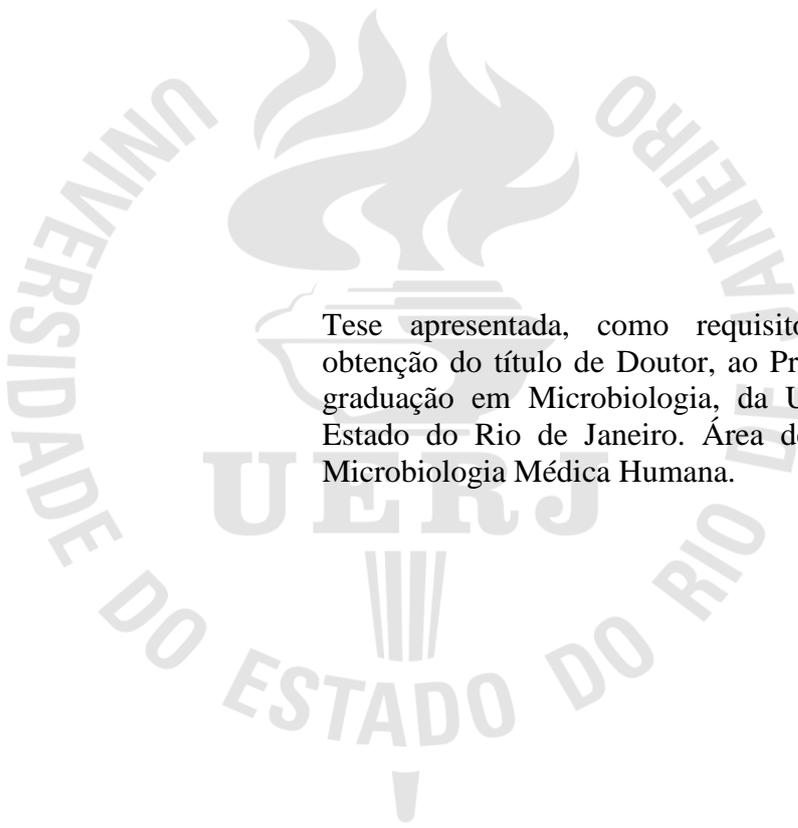
**Análise comparativa das propriedades fenotípicas e genotípicas de amostras
de origem humana e animal de *Streptococcus pseudoporcinus***

Rio de Janeiro

2017

Guilherme da Silva Lourenço Carvalho

Análise comparativa das propriedades fenotípicas e genotípicas de amostras de origem humana e animal de *Streptococcus pseudoporcinus*



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof^ª. Dra Vânia Lúcia Carreira Merquior

Coorientadora: Prof^ª. Dra Lúcia Martins Teixeira

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

C331 Carvalho, Guilherme da Silva Lourenço.
Análise comparativa das propriedades fenotípicas e genotípicas de amostras de origem humana e animal de *Streptococcus pseudoporcinus* / Guilherme da Silva Lourenço Carvalho. – 2017.
107 f.

Orientadora: Vânia Lúcia Carreira Merquior
Coorientadora: Lúcia Martins Teixeira

Tese (Mestrado em Microbiologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Streptococcus*. 2. Genômica - Teses. 3. Proteômica – Teses. 4. Virulência (Microbiologia) – Teses. I. Merquior, Vânia Lúcia Carreira. II. Teixeira, Lúcia Martins. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 575.1

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 - 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Guilherme da Silva Lourenço Carvalho

Análise comparativa das propriedades fenotípicas e genotípicas de amostras de origem humana e animal de *Streptococcus pseudoporcinus*

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 30 de junho de 2017.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof^a. Dra. Angela Corrêa de Freitas Almeida

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof^a. Dra. Mara Lucia Penna Queiroz

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof^a. Dra. Rachel Leite Ribeiro

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Giovani Carlo Veríssimo da Costa

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, Jesus e todos seus emissários de luz e de amor.

À minha família por todo carinho. À minha mãe Cristina, pelo zelo, amor, carinho, incentivo, exemplo de caráter, profissionalismo, luta, coragem e resistência. Sem você, seria impossível. A meu pai, Thomaz, pelo carinho, exemplo e amizade. Sim, eu te entendo. A meu irmão Gustavo, pela força e atenção. José e Olga, guardo vocês no coração.

À minha companheira Fernanda pela paciência (nem tanto...hehe), compreensão, carinho e apoio.

À minha orientadora Vânia Merquior, pela amizade, conselhos, dedicação, ajuda e oportunidade. Nada é por acaso e sua presença foi fundamental nesta jornada!

À Prof^a Lúcia Teixeira, pela acolhida, oportunidade, exemplo e ensinamentos.

À Beatriz Monteiro, pela amizade, ajuda, companheirismo e desabafos. Passamos por tanta coisa... Paixões e amizades que chegaram e se foram. Surpresas e decepções... Assaltos, batatas fritas, gordolas, nerds malucos, *stalkers*, Olimpíada. Aerosmith. Foi bom te ver crescer, mas não tanto assim. Nani, apesar do tamanho, você é um dos grandes patrimônios que adquiri nesta jornada!

À Adriana Faria, pelos ensinamentos, atenção, compreensão, conversas, dedicação e ajuda.

A todos companheiros de jornada do laboratório 27, pela disposição em ajudar e momentos de descontração. Aprendi muito com todos vocês.

À Prof^a Tatiana Pinto pela disposição e ajuda.

Ao Prof. José Mauro Peralta e demais colaboradores do laboratório 46, pela ajuda e espaço cedidos.

Ao Prof. Giovani Veríssimo, pela ajuda, atenção, ensinamentos e oportunidade.

À família Miranda pela amizade, acolhimento e oportunidade.

A todos os amigos do coração.

A todos professores, funcionários e colaboradores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, não permitam que sejam vencidos. UERJ resiste!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Eis-me aqui; venho até vós, porque me chamastes!

RESUMO

CARVALHO, Guilherme da Silva Lourenço. Análise comparativa das propriedades fenotípicas e genotípicas de amostras de origem humana e animal de *Streptococcus pseudoporcinus*. 2017. 107f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O gênero *Streptococcus* é alvo de constantes reclassificações dentre suas espécies. O objetivo deste estudo foi avaliar as características apresentadas por 24 amostras de *Streptococcus pseudoporcinus*, sendo 19 de origem humana, incluindo uma derivada da amostra tipo, e cinco de origem animal (isoladas de leite), em comparação com amostras de referência de *Streptococcus porcinus*. Estas amostras foram caracterizadas por testes fisiológicos, perfil total de proteínas por SDS-PAGE, susceptibilidade a antimicrobianos e atributos relacionados a virulência. Além disso, a técnica de MALDI-TOF foi utilizada na caracterização das amostras, aliado a análise filogenética e genômica comparativa *in silico*. Também foi analisado o perfil proteômico utilizando espectrometria de massa (ESI-Q-TOF). Dos testes fisiológicos utilizados, a hidrólise do hipurato foi o único capaz de diferenciar as espécies. Na metodologia de MALDI-TOF, os resultados obtidos revelaram valores de escores distintos dependendo do tipo do protocolo empregado. Extratos proteicos obtidos pelo tratamento com ácido fórmico e acetonitrila, demonstraram resultados eficazes. A partir dos espectros obtidos, foi determinada uma similaridade entre as amostras do estudo. Houve uma perfeita discriminação entre as amostras *S. pseudoporcinus* das de *S. porcinus*. Adicionalmente, as amostras de *S. pseudoporcinus* obtidas de leite mostraram uma maior correlação entre si. Os dados obtidos com a metodologia de MALDI-TOF foram também avaliados quanto à identificação de biomarcadores, demonstrando a presença de picos intra e inter-específicos. A análise dos perfis proteicos obtidos por SDS-PAGE revelou uma grande similaridade entre as espécies, não tendo sido suficientemente discriminatória. A análise pelo pareamento das sequências do gene *rrs*, disponibilizadas em bancos de dados públicos, revelou que as amostras de *S. pseudoporcinus* de fonte humana estão menos relacionadas com as amostras de fonte animal. Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos demonstraram 66,0% de amostras de *S. pseudoporcinus* de origem humana resistentes à tetraciclina. Todas as amostras se mostraram capazes de formar biofilmes, sendo que a suplementação do meio de cultura com sacarose ou glicose aumenta consideravelmente a quantidade de biomassa aderida. As amostras tipo de ambas as espécies, quando cultivadas sob a forma de biofilmes apresentaram valores de concentração inibitória até 40.000 vezes maiores que células planctônicas. Diversas proteínas relacionadas a virulência foram identificadas pelas análises proteômica e genômica. Ambas as espécies foram capazes de aderir a células humanas. A genômica comparativa mostrou uma similaridade muito maior entre amostras de origem animal do que com amostras de origem humana de *S. pseudoporcinus*, tanto pelas sequências gênicas quanto pelas análises de predição de proteínas.

Palavras-chave: *Streptococcus pseudoporcinus*. *Streptococcus porcinus*. Virulência. MALDI-TOF MS. Biofilmes. Genômica. Proteômica.

ABSTRACT

CARVALHO, Guilherme da Silva Lourenço. Comparative analysis of phenotypic and genotypic properties of human and animal isolates of *Streptococcus pseudoporcinus*. 2017. 107f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

The genus *Streptococcus* is constantly suffering reclassifications. The aim of this study was to evaluate the characteristics presented by 24 isolates of *Streptococcus pseudoporcinus*, including a derivative of the type strain, being 19 obtained from human clinical specimens and five from animal origin (milk samples). Six *Streptococcus porcinus* reference strains were included for comparative purposes. These isolates were characterized by physiological tests, protein profiles by SDS-PAGE, antimicrobial susceptibilities and virulence-related characteristics. Additionally, MALDI-TOF MS technique was used in order to characterize these isolates, allied with phylogenetic analysis and whole genome sequencing. Proteomic assays were carried out by mass spectrometry (ESI-Q-TOF). Physiological tests results indicated that hippurate hydrolysis was the only one able to differentiate the species. The results obtained by MALDI-TOF MS showed distinct scores values, depending on the protocol employed to the samples preparation. Protein extracts obtained by the treatment with formic acid and acetonitrile, have shown effective results in discriminate between *S. pseudoporcinus* and *S. porcinus* species. Additionally, high correlation degrees were identified among samples of *S. pseudoporcinus* obtained from milk. The data obtained by MALDI-TOF MS were also assessed to identify biomarkers, demonstrating the presence of intra and interspecies spectra. The analysis of the protein profiles obtained by SDS-PAGE revealed a great similarity between the species and it was not sufficiently discriminatory. The analysis by the *rrs* gene sequences that *S. pseudoporcinus* isolates belonging to human sources were less related to the isolates obtained from milk samples. Antimicrobial susceptibility testing demonstrated 66.0% of the *S. pseudoporcinus* of human origin were resistant to tetracycline. The isolates were able to form biofilms, and supplementation of the culture medium with sucrose or glucose considerably increases the amount of biomass adhered. Biofilms of type strains of both species showed inhibitory concentration values up to 40,000 times greater than planktonic cells. Several virulence-related proteins have been identified by proteomics and genomics analyses. Both species were able to adhere to human cells.

Keywords: *Streptococcus pseudoporcinus*. *Streptococcus porcinus*. Virulence. MALDI-TOF. Biofilms. Genomics. Proteomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema representativo da sequência temporal da formação de biofilmes por <i>Streptococcus</i>	24
Figura 2 –	Agrupamento das amostras de <i>Streptococcus pseudoporcinus</i> e <i>Streptococcus porcinus</i> de acordo com os resultados obtidos pela metodologia de MALDI TOF	51
Figura 3 –	Comparação dos espectros de massa obtidos pela metodologia de MALDI-TOF das amostras tipo de <i>Streptococcus pseudoporcinus</i> (ATCC BAA-1381 ^T) e de <i>Streptococcus porcinus</i> (ATCC 43138 ^T)	52
Figura 4 –	Comparação dos espectros de massa obtidos pela metodologia de MALDI-TOF entre amostras de <i>S. pseudoporcinus</i> de origem humana (ATCC BAA-1381 ^T) e de leite (SS-662)	53
Figura 5 –	Dendrograma representativo do agrupamento das amostras de <i>Streptococcus pseudoporcinus</i> e <i>Streptococcus porcinus</i> determinado pelo emprego da metodologia de análise do perfil de proteínas totais obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida acrescido de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	55
Figura 6 –	Árvore filogenética mostrando a relação de <i>S. pseudoporcinus</i> e <i>S. porcinus</i> com base no alinhamento de sequências do gene <i>rrs</i> (16S rRNA) pelo método de UPGMA	56
Figura 7 –	Árvore filogenética mostrando a relação de <i>S. pseudoporcinus</i> e <i>S. porcinus</i> com base no alinhamento de sequências do gene <i>rrs</i> (16S rRNA) pelo método de <i>Neighbor Joining</i>	57
Figura 8 –	Valores de densidade ótica relativos a quantificação da biomassa em biofilmes produzidos por amostras de <i>S. pseudoporcinus</i> e de <i>S. porcinus</i>	59
Figura 9 –	Valores de densidade ótica relativos a quantificação da biomassa em biofilmes produzidos pelas amostras tipo de <i>Streptococcus pseudoporcinus</i> (ATCC BAA-1381 ^T) e de <i>Streptococcus porcinus</i> (ATCC 43138 ^T) na presença de diferentes concentrações de sacarose e de glicose	59
Figura 10 –	Distribuição das proteínas por função biológica obtidas das amostras tipo de <i>Streptococcus pseudoporcinus</i> (ATCC BAA-1381 ^T) e de	

	<i>Streptococcus porcinus</i> (ATCC 43138 ^T), após separação por SDS-PAGE e identificação por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF)	61
Figura 11 –	Interação das amostras tipo de <i>Streptococcus pseudoporcinus</i> (ATCC BAA-1381 ^T) e de <i>Streptococcus porcinus</i> (ATCC 43138 ^T) com células HeLa	65
Figura 12 –	Mapa circular do genoma de amostras das espécies <i>S. porcinus</i> (ATCC 43168 ^T) e <i>S. pseudoporcinus</i> de origem humana (ATCC BAA-1381 ^T) e de leite (SS-607 e SS-662)	66
Figura 13 –	Alinhamento do genoma de amostras das espécies <i>S. porcinus</i> (ATCC 43168 ^T) e <i>S. pseudoporcinus</i> de origem humana (ATCC BAA-1381 ^T) e de leite (SS-607 e SS-662)	67
Figura 14 –	Diagrama de Venn construído para determinar a relação das proteínas preditas do genoma de amostras das espécies <i>S. porcinus</i> (ATCC 43168 ^T) e <i>S. pseudoporcinus</i> de origem humana (ATCC BAA-1381 ^T) e de leite (SS-607 e SS-662)	68
Figura 15 –	Alinhamento das proteínas preditas a partir das sequências do genoma de amostras das espécies <i>S. porcinus</i> (ATCC 43168 ^T) e <i>S. pseudoporcinus</i> de origem humana (ATCC BAA-1381 ^T) e de leite (SS-607 e SS-662)	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Amostras e números de acesso no GenBank das respectivas sequências de genoma completo utilizadas neste estudo	46
Tabela 2 –	Características das amostras de <i>S. pseudoporcinus</i> e <i>S. porcinus</i> avaliadas neste estudo	47
Tabela 3 –	Caracterização fenotípica de amostras de <i>Streptococcus pseudoporcinus</i> e <i>Streptococcus porcinus</i> por testes fisiológicos convencionais	49
Tabela 4 –	Distribuição das amostras de <i>Streptococcus pseudoporcinus</i> e <i>Streptococcus porcinus</i> em relação aos escores obtidos pelo emprego da metodologia de MALDI-TOF MS	50
Tabela 5 –	Comparação dos valores de m/z (massa carga) identificados nos espectros obtidos pela metodologia de MALDI-TOF MS para as espécies <i>Streptococcus pseudoporcinus</i> (n=24) e <i>Streptococcus porcinus</i> (n=6) para a determinação de biomarcadores	54
Tabela 6 –	Valores de concentração inibitória mínima (CIM) ¹ e concentração inibitória de biofilmes (CIB) ² das amostras tipo de <i>Streptococcus pseudoporcinus</i> e de <i>Streptococcus porcinus</i>	60
Tabela 7 –	Caracterização ¹ das proteínas das amostras tipo de <i>Streptococcus pseudoporcinus</i> (ATCC BAA-1381 ^T) e de <i>Streptococcus porcinus</i> (ATCC 43138 ^T) e identificação por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF)	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	<i>Desoxirribonucleotídeos Fosfatados</i>
EDTA	Ácido Etileno DiaminoTetracético
EMAs	enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
EPS	Substância Polimérica Extracelular
ESI-Q-TOF MS	<i>ElectroSpray Ionisation-Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
EUA	Estados Unidos da América
G	Guanina
μ	Micro
mL	Mililitro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
PBS	fosfato de sódio monobásico
SS	<i>Standard strain</i>
UEMP	Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Averages</i>
WGS	<i>whole genome sequencing</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVOS	31
2	MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1	Amostras Bacterianas	32
2.2	Caracterização das Amostras Bacterianas por Testes Fisiológicos	32
2.2.1	<u>Hidrólise de L-Pirrolidonil-β-Naftilamida (Teste do PYR)</u>	33
2.2.2	<u>Crescimento na Presença de 6,5% de Cloreto de Sódio (Teste do NaCl 6,5%)</u>	33
2.2.3	<u>Hidrólise da Arginina</u>	33
2.2.4	<u>Hidrólise da Esculina</u>	34
2.2.5	<u>Hidrólise do Hipurato</u>	34
2.2.6	<u>Utilização do Piruvato de Sódio</u>	34
2.2.7	<u>Teste de Voges-Proskauer (VP)</u>	34
2.2.8	<u>Utilização de Carboidratos</u>	35
2.2.9	<u>Teste de CAMP</u>	35
2.3	Caracterização das Amostras Bacterianas por Espectrometria de Massa - MALDI-TOF	36
2.3.1	<u>Caracterização das Espécies <i>S. porcinus</i> e <i>S. pseudoporcinus</i></u>	36
2.3.2	<u>Agrupamento das Amostras a partir dos Resultados de MALDI-TOF MS</u>	37
2.4	Perfis de Proteínas Totais por SDS-PAGE	37
2.5	Análise Filogenética de <i>S. Pseudoporcinus</i>	38
2.6	Susceptibilidade aos Antimicrobianos	39
2.6.1	<u>Teste de Difusão em Ágar</u>	39
2.6.2	<u>Teste de Microdiluição em Caldo</u>	39
2.7	Caracterização de Atributos de Virulência de <i>S. porcinus</i> e <i>S. pseudoporcinus</i>	40
2.7.1	<u>Formação de Biofilmes</u>	40
2.7.1.1	Análise Quantitativa da Biomassa.....	40
2.7.1.2	Influência da Presença de Glicose e de Sacarose na Formação de Biofilme.....	41
2.7.1.3	Susceptibilidade aos Antimicrobianos dos Biofilmes de <i>S. pseudoporcinus</i>	42
2.7.2	<u>Ensaio de Aderência em Linhagem Celular HeLa</u>	42
2.8	Análise Proteômica Comparativa entre <i>S. porcinus</i> e <i>S. pseudoporcinus</i>	43

2.8.1	<u>Preparo das Amostras</u>	43
2.8.2	<u>Análise dos Resultados</u>	44
2.9	Genômica Comparativa de <i>S. porcinus</i> e <i>S. pseudoporcinus</i>	45
3	RESULTADOS	47
4	DISCUSSÃO	71
	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	85

INTRODUÇÃO

Streptococcus – Histórico e Características Gerais

O gênero *Streptococcus*, pertencente à família Streptococaceae, reúne microrganismos que se apresentam como células esféricas ou ovóides, Gram positivas, medindo menos que 2 μm de diâmetro, formando pares ou cadeias, que são melhores evidenciadas quando estes microrganismos são cultivados em meio líquido. Não são células móveis, como também não formam esporos. São anaeróbios facultativos, com algumas espécies necessitando de um suplemento adicional de CO_2 para crescimento ótimo sendo, portanto, caracterizadas como capnofílicas. Todos os componentes do gênero apresentam metabolismo fermentativo produzindo, predominantemente, o ácido láctico como produto final; porém, sem a formação de gás. Na quase totalidade, as espécies do gênero não apresentam citocromos e são catalase negativa (BRANDT; SPELLERBERG, 2009; FACKLAM, 2002; HARDIE; WHILEY, 1997).

Historicamente, o termo “streptococcus” foi primeiramente referido por Billroth, em 1874, para descrever microrganismos isolados de feridas, que se apresentavam na forma de cocos arranjados em cadeias e aos pares. No final do século 19, a participação de cocos Gram positivos nas doenças infecciosas humanas já estava bem estabelecida e Rosebach, em 1884, utilizou pela primeira vez o nome *Streptococcus*, de maneira genérica, para descrever bactérias isoladas de lesões supurativas, as quais nomeou de *Streptococcus pyogenes* (apud HARDIE; WHILEY, 1997). Os anos iniciais do século 20 foram marcados pelo intenso desenvolvimento de metodologias fundamentais à caracterização bacteriana, que tiveram grande impacto na classificação e entendimento da importância clínica e econômica do gênero *Streptococcus* (COLMAN, 1990; FACKLAM, 2002; SPELLERBERG; BRANDT, 2015). Estas incluíram: (i) a diferenciação das espécies ou grupos de espécies baseada na atividade hemolítica em meio ágar adicionado de sangue, proposto por Shottmuler em 1903, que identifica os padrões de hemólise α (alfa ou parcial), β (beta ou total) e γ (gama ou não hemolítico) (apud FACKLAM, 2002); (ii) reações de fermentação de açúcares; e (iii) detecção, por testes sorológicos, de antígenos (carboidrato ou substância C) obtidos de extratos ácidos das células bacterianas (HARDIE; WHILEY, 1997).

A classificação baseada nas características antigênicas do carboidrato ou substância C, presente na parede celular dos estreptococos, foi descrita por Rebecca Lancefield, em 1933. Esses antígenos correspondem a polissacarídeos associados à parede celular ou a ácidos teicóicos presentes no espaço entre a membrana e a parede celular. Para realização de testes sorológicos determinantes dessa classificação, faz-se necessário a extração dessa substância por métodos clássicos como o originalmente descrito por Lancefield (1933) que emprega ácido clorídrico a quente; ou ainda os que utilizam ácido nitroso (EL KHOLY; WANNAMAKER; KRAUSE, 1974), formamida (FULLER, 1938), lise enzimática (WATSON; MOELLERING; KUNZ, 1975) ou autoclavação (RANTZ; RANDALL, 1955). Os antígenos presentes nos extratos promovem reações com antissoros específicos e permitem a caracterização das espécies em 20 grupos sorológicos, designados por letras maiúsculas do alfabeto: A, B, C, D, E, F, G, H, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V e W (KILIAN, 1998; SPELLERBERG; BRANDT, 2015).

A princípio, o sucesso desta metodologia foi prontamente reconhecido, particularmente, por discriminar as amostras beta-hemolíticas responsáveis por infecções humanas. Nestes casos, o arranjo em grupos sorológicos apresentava considerável correlação com os resultados obtidos em testes bioquímicos, anteriormente propostos. Entretanto, a sua ampla utilização resultou na constatação de que algumas espécies fisiologicamente não relacionadas podiam apresentar o mesmo grupo antigênico; enquanto que, amostras de estreptococos geneticamente relacionadas podem apresentar antígenos heterogêneos nessa classificação, passando então a confundir a taxonomia dos *Streptococcus* (HARDIE; WHILEY, 1997; FACKLAM, 2002). Além disso, diferentes antígenos de grupo podem encontrados em amostras de uma única espécie e algumas espécies não apresentam estruturas caracterizáveis pelo esquema de Lancefield (SPELLERBERG; BRANDT, 2015).

Em sequência à caracterização sorológica descrita por Lancefield, Sherman em 1937, reunindo os dados até então conhecidos de diferenciação por atividade hemolítica, grupos antigênicos do carboidrato C e testes fenotípicos, propôs a criação de quatro grupos de estreptococos, que foram denominados de piogênico, viridans, láctico e enterococos. O grupo dos piogênicos incluía espécies com características beta-hemolíticas, apresentando os antígenos dos grupos A, B, C, E, F e G, comuns em infecções humanas e animais. O grupo viridans incluiu as espécies frequentemente isoladas da cavidade oral e trato intestinal, que além de não serem beta-hemolíticas, também apresentavam resultados negativos nos testes selecionados para caracterização dos grupos, tais como tolerância a altos valores de pH, concentrações elevadas de cloreto de sódio (6,5% de NaCl) e crescimento a 10°C. O grupo láctico reuniu espécies comumente isoladas de produtos lácticos, não associadas às infecções

humanas, não beta-hemolíticas, incapazes de crescer a 45°C e em meios contendo 6,5% de NaCl. Enquanto que, no grupo dos enterococos foram reunidas as amostras de origem fecal que apresentavam características marcadamente diferentes dos demais grupos, como crescimento em uma ampla faixa de temperatura (10°C a 45°C), em meio contendo 6,5% NaCl e em caldo com pH ajustado para 9,6, além da capacidade de resistir a temperatura de 60°C por 30 minutos. A partir de então, a classificação de Sherman passou a ser a mais amplamente aceita para os estreptococos (*apud* HARDIE; WHILEY, 1997).

Nas duas décadas seguintes (anos 50 e 60), a maioria dos estudos que acarretaram em sugestões e mudanças na estrutura taxonômica do gênero *Streptococcus* relacionavam-se a amostras pertencentes ao grupo viridans, principalmente aquelas isoladas da cavidade oral, (COLMAN; WILLIAMS, 1965; COYKENDALL, 1989). Entretanto, a inclusão de novas espécies e a heterogeneidade observada nas diferentes tentativas de arranjos propostos até então, permaneciam como motivadores de novos estudos taxonômicos. Com isso, na oitava edição do Manual Bergey, de 1974, a descrição de Deibel e Seeley reorganizou o gênero, mais uma vez, em quatro grupos nomeados de I a IV, reunindo 21 espécies. Os autores omitiram a caracterização de Sherman, diante da descoberta de espécies que permeavam os grupos originalmente descritos por este autor (WHITWORTH, 1990; HARDIE; WHILEY, 1997).

A partir da década de 80, com o desenvolvimento de novas técnicas, utilizando principalmente hibridação DNA/DNA, modificações taxonômicas significativas ocorreram, acarretando tanto a transferência de espécies reconhecidas para outros gêneros – como a criação de *Enterococcus* (SCHLEIFER; KILPPER BÄLZ, 1984) e *Lactococcus* (SCHLEIFER *et al.*, 1985) – quanto na inclusão de novas espécies a *Streptococcus*. A diferenciação dos principais gêneros de cocos Gram positivos catalase negativos passou a ser, portanto, mais facilmente determinada pelo emprego de diferentes métodos moleculares. Entretanto, um conjunto de provas que conjuga características morfológicas e fisiológicas é, também, eficaz na caracterização dos principais gêneros associados ao hospedeiro humano e animais, contribuindo para caracterização tradicional destes microrganismos.

O avanço das técnicas moleculares culminou com uma nova classificação para os estreptococos, em 1995, sugerida por Kawamura e colaboradores. Estes autores, avaliando sequências do gene que codifica o rRNA 16S dividiram o gênero *Streptococcus* em seis grupos principais: bovis, salivarius, mutans, mitis, anginosus ou milleri e piogênico.

Em 2002, Facklam considerando que a taxonomia de *Streptococcus*, apesar de refletir os avanços obtidos com as técnicas moleculares (como hidridização DNA-DNA,

sequenciamento do gene que codifica 16S rRNA, entre outras), que proporcionaram delinear um painel do relacionamento filogenético entre as espécies, resultaram em numerosas e variadas alterações, que terminaram por complicar o reconhecimento das espécies pelos métodos utilizados nos laboratórios de rotina que se valem de diferentes testes como: aglutinação de antígenos a carboidratos – grupos de Lancefield, detecção de enzimas como a pirrolidina aminopeptidase e β -glicuronidase, hidrólise de hipurato, susceptibilidade a bacitracina, detecção da formação de acetoína a partir de glicose – teste de Voges-Proskauer – e detecção do fator CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen). Assim, considerando que o teste chave para agrupar os estreptococos seria a atividade hemolítica em ágar sangue, o autor separou o gênero em dois grandes grupos: os β -hemolíticos e os não β -hemolíticos. Ambos os grupos apresentavam subdivisões, definidas por características fenotípicas, ressaltando a necessidade de sua identificação e com a intenção de favorecer a classificação no diagnóstico clínico. No primeiro, agrupou as espécies beta-hemolíticas e, no segundo, alocou o *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus suis* e os grupos bovis, salivarius, mutans, sanguinis, mitis e anginosus (não β -hemolíticos).

Em 2006, em um trabalho de revisão, Köhler reúne os dados até então obtidos pelos diversos autores, reporta a importância do arranjo dos estreptococos em grupos filogenéticos, inclui espécies recém-descobertas e destaca a necessidade da utilização da metodologia de sequenciamento de genes alvo, particularmente *rrs* que codifica o rRNA 16S. Análises da similaridade entre as sequências tanto deste quanto de outros genes, como o gene responsável pela expressão de superóxido dismutase manganês-dependente (gene *sodA*) e aquele que codifica a subunidade B da RNA polimerase (gene *rpoB*), tem sido indicadas como ferramentas importantes para a caracterização de novas espécies, (POYART *et al.*, 1998, 2002; DRANCOURT *et al.*, 2004; PINHO *et al.*, 2016; SHEWMAKER *et al.*, 2012; VELA *et al.*, 2011).

A taxonomia do gênero permanece dinâmica e nestes últimos dez anos pode-se observar a inclusão de novas espécies, bem como a realocação de outras. Dessa forma, de acordo com LPSN (*List of prokaryotic names with standing in nomenclature* <<http://www.bacterio.net>>, último acesso em maio de 2017), o gênero *Streptococcus* está atualmente constituído cerca de 100 espécies e subespécies. São elas: *S. acidominimus*, *S. agalactiae*, *S. alactolyticus*, *S. anginosus* subsp. *anginosus*, *S. anginosus* subsp. *whileyi*, *S. australis*, *S. caballus*, *S. cameli*, *S. canis*, *S. caprae*, *S. caprinus*, *S. castoreus*, *S. constellatus* subsp. *constellatus*, *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, *S. constellatus* subsp. *viborgensis*, *S. criceti*, *S. cristatus*, *S. cuniculi*, *S. danieliae*, *S. dentapri*, *S. dentasini*, *S. dentiloxodontae*, *S. dentirousetti*, *S. devriesei*, *S. didelphis*, *S. downei*, *S.*

dysgalactiae subsp. *dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. entericus*, *S. equi* subsp. *equi*, *S. equi* subsp. *ruminatorum*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. equinus*, *S. ferus*, *S. gallinaceus*, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. gordonii*, *S. halichoeri*, *S. halotolerans*, *S. henryi*, *S. hongkongensis*, *S. hyointestinalis*, *S. hyovaginalis*, *S. ictaluri*, *S. infantarius* subsp. *coli*, *S. infantarius* subsp. *infantarius*, *S. infantis*, *S. iniae*, *S. lactarius*, *S. loxodontisalivarius*, *S. lutetiensis*, *S. macacae*, *S. marimammalium*, *S. marmotae*, *S. massiliensis*, *S. merionis*, *S. minor*, *S. mitis*, *S. moroccensis*, *S. mutans*, *S. oligofermentans*, *S. oralis* subsp. *dentisani*, *S. oralis* subsp. *oralis*, *S. oralis* subsp. *tigurinus*, *S. oricebi*, *S. oriloxodontae*, *S. orisasini*, *S. orisratti*, *S. orisuis*, *S. ovis*, *S. panodontis*, *S. pantholopis*, *S. parasanguinis*, *S. parasuis*, *S. parauberis*, *S. peroris*, *S. pharyngis*, *S. phocae* subsp. *phocae*, *S. phocae* subsp. *salmonis*, *S. pleomorphus*, *S. pluranimalium*, *S. plurextorum*, *S. pneumoniae*, *S. porci*, *S. porcinus*, *S. porcorum*, *S. pseudopneumoniae*, *S. pseudoporcinus*, *S. pyogenes*, *S. ratti*, *S. rifensis*, *S. rubineri*, *S. rupicaprae*, *S. salivarius* subsp. *salivarius*, *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, *S. saliviloxodontae*, *S. sanguinis*, *S. sinensis*, *S. sobrinus*, *S. suis*, *S. tangierensis*, *S. thermophilus*, *S. thoralensis*, *S. tigurinus*, *S. troglodytae*, *S. troglodytidis*, *S. uberis*, *S. urinalis*, *S. ursoris*, *S. vestibularis*.

As espécies do gênero são exigentes em termos nutricionais, tornando necessário o uso de meios de cultura complexos. Apresentam crescimento ótimo na temperatura de cerca de 37°C. A parede celular é composta principalmente de peptidoglicana associada a uma variedade de carboidratos, ácido teicóico e antígenos proteicos de superfície. Açúcares aminados e glicosamina também estão sempre presentes na composição da peptidoglicana, enquanto galactosamina só constitui a parede celular de algumas espécies. São capazes de formar cápsulas de ácido hialurônico nas primeiras fases de crescimento, enquanto que uma cápsula polissacarídica é detectável na superfície de amostras pertencentes à espécie *S. pneumoniae* (SPELLERBERG; BRANDT, 2015).

As metodologias utilizadas frequentemente na rotina laboratorial para identificação das amostras de estreptococos beta-hemolíticos de origem humana de maior prevalência como *S. pyogenes* e *S. agalactiae*, são limitadas a avaliação da susceptibilidade à bacitracina (com a utilização de discos impregnados com 0,04U deste antimicrobiano), produção do fator CAMP, que atua sinergicamente com a beta-hemolisina produzida por *Staphylococcus aureus*, e a caracterização sorológica para os grupos de Lancefield. Além destes, *S. pneumoniae* é diferenciado de outros estreptococos alfa-hemolíticos pelos testes de susceptibilidade à optoquina e solubilidade em presença de bile (DUARTE, 2000).

Por outro lado, caracterização das demais espécies de *Streptococcus*, que não são rotineiramente identificadas com precisão por métodos sorológicos, envolve a utilização de uma grande variedade de testes fisiológicos, que inclui a verificação da produção de ácidos a partir de determinados açúcares e álcoois, decarboxilação da arginina, hidrólise da esculina, do amido e do hipurato, utilização do piruvato de sódio, redução do meio de leite de Litmus, crescimento em presença de telurito e de tetrazólio, tolerância a determinadas temperaturas, a concentrações de cloreto de sódio e a bile, formação de polissacarídeos extracelulares a partir de sacarose, produção das enzimas pirrolidonil arilamidase e leucina aminopeptidase (SPELLERBERG; BRANDT, 2015). A realização desta bateria de testes é laboriosa e frequentemente não está incluída na rotina diagnóstica. Sistemas comerciais de identificação rápida, como API20 Strep, Rapid ID 32 Strep entre outros são também recomendados. Estes sistemas incluem os testes convencionais, como a utilização de açúcares e testes para detecção de enzimas (por exemplo, β -glicuronidase, β -galactosidase, fosfatase alcalina e leucina aminopeptidase), que são úteis na caracterização das espécies. Porém, esses sistemas falham frequentemente na caracterização das espécies mais recentes por não contemplarem os testes necessários para sua identificação (SPELLERBERG; BRANDT, 2016)

Assim, métodos moleculares têm sido aplicados nos estudos relativos à caracterização das espécies de *Streptococcus*, bem como na rotina diagnóstica, no intuito de aumentar a precisão e substituir os testes fisiológicos laboriosos que demandam um longo tempo na obtenção dos resultados. Dentre estes, a utilização da metodologia da reação em cadeia da polimerase – PCR (*polymerase chain reaction*) tem sido proposta e diversos estudos tem se dedicado ao desenvolvimento de protocolos espécie-específicos e para variados genes alvo e caracterização rápida desses microrganismos (GRINWIS *et al.*, 2009; ING *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013; MORICONI *et al.*, 2017; SHOME *et al.*, 2012).

Mais recentemente, uma ferramenta útil que tem sido empregada na identificação dos microrganismos é a espectrometria de massa por tempo de voo com ionização e dessorção a laser assistida por matriz (no inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS). Os sistemas disponíveis e mais utilizados para a caracterização bacteriana empregando MALDI-TOF são *MALDI Biotyper Systems*, comercializado pela Bruker Co. (Billerica, MA, EUA); e *VITEK® MS*, da bioMérieux (Marcy-l'Étoile, França), que se baseiam na formação de espectros de análise de proteínas, principalmente as ribossomais, que juntos compõem um perfil próprio específico que então é comparado com um banco de dados como referência, realizando assim a identificação (MURRAY, 2012).

A metodologia de MALDI-TOF MS já foi aplicada com sucesso à caracterização de diversos microrganismos, incluindo espécies do gênero *Streptococcus*, tendo a rapidez e custo benefício como suas vantagens principais (AGERGAARD *et al.*, 2017; ALATOOM *et al.*, 2011; ALMUZARA *et al.*, 2016; BIZZINI *et al.*, 2010; CHERKAOUI *et al.*, 2010; CLARK *et al.*, 2013; LASCH *et al.*, 2014; MANI; THACHIL; RAMACHANDRAN, 2017; McELVANIA *et al.*, 2013; MITCHELL *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2017; SCHULTHESS *et al.*, 2013; WOJEWODA, 2013). Os avanços em tecnologia da informação/ciência da computação e desenvolvimento de bancos de dados abrangentes e bem validados de espectros de massa representando diversos tipos de bactérias e fungos possibilitaram a automação do MALDI-TOF MS e análise de dados associados, fornecendo uma ferramenta para identificação de organismos e aplicação ao diagnóstico microbiológico. Dessa forma, o emprego dessa metodologia na caracterização bacteriana, particularmente no diagnóstico das infecções humanas, tem representado um avanço nessa área, por conjugar a rapidez dos resultados com o baixo custo do teste, apesar do equipamento ainda apresentar um valor elevado (MURRAY, 2012).

Sistemas mais avançados de caracterização bacteriana incluem as análises de sequenciamento de genoma completo – WGS (*whole-genome sequence*). De fato, o emprego desta metodologia ao diagnóstico bacteriano, ainda representa uma alternativa de custo elevado e, portanto, de baixa aceitação. Entretanto, os métodos de sequenciamento de última geração fornecem de uma única vez dados relativos à resistência e a virulência, além de informações relativas à diversidade bacteriana na investigação de surtos. Com o emprego desta metodologia são obtidos resultados de eficácia incomparável na caracterização rápida das espécies bacterianas, taxonomia, metagenômica de amostras clínicas e vigilância de patógenos, representando uma tendência eficaz reconhecida das análises microbiológicas para um futuro próximo (CROUCHER *et al.*, 2013; DEURENBERG *et al.*, 2017; GAIARSA *et al.*, 2015).

Virulência e Infecções Causadas por *Streptococcus*

Os microrganismos pertencentes ao gênero podem ser isolados a partir de uma ampla diversidade de sítios anatômicos em animais de sangue quente e em seres humanos, seja compondo a microbiota anfibiótica ou como agentes patogênicos. Três fatores são citados como os responsáveis pelo sucesso do gênero estar presente em diferentes hospedeiros: habilidade para aderir na maioria das superfícies presentes no meio ambiente; capacidade de utilizar rapidamente nutrientes presentes em um meio em constante mudança e capacidade de tolerar, resistir ou até mesmo destruir as defesas do hospedeiro (SPELLERBERG; BRANDT, 2015).

Várias espécies são capazes de expressar adesinas, que reconhecem componentes do soro, da matriz extracelular (como fibronectina e plasminogênio) e das células do hospedeiro, ou ainda, de outros microrganismos. Também, enzimas glicolíticas como a frutose bifosfato aldolase, a enolase e gliceraldeído-fosfato-desidrogenase possuem um papel crucial na patogênese de *Streptococcus* (FULDE *et al.*, 2013; NOGUEIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Essas características facilitam a presença nos mais diversos processos infecciosos como cárie, faringite, meningite, endocardite, gangrena, infecções nos tratos geniturinário e respiratório, sepse e uma gama infecções em animais (BROUWER *et al.*, 2016; LUKOWSKI *et al.*, 2017; SEGURA *et al.*, 2016; WILKENING; FEDERLE, 2017). Além disso, esses microrganismos também são capazes de expressar diversas toxinas que agem sobre as células do hospedeiro trazendo prejuízos à ação do sistema imune, beneficiando os processos de invasão do microrganismo. O repertório de toxinas exibido por *Streptococcus* inclui hemolisinas, proteases e superantígenos (BARNETT *et al.*, 2015).

S. pyogenes, ou estreptococos do grupo A de Lancefield, é um dos mais importantes patógenos no gênero e exclusivo de seres humanos, sendo o agente etiológico de diversas infecções em humanos, com graus variados de severidade, porém, o trato respiratório superior (causando faringite estreptocócica) e a pele (causando impetigo) são os principais sítios de infecção e de transmissão. Estão, portanto, associados tanto a infecções superficiais quanto profundas graves, particularmente devido à expressão de toxinas, superantígenos e mecanismos mediados pelo sistema imune do hospedeiro. Algumas cepas têm emergido como causas graves de doenças invasivas, destacando-se a síndrome do choque tóxico estreptocócico e a fascite necrosante (AL-AJMI *et al.*, 2012; JAGGI, 2011; LYNSKEY; LAWRENSON; SRISKANDAN, 2011; WILKENING; FEDERLE, 2017).

A proteína M é um importante fator de virulência nesta espécie. Presente também em outras espécies, esse antígeno de superfície permite uma evasão da fagocitose por células do hospedeiro. Essa molécula possui uma porção N terminal muito variável, caracterizando um tipo específico para cada antígeno. Esse fato foi explorado por Lancefield, ao utilizar antissoros diferentes para testar subtipos de *S. pyogenes* (FISCHETTI, 2016; McMILLAN *et al.*, 2013; METZGAR; ZAMPOLLI, 2011). Além da proteína M, outros fatores de virulência são importantes para espécie como DNase, hialuronidase, C5a peptidase, enzimas que degradam IgG, exotoxina pirogênica Spe A e C e estreptoquinase (CUNNINGHAM, 2000; McARTHUR *et al.*, 2012; OLSEN; MUSSER, 2010; STEER *et al.*, 2012).

Outra espécie relevante é *S. agalactiae*, ou estreptococos do grupo B de Lancefield que foram, inicialmente, reconhecidos como patógenos importantes em mastite bovina. Causa sepse neonatal, tendo como principal fator de risco a colonização do trato genitourinário e gastrointestinal da gestante. É responsável, também, por doenças invasivas em adultos, geralmente associadas a infecções pós-parto ou em pacientes imunossuprimidos e portadores de doenças de base, como indivíduos soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana – HIV, diabete, câncer, dentre outras (NAN *et al.*, 2015; PEROVIC *et al.*, 1999; VORNHAGEN; ADAMS WALDORF; RAJAGOPAL, 2017). Como causador de mastite bovina, apresenta um impacto relevante na produção de leite, sendo capaz de sobreviver por longos períodos dentro da glândula mamária. A transmissão pode ocorrer de animal para animal, devido à falta de higiene do ordenhador, através das mãos e equipamentos contaminados (DEB *et al.*, 2013; KEEFE, 2012).

S. pneumoniae é considerado um dos agentes mais comuns de pneumonia adquirida na comunidade e uma das principais causas de meningite, bacteremia, otite média aguda e sinusite, principalmente em crianças com idade inferior a cinco anos, idosos e pessoas imunocomprometidas (OGUNNIYI *et al.*, 2007; WEISER, 2010). Os pneumococos podem fazer parte da microbiota anfibiótica do trato respiratório superior e apesar dessa colonização ser assintomática pode progredir para doença respiratória ou até mesmo sistêmica uma vez que o patógeno é capaz de atingir sítios originalmente estéreis, como ouvido médio, pulmões e corrente sanguínea. A doença pneumocócica é então precedida pela colonização nasofaríngea, a qual pode ser considerada uma importante fonte de transmissão horizontal do referido patógeno na comunidade (BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004). Os membros desta espécie apresentam uma cápsula de natureza polissacarídica que constitui sua camada mais externa e encontra-se covalentemente associada à parede celular. A produção da cápsula é importante para a virulência dos pneumococos e está intimamente associada à resistência a

fagocitose no hospedeiro (PÉREZ-DORADO; GALAN-BARTUAL; HERMOSO, 2012). Outros fatores de virulência também contribuem para a patogênese do *S. pneumoniae*, tais como a autolisina (LytA), pneumolisina (Ply), o antígeno de superfície pneumocócica A (PsaA), e a proteína de superfície pneumocócica A (PspA), os quais podem atuar também como alvos de identificação molecular do microrganismo e vem sendo considerados para o desenvolvimento de novas vacinas (JEDRZEJAS, 2001; KADIOGLU *et al.*, 2008; NAKAGAWA *et al.*, 2010).

Em relação às espécies mais relacionadas às infecções em animais pode-se destacar *S. equi* subsp *equi* e o *S. equi* subsp *zooepidemicus*, que expressam o antígeno de grupo C de Lancefield. O primeiro é um patógeno animal, reconhecido agente de infecções do trato respiratório em equinos (garrotilho). O segundo é isolado de infecções humanas, mas também é causa frequente de mastite em bovinos. *S. equi* subsp *zooepidemicus* apresenta uma proteína de superfície característica (Szp), antigenicamente variável e estruturalmente semelhante à proteína M (EYRE *et al.*, 2010; TIMONEY, 2014). A espécie *S. uberis* destaca-se como agente etiológico de mastite bovina, causando infecções crônicas e persistentes, que apesar das estratégias de prevenção, é de difícil controle. *S. uberis* é capaz de sobreviver intracelularmente por longos períodos, proporcionando um microambiente adequado para a persistência da infecção (LEIGH, 1999; TAMILSELVAN *et al.*, 2006). O *S. canis* é isolado da pele, trato respiratório superior e genital em cães causando aborto séptico, vaginites, mastites, síndromes análogas ao choque tóxico e fascite necrosante; pode também ser responsável por mastite em bovinos (incluindo subclínica) e por artrite séptica e linfadenite em gatos (FULDE; VALENTIN-WEIGAND, 2013; SYKES, 2014).

Já a espécie *S. suis*, que apresenta os antígenos R, S ou T de Lancefield, é um importante patógeno zoonótico, estando envolvido em infecções em suínos e podendo ser transmitido aos seres humanos pelo contato com animais doentes ou através da ingestão de carne ou produtos derivados crus. Nos seres humanos, é causador de infecções severas como meningite, artrite e síndrome do choque tóxico, podendo ser fatal. Este microrganismo apresenta adesinas específicas para componentes da matriz extracelular, células epiteliais e endoteliais, bem como uma cápsula polissacarídica, que contribui para sua disseminação e virulência (FITTIPALDI *et al.*, 2012; GOYETTE-DESJARDINS *et al.*, 2014; SEGURA *et al.*, 2017).

S. porcinus e *S. pseudoporcinus* são espécies altamente relacionadas cuja caracterização precisa é dependente de testes moleculares. A primeira foi originalmente descrita por Collins e colaboradores, em 1984, como capaz de expressar os antígenos dos

grupos E, P, U e V, sendo um importante agente etiológico da linfadenite estreptocócica em suínos, podendo causar também abscessos, pneumonia e sepse nesses animais. Apesar de estar mais associada às infecções em suínos, a espécie *S. porcinus* já foi descrita a partir de infecção em humanos (SHEWMAKER *et al.*, 2012). *S. pseudoporcinus* foi recentemente caracterizada a partir de amostras provenientes de trato genitourinário de mulheres, que haviam sido erroneamente caracterizadas como *S. porcinus* (BEKAL *et al.*, 2006). Membros da espécie *S. pseudoporcinus* são fisiologicamente semelhantes à *S. agalactiae*, podendo inclusive apresentar reação cruzada com antissoro do grupo B de Lancefield, sendo este fato também associado à *S. porcinus* (SHEWMAKER *et al.*, 2012; SUWANTARAT *et al.*, 2015).

Para a maioria das espécies de *Streptococcus*, a cronicidade das infecções, em humanos ou animais, leva a um pior prognóstico e a possibilidade de falhas terapêuticas (BALDASSARRI *et al.*, 2006; CAGGIANO *et al.*, 2017; DAGAN *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2016; LORA-TAMAYO, 2017; MARTIN *et al.*, 2015). Infecções crônicas podem estar associadas à formação de biofilmes que proporcionam um refúgio tanto frente às células do sistema imune do hospedeiro, quanto de antimicrobianos; atuando como um reservatório de microrganismos altamente munidos de diversos mecanismos de virulência, sabidamente competentes a atuar em um processo infeccioso (HØIBY, 2017; MOSER *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2017).. Dentre as espécies do gênero, *S. mutans*, *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* são as que apresentam um maior número de trabalhos relacionados na literatura especializada. Enquanto que, para as demais os dados são raros ou inexistentes.

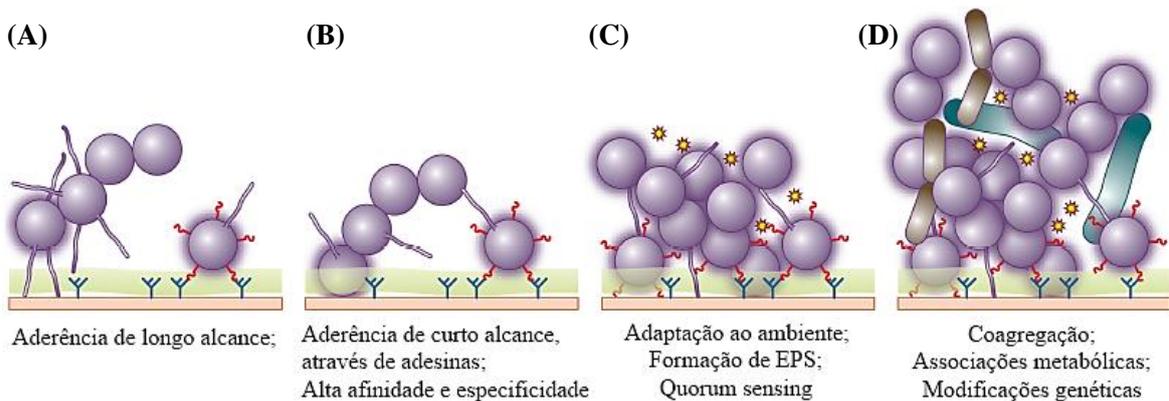
Infecções Estreptocócicas Associadas a Biofilmes

Biofilmes são comunidades organizadas onde microrganismos crescem e sobrevivem aderidos a superfícies ou interfaces, envolvidos por uma matriz constituída de substâncias poliméricas extracelulares (DONLAN, 2002). Inicialmente o termo “biofilme” foi usado de maneira coloquial e só foi publicado cientificamente em 1977 por Harremoës, no artigo "*Half-order reactions in biofilm and filter kinetics*". Em 1978, Costerton e colaboradores conceituaram biofilmes como células isoladas e microcolônias embebidas em uma grande e hidratada matriz composta, predominantemente, de exopolímeros. Já em 1995, o mesmo grupo de pesquisadores estendeu este conceito, explicando os mecanismos pelo quais os microrganismos aderem aos materiais bióticos e abióticos e os benefícios acumulados por este

nicho, e demonstraram que a adesão desencadeia a expressão dos genes que controlam a produção de componentes bacterianos necessários para o processo como um todo, que seria regulado por genes específicos transcritos durante a adesão inicial da célula.

A formação do biofilme pode ser dividido em etapas: adesão e interação célula a célula, formação de microcolônias, formação de um biofilme confluyente e desenvolvimento de uma estrutura tridimensional (DONLAN; CONSTERTON, 2002; O'TOOLE *et al.*, 2000), conforme exemplificado na FIGURA 1.

Figura 1 – Esquema representativo da sequência temporal da formação de biofilmes por *Streptococcus*



Legenda: (A) Inicialmente, as células bacterianas se associam a superfície (colonizadores primários), utilizando interações de “longo alcance”, como pili, que, quando *in vivo* podem, inclusive, atravessar a camada de muco, presente na superfície de células eucarióticas. (B) Em seguida, interações mais fortes são estabelecidas, com a expressão de múltiplas adesinas, representadas como apêndices mais curtos. (C) A adaptação nutricional e ao ambiente, a expressão de moléculas sinalizadoras (representadas como estrelas), que acarretam o desencadeamento de mecanismos geneticamente regulados por *Quorum sensing*, e a produção de substância polimérica extracelular (EPS, matriz extracelular) determinam o acúmulo e aparecimento de agregados celulares. (D) A incorporação de outros micro-organismos, coagregação e sinalização, permitem o desenvolvimento de “comunidades” complexas, que contêm associações específicas com a rede metabólica, conferindo uma maior eficiência na utilização dos nutrientes e reduzindo a susceptibilidade aos antimicrobianos e às defesas do hospedeiro.

Fonte: Adaptado de Nobbs (2009).

Todo o processo é dirigido pelo fenômeno de *quorum sensing*, através da participação de moléculas sinalizadoras, que determinam a expressão gênica de acordo com a densidade populacional (MAJUMBAR; MONDAL, 2017; WILLIAMS *et al.*, 2007). A adesão inicial ocorre quando os colonizadores primários interagem com proteínas e outros compostos orgânicos através de ligações físico-químicas. A interação célula a célula e formação de microcolônias são etapas dependentes das condições ambientais, tais como temperatura, pH, níveis de oxigênio, hidrodinâmica, osmolaridade e a presença de determinados íons, nutrientes e fatores derivados do meio biótico. Esses fatores incidem nas vias de regulação dos elementos enzimáticos e estruturais que são necessários para a formação e dispersão, determinando o padrão comportamental de uma espécie bacteriana no desenvolvimento de seu biofilme (COSTERTON *et al.*, 1987; DUNNE JR, 2002; GOLLER; ROMEO, 2008; LAPPIN-SCOTT; BASS, 2001).

Na adesão inicial, as fímbrias e flagelos desempenham um importante papel, pois são capazes de romper a barreira eletrostática promovida pela hidrofobicidade da própria célula em contato com a superfície do substrato (DONLAN, 2002; JAMES *et al.*, 2017). Estudos têm demonstrado que a maioria dos microrganismos adere mais rapidamente às superfícies hidrofóbicas, como plásticos, do que hidrofílicas como vidro e metais (FRANCOLINI *et al.*, 2017; GLAUSER *et al.*, 2017; GOLLER; ROMEO, 2008; SÁNCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2017).

Após o desenvolvimento em condições adequadas, os colonizadores primários passam a ser substrato para a aderência de secundários, saindo da condição de microcolônias para uma grande comunidade bacteriana. Durante esse processo, há um aumento na produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) criando uma matriz em torno das células. Para garantir a circulação de nutrientes e demais moléculas necessárias para o desenvolvimento do biofilme, os grupos de células são separados por canais (BERLANGA; GUERRERO, 2017; FLEMMING, 2016; GUILHEN *et al.*, 2017; STEWART; FRANKLIN, 2008).

Toda essa sequência garante que a comunidade esteja aderida irreversivelmente ao substrato, iniciando, logo em seguida, o processo de maturação do biofilme. Neste momento, há um aumento na densidade celular dos grupos formados, levando a uma maior complexidade. Essa expansão prossegue até alcançar um equilíbrio dinâmico, onde as células mais externas do biofilme se destacam, partindo para dar início a uma nova etapa de colonização (DUNNE JR, 2002; MARSHAL, 1992). O fluxo de fluídos externos ao biofilme, onde o substrato se encontra, pode promover esse destacamento, porém esse processo também pode ser realizado ativamente, através das enzimas secretadas pelas bactérias que quebram a

matriz extracelular, liberando-as (KIM; LEE, 2017; NADELL *et al.*, 2009; PETROVA; SAUER, 2016; TELGMANN *et al.*, 2004).

Foi observado que mutantes deficientes para produção de EPS não foram capazes de formar biofilme, revelando sua importância na adesão inicial e suporte estrutural para a comunidade (MADSEN *et al.*, 2015; NADELL *et al.*, 2009; SCHAEFFER *et al.*, 2016). As propriedades físicas e químicas das substâncias poliméricas extracelulares podem variar, é predominantemente aniônico, podem ser compostos por íons metálicos, cátions divalentes e outras macromoléculas como proteínas, DNA e lipídios (BRIANDET *et al.*, 2001; DONLAN, 2002; DUNNE JR, 2002; GHIGO, 2003).

Todos os aspectos envolvidos na vida celular como propriedades fisiológicas, genéticas, interações físico-químicas irão influenciar no biofilme (LANDINI *et al.*, 2010). Devido a grande densidade celular, notoriamente superior a uma cultura de células planctônicas, as células aderidas encontram limitações no aporte de oxigênio e nutrientes, e níveis elevados de metabólitos secundários e substâncias excretadas, acarretando na formação de subpopulações localizadas em diferentes regiões, apresentando expressões gênicas e condições fisiológicas e metabólicas diferentes (Sporman, 2008). No entanto, essa expressão diferencial é causa, também, da própria heterogeneidade global, que é encontrada dentro do biofilme, no que tange ao gradiente químico de difusão em microescalas (STEWART; FRANKLIN, 2008). As alterações que ocorrem nas células aderidas quando comparadas com as planctônicas passam por diversos aspectos como a expressão de pili e flagelos, produção de polissacarídeos e até mesmo na morfologia (JEFFERSON, 2004). Estas alterações, na expressão gênica das células do biofilme, levam a um perfil metabólico diferente das células não aderidas, fazendo com que seu crescimento seja mais lento (ANDERL *et al.*, 2003; ANDERSON; O'TOOLE, 2008; BORRIELLO *et al.*, 2004; CABALLERO *et al.*, 2013; DONLAN; COSTERTON, 2002; PIRES *et al.*, 2016; ROMERO-LASTRA *et al.*, 2017).

Essa mudança no comportamento metabólico tem sido apontada como um mecanismo de escape aos agentes antimicrobianos, conferindo maior resistência. Um biofilme maduro pode tolerar concentrações 10-1000 vezes maiores que as necessárias para matar células planctônicas (BOUDJEMAA *et al.*, 2016; CHUA *et al.*, 2016; GARRISON *et al.*, 2016; HOLMBERG; RASMUSSEN, 2016; LEWIS, 2001; URISH *et al.*, 2016). Uma gama de agentes antimicrobianos age em moléculas relacionadas a síntese, portanto o lento ou o não crescimento dessas células, as tornem menos susceptíveis a sua ação (RANI *et al.*, 2007; HØIBY *et al.*, 2010). Além disso, a própria matriz extracelular funciona como uma barreira física, impedindo a difusão dos agentes, levando a concentrações inferiores as inibitórias no

interior do biofilme e em alguns casos moléculas como DNA, polissacarídeos e proteínas interagem com o antimicrobiano, acarretando na diminuição de sua ação (DONLAN; COSTERTON, 2002). O ambiente enclausurado do biofilme também propicia a aquisição de determinantes de resistência por facilitar os processos de transferências de genes, além de conferir uma maior resistência à fagocitose dificultando a ação de defesa pelo hospedeiro (DAVEY; O'TOOLE, 2000; LEWIS, 2001). Membros do gênero *Streptococcus* são conhecidos por formarem biofilmes em diferentes sítios anatômicos como superfície do dente, válvulas cardíacas e amígdalas, além de dispositivos médicos implantados (AN *et al.*, 2017; CHAO *et al.*, 2017; JUNG *et al.*, 2015; MOSCOSO *et al.*, 2006).

Um formador já bem estudado é o *Streptococcus mutans* que consiste em um notável exemplo da formação de biofilme pela microbiota oral, sendo o principal agente etiológico da cárie dental, prevalente na quase totalidade dos casos (COSTALONGA; HERZBERG, 2014; HANADA, 2000; JOHANSSON *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2017; MATSUI; CVITKOVITCH, 2010). Três fatores são fundamentais para o início e progressão da cárie: (i) habilidade para metabolizar carboidratos da dieta e produzir ácido lático (acidogenicidade), (ii) habilidade para crescer e sobreviver em ambiente de baixo pH (aciduricidade) e (iii) capacidade de utilizar de açúcares da dieta para produzir polímeros e formar o biofilme (BAKER *et al.*, 2017; BOWEN *et al.*, 2016; KLEIN *et al.*, 2015; SENADHEERA; CVITKOVITCH, 2008). A formação de biofilmes no dente é iniciada por interações específicas entre adesinas do *S. mutans* e receptores tanto do hospedeiro, como de outras bactérias como *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*, que servem como pioneiros que iniciam a formação do biofilme. Esses colonizadores primários possibilitam a adesão dos secundários, criando uma diversidade dentro da comunidade bacteriana (KOLENBRANDER, 2000; KOLENBRANDER *et al.*, 2002; RICKARD *et al.*, 2003).

S. mutans coloniza a superfície dental via mecanismos sacarose dependente e independente. Na presença deste açúcar, enzimas glicosiltransferase (GTF), codificadas pelos genes *gtfB*, *C* e *D*, produzem polímeros insolúveis em água, que juntamente com proteínas ligantes de glucana (GBPs), desempenham um papel chave na adesão e acúmulo do biofilme (BANAS; VICKERMAN, 2003; NOBBS *et al.*, 2009). O mecanismo independente de sacarose é mediado pela proteína associada à superfície, P1 (SpaP), que é uma adesina multifuncional que facilita a ligação do microrganismo aos componentes do esmalte bem como ao colágeno e a outras proteínas do hospedeiro (LEMOS *et al.*, 2005).

A espécie *S. pneumoniae* tem sido outro modelo dentro do gênero, onde os estudos em biofilmes têm estado mais concentrados. Recentemente, a formação de biofilme ganhou

atenção por uma possível participação na adaptação a diferentes condições e na virulência desse microrganismo. Diversos estudos têm associado alguns tipos de infecções como otite média e meningite, assim como a colonização da nasofaringe à capacidade de formar biofilme (CAMILLI *et al.*, 2011; GILLEY; ORIHUELA, 2014; HALL-STOODLEY *et al.*, 2006; O'BRIEN *et al.*, 2009; PRINCIPI *et al.*, 2017).

Outra espécie associada à produção de biofilme e patogênica para o ser humano é *S. pyogenes*, sendo uma das primeiras observações realizadas por Akiyama e colaboradores (2003), em um estudo com amostras associadas a infecções da pele. Os autores observaram, através de microscopia confocal de varredura a laser, que as células bacterianas apresentavam-se organizadas nas lesões na forma de microcolônias, que pareciam estar envolvidas por uma matriz. Desde então, outros estudos vêm documentando a habilidade dos microrganismos dessa espécie em formar biofilme e revelando características importantes como o papel crucial da proteína M no estabelecimento dessas estruturas, assim como de outros fatores, incluindo adesinas como AspA, SCL1 e SpeB (COURTNEY *et al.*, 2009; DOERN *et al.*, 2010; LEMBKE *et al.*, 2006; MANETTI *et al.*, 2010; MADDOCKS *et al.*, 2011; OLIVER-KOZUP *et al.*, 2013; THENMOZHI *et al.*, 2011).

A formação de biofilme também pode ter um importante papel na patogenicidade de *S. agalactiae* (ISIAKU *et al.*, 2017; KAUR *et al.*, 2009; PARKER *et al.*, 2016; RINAUDO *et al.*, 2010). Esses microrganismos já foram identificados em dispositivos intrauterinos em associação com *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (DONLAN; COSTERTON, 2002). Já em 2009, Kauer demonstrou que amostras isoladas de mulheres grávidas assintomáticas foram melhores formadoras de biofilmes do que as sintomáticas. Outros estudos revelam a importância do pili na aderência inicial do *S. agalactiae* para a formação do biofilme, principalmente o do tipo 2a (KONTO-GHIORGHI *et al.*, 2009; RINAUDO *et al.*, 2010; SPRINGMAN *et al.*, 2014). Em relação às amostras de *S. agalactiae* envolvidas em casos de mastite bovina, considera-se que a cronicidade da infecção está diretamente relacionada à formação de biofilmes (CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011; MICHIE *et al.*, 2003).

Também, já foi reportado que a mastite causada por *S. uberis*, caracteristicamente crônica e persistente, é um processo relacionado a biofilmes (GÜNTHER *et al.*, 2017; McDOUGALL *et al.*, 2004; MOLIVA *et al.*, 2017; SCHÖNBORN *et al.*, 2017). Além disso, a formação de biofilmes já foi relacionada como um evento importante para a patogênese de outras espécies de *Streptococcus* como *S. sanguinis* (GE *et al.*, 2008), *S. gordonii* (SILVERMAN *et al.*, 2010), *S. parasanguinis* (LIANG *et al.*, 2011) e *S. suis* (WANG *et al.*, 2011).

O paradigma do biofilme vem tomando espaço dentro do estudo da Microbiologia nos últimos anos, pois é cada vez mais notável e perceptível que as células bacterianas quando em seu ambiente natural não estão dispostas, em maioria, na forma planctônica. Sendo assim, o estudo da dinâmica e relação das células sésseis com o hospedeiro demonstra ser mais próximo à realidade, do que em suas culturas puras.

A Espécie *Streptococcus pseudoporcinus*

A espécie *Streptococcus porcinus* foi proposta em 1984 para acomodar estreptococos beta-hemolíticos fisiologicamente relacionados, pertencentes aos grupos sorológicos E, P, U e V, além de três grupos antigênicos experimentais à época (C1, 5916T e 7155A). Estes microrganismos foram descritos como importantes agentes de infecções piogênicas em suínos, como linfadenites, abscessos hemorrágicos, pneumonia, sepses e aborto séptico (COLLINS *et al.*, 1984; PLAGEMANN, 1988). No hospedeiro humano, a presença de *S. porcinus* já foi considerada; entretanto desde 2006, Bekal e colaboradores, realocaram as amostras anteriormente caracterizadas nesta espécie em uma nova entidade taxonômica que denominaram *Streptococcus pseudoporcinus*.

Os membros da espécie *S. pseudoporcinus* são, portanto, cocos Gram-positivos, beta-hemolíticos, que têm sido isolados do trato genitourinário de mulheres e que apresentam características fenotípicas, determinadas em testes fisiológicos convencionais, muito semelhantes a *S. porcinus*, como também a *S. agalactiae* (PEREIRA *et al.*, 2013; SHEWMAKER *et al.*, 2012; SUWANTARAT *et al.*, 2015). Mesmo em frequência reduzida, a presença de *S. pseudoporcinus* associada ao hospedeiro humano tem sido relatada. Além disso, Shewmaker e colaboradores, em 2012, também sugeriu a existência de uma subespécie desses microrganismos que foi associada a bovinos, podendo também como *S. agalactiae* ter envolvimento em quadros de mastite.

De fato a elevada proximidade filogenética dessas espécies determina até o momento que a caracterização das amostras só é realmente realizada de forma eficaz diante de análises de homologia das sequências do genes referendados em estudos de caracterização de espécies bacterianas como por exemplo *rrs*, que codifica o rRNA 16S, e *rpoB*, que codifica a subunidade beta da RNA polimerase (SHEWMAKER *et al.*, 2012; SUWANTARAT *et al.*, 2015)

A prevalência e o real significado clínico da presença de *S. pseudoporcinus* no trato genitourinário feminino, bem como a sua possível associação às infecções no neonato e puerpéricas ainda não foram esclarecidas. É sugerido, entretanto, que esta espécie, diante da extrema semelhança com *S. agalactiae* possa estar sendo subnotificada, particularmente diante da falta de alternativas técnicas nos laboratórios de rotina para sua identificação (STONER *et al.*, 2011; SUWANTARAT *et al.*, 2015).

1 OBJETIVOS

Diante da carência de dados a cerca de *S. pseudoporcinus*, tanto relacionados às características fenotípicas e de virulência, quanto a necessidade de avaliação de métodos complementares para sua identificação, este estudo se propôs a investigar uma coleção de amostras previamente caracterizadas como pertencentes a *S. pseudoporcinus*, em comparação com amostras de referência *S. porcinus*, uma espécie filogeneticamente relacionada, visando contribuir com dados complementares ao entendimento da biologia desses microrganismos.

Desta maneira, foram objetivos específicos deste trabalho:

- a) Caracterizar através de testes fisiológicos as amostras de ambas espécies, na busca de marcadores específicos que favoreçam a identificação da espécie;
- b) Aplicar e avaliar o potencial de identificação por da metodologia de MALDI-TOF MS, incluindo análises de agrupamentos pela aplicação de algoritmos específicos na comparação dos espectros obtidos;
- c) Avaliar a metodologia de análise do perfil de proteínas totais pela técnica de SDS-PAGE, quanto a capacidade de discernimento entre amostras de *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus*;
- d) Comparar sequências obtidas de bancos de dados públicos referentes gene *rss*, que codifica rRNA 16S, em análises filogenéticas como ferramenta de caracterização da espécie;
- e) Avaliar o perfil de susceptibilidade a um conjunto de antimicrobianos, comuns no tratamento das infecções causadas por estreptococos beta-hemolíticos;
- f) Caracterizar atributos relacionados a virulência de *S. porcinus* e *S. pseudoporcinus* através de ensaios de formação de biofilmes de adesão às células de linhagem HeLa;
- g) Analisar comparativamente o perfil proteômico das espécies utilizando espectrometria de massas;
- h) Comparar pelo emprego de algoritmos específicos e em uma análise *in silico*, as sequências disponíveis do genoma completo das amostras tipo de ambas espécies.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras Bacterianas

Foram estudadas 24 amostras de *Streptococcus pseudoporcinus*, sendo 19 de origem humana, incluindo uma derivada da amostra tipo ATCC BAA 1381^T, e cinco de origem animal (isoladas de leite). As amostras de origem humana e de leite foram obtidas no período de 1987 a 2005. Foram também analisadas para fins comparativos seis amostras de *S. porcinus*, incluindo a derivada da amostra tipo ATCC 43138^T desta espécie. As amostras avaliadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo *Streptococcus Laboratory* do *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC (Atlanta, GA, EUA).

As amostras estavam mantidas em tanques de nitrogênio líquido sob a forma de suspensões densas em solução contendo *Skim Milk* (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, EUA) a 10% (p/v) e glicerol (Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas S/A, Rio de Janeiro, Brasil) a 10% (v/v), como estoque da Coleção de Culturas do Laboratório de Apoio Biotecnológico do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a coordenação da Prof^a Lúcia Martins Teixeira.

As amostras bacterianas foram reativadas por semeadura em meio de ágar sangue de carneiro (meio AS, Plast-Labor Ind e Com. Materiais e Equipamentos de Laboratório, Rio de Janeiro, RJ), e incubação em estufa bacteriológica a 36°C ±1°C por 18 h-24 h e em atmosfera contendo 5% de CO₂. Todos os testes incluídos neste estudo foram realizados a partir de uma cultura recente, em meio ágar sangue de carneiro, que foi definida como um subcultivo, obtido nas mesmas condições (a 36°C ±1°C por 18 h-24 h e 5% de CO₂), do crescimento proveniente da suspensão estoque.

2.2 Caracterização das Amostras Bacterianas por Testes Fisiológicos

As amostras bacterianas foram avaliadas por testes fisiológicos convencionais, com base nas recomendações de Facklam (2002) e de Teixeira *et al.* (2005). Além da análise das características morfotintoriais pelo método de Gram, características hemolíticas em meio de

ágar sangue e determinação da ausência da produção de catalase, as amostras foram caracterizadas pelo emprego dos testes descritos abaixo.

2.2.1 Hidrólise de L-Pirrolidonil- β -Naftilamida (Teste do PYR)

Para a execução destes testes, uma suspensão espessa de cada amostra, obtida a partir de um crescimento recente, foi preparada em 0,2 mL de caldo Todd-Hewitt (*Todd-Hewitt Broth*, THB, BD Diag.) contendo 0,01% (p/v) de PYR (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA). Após um período de 4 h de incubação a $36\pm 1^\circ\text{C}$, foram adicionadas duas gotas de solução reveladora, contendo 1% (p/v) dimetilamino cinamaldeído (Sigma-Aldrich Co.) em HCl a 10% (v/v). A leitura do teste foi realizada imediatamente e em até 10 min, após agitação suave. O teste é considerado positivo pelo aparecimento de coloração rosa forte ou púrpura.

2.2.2 Crescimento na Presença de 6,5% de Cloreto de Sódio (Teste do NaCl 6,5%)

As amostras foram inoculadas em meio *Heart Infusion Broth* (HIB, BD Diag.), suplementado com cloreto de sódio na concentração de 6,5% (p/v); 0,1% de solução alcóolica de púrpura de bromocresol (Sigma-Aldrich Co.) a 1,6% (p/v) e 0,1% (p/v) de D-glicose. O resultado positivo é indicado através da turvação do meio, acompanhada ou não da mudança da cor do indicador, de púrpura para amarelo, em até sete dias de incubação na temperatura de $36\pm 1^\circ\text{C}$.

2.2.3 Hidrólise da Arginina

As amostras foram inoculadas em 3 mL do meio *Moeller Decarboxylase Broth* (BD Diag) acrescido de 1% (p/v) de L-arginina (Sigma-Aldrich Co.) e recoberto com uma camada de aproximadamente 5 mm de óleo mineral estéril. Após incubação a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por até sete dias, o surgimento de coloração púrpura, decorrente da alcalinização do meio, devido à hidrólise da arginina e liberação de grupos NH_2 , é indicador de resultado positivo. O aparecimento da coloração amarela, decorrente da acidificação do meio devido ao consumo da glicose sem a concomitante hidrólise da arginina, é indicador de resultado negativo.

2.2.4 Hidrólise da Esculina

Este teste foi realizado pela inoculação das amostras bacterianas em meio *Heart Infusion Agar* (BD Diag.), contendo 0,1% (p/v) de esculina (Sigma-Aldrich Co.) e solidificado inclinado em tubos 13X100 mm, incubados a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por até sete dias. Testes positivos resultam do crescimento bacteriano determinante da hidrólise da esculina em esculetina que reagem com sais de ferro presentes no meio tornando-o enegrecido.

2.2.5 Hidrólise do Hipurato

Foi verificada através da inoculação das amostras em meio de cultura HIB contendo hipurato de sódio (Sigma-Aldrich Co.) a 1% (p/v) e incubação na temperatura de $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18h-24h. Após esse período, os crescimentos serão centrifugados e, ao sobrenadante, adicionado reagente de cloreto férrico na proporção de 1:4 (v/v). O teste positivo é verificado através da observação da formação de um precipitado durante o período de até 10 min em temperatura ambiente.

2.2.6 Utilização do Piruvato de Sódio

A utilização do piruvato de sódio foi avaliada em meio contendo 1% de Triptona (BD Diag.), 0,5% (p/v) de extrato de levedura (BD Diag.), 0,5% (p/v) de K_2HPO_4 (Merck Brasil, Rio de Janeiro, RJ), 0,5% (p/v) de NaCl (Merck Brasil), 0,01% (p/v) do indicador de pH bromotimol e 1% (p/v) de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich Co.). Testes positivos são reconhecidos pelo aparecimento da coloração amarela, resultante da utilização do substrato como fonte única de carbono e acidificação do meio.

2.2.7 Teste de Voges-Proskauer (VP)

A produção de acetilmetilcarbinol pelas amostras estudadas foi observada após transferência do crescimento bacteriano em meio AS para 2 mL de caldo VP, com auxílio de um *swab*, e incubação na temperatura de $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 6 h. A produção deste composto é visualizada após adição dos seguintes reagentes: A, constituído de uma solução alcoólica (etanol) de 5% (v/v) de α naftol; e B, constituído de uma solução de creatina a com 0,3% (p/v)

em hidróxido de potássio a 40% (p/v). A formação de uma coloração avermelhada, em até 30 min em temperatura ambiente, é um indicativo de teste positivo.

2.2.8 Utilização de Carboidratos

Os testes de utilização de carboidratos foram realizados em meio HIB acrescido de 1% (p/v) do respectivo carboidrato e de solução alcoólica do indicador de pH púrpura de bromocresol a 0,1% (p/v). A mudança de cor do indicador de púrpura para amarelo é resultante da utilização do carboidrato e acidificação do meio, determinando a positividade do teste. Os carboidratos testados foram: lactose, manitol, sacarose, sorbitol, trealose e metil- α -glicopiranosídeo. Os testes foram incubados por até sete dias a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.2.9 Teste de CAMP

O teste de CAMP foi realizado através da inoculação em meio AS de uma amostra de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293), produtora de beta-lisina, na forma de uma estria perpendicular e próxima ao inóculo, também em estria, das amostras teste. Após incubação a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18h-24h, os testes positivos foram identificados pelo aumento da extensão da zona de hemólise, na região de interseção do crescimento da amostra de *S. aureus* e da amostra teste, pela ação sinérgica da beta-lisina e de fatores tipo CAMP, respectivamente.

2.3 Caracterização das Amostras Bacterianas por Espectrometria de Massa - MALDI-TOF

2.3.1 Caracterização das Espécies *S. porcinus* e *S. pseudoporcinus*

As amostras foram semeadas em placas de ágar sangue e incubadas a 37°C por 18-24 h em atmosfera contendo 5% de CO₂. A partir do crescimento obtido, três procedimentos diferentes foram realizados: (i) COL – as colônias foram, com auxílio de palitos de madeira, aplicadas diretamente na placa de aço inoxidável polida fornecida pelo fabricante do equipamento (*MSP 96 target polished steel BC*, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha); (ii) FOR – as colônias foram aplicadas diretamente na placa de aço com auxílio de palitos de madeira e, em seguida, 1 µL de ácido fórmico foi adicionado sobre as mesmas; e (iii) as colônias foram depositadas em tubos Protein LoBind (Eppendorf, Alemanha) onde foram adicionados 5 µL de ácido fórmico a 70% e 5 µL de acetonitrila PA (Tedia, EUA), os tubos foram centrifugados (5.000 x g por 3 min) e, posteriormente, 1 µL do sobrenadante contendo o extrato proteico foi aplicado sobre a placa de aço. Nos três métodos, após a aplicação, todos os *spots* da placa foram recobertos com 1 µL da matriz HCCA (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA), constituída por uma solução de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico a 10 mg/mL em acetonitrila a 50% e ácido tricloroacético a 2,5%.

Os espectros foram gerados com auxílio do espectrômetro de massa Microflex LT (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando o software FlexControl no modo automático (MBT_FC.par). A calibração do aparelho foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, utilizando uma amostra padrão da espécie bacteriana *Escherichia coli* J53.

Após a realização da espectrometria, o software gera escores para cada amostra, levando em consideração a comparação do espectro teste com o de referência do banco de dados, comparação reversa do espectro de referência com o teste, e a correlação das intensidades do espectro teste e o de referência. Cada um destes fatores tem um escore máximo de 1,000, levando ao logaritmo (escore) máximo de 3,000. Assim sendo, os escores podem variar de 0,000 a 3,000. Escores entre 0,000 e 1,699 são classificados como "*no reliable identification*", o que significa que não há uma sugestão segura de identificação, nem mesmo de gênero. Escores entre 1,700 e 1,999 são considerados como provável identificação de gênero e uma sugestão de espécie é dada. Por outro lado, escores entre 2,000 e 2,299 são considerados como identificação segura de gênero e provável identificação de espécie, ao

passo que escores entre 2,300 e 3,000 são considerados como identificação segura de gênero e altamente provável identificação de espécie.

2.3.2 Agrupamento das Amostras a partir dos Resultados de MALDI-TOF MS

Para a determinação dos agrupamentos das amostras a partir de MALDI-TOF MS, os espectros foram processados e analisados utilizando o software *BioNumerics* versão 7.1 (Applied Maths, Ghent, East Flanders, Bélgica). Para a construção de árvores representativas do agrupamento das amostras, foram utilizados o coeficiente de correlação de Pearson e o algoritmo *Neighbor Joining*. Os espectros foram também avaliados quanto à presença de biomarcadores específicos das amostras de *S. pseudoporcinus* comparadas as de *S. porcinus*, através da avaliação da presença de picos espécie-específicos.

2.4 Perfis de Proteínas Totais por SDS-PAGE

O procedimento de SDS-PAGE descontínuo foi realizado utilizando o protocolo descrito por Laemmli (1970) com modificações. Preparações solúveis foram aplicadas em reservatórios do gel de empilhamento contendo 4% de acrilamida, preparado com Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8). O gel de separação contendo acrilamida a 10% (p/v) foi preparado com Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8). O tampão de corrida foi composto de Tris-HCl 0,025 M e glicina 0,192 M (pH 8,3). A concentração final de SDS tanto nos géis como no tampão utilizado na cuba foi de 0,1% (p/v).

A eletroforese foi efetuada em um sistema Mini-Protean II (Bio-Rad) sob corrente constante de 20 mA. O final da corrida foi evidenciado pela chegada da linha do indicador à base inferior do gel. Os géis foram corados com uma solução contendo Coomassie Blue R-250 (Bio-Rad) a 0,125% (p/v) em metanol:ácido acético:água na proporção 5:1:4, e descorados com o mesmo solvente. Padrões de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Dual Color Standards*; Bio-Rad) foram incluídos em cada corrida. Os géis foram desidratados através do tratamento com solução de metanol a 50% (v/v) e glicerol a 0,5% (v/v) por 20 min, após o qual foram envolvidos em papel celofane e deixados à temperatura ambiente por, pelo menos, 24 h.

Os géis foram visualizados sob luz branca com o sistema MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalém, Israel) e armazenados digitalmente com o auxílio do

software *GelCapture* (DNR Bio-Imaging Systems). A análise automatizada dos perfis de proteínas foi realizada com auxílio do programa *BioNumerics* versão 7.1 (Applied Maths) empregando coeficiente Pearson, com tolerância de 1 % para o cálculo dos índices de similaridade e o método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages* (UPGMA) para a construção do dendrograma. Amostras relacionadas foram consideradas as que apresentaram percentuais de similaridade $\geq 80\%$.

2.5 Análise Filogenética de *S. pseudoporcinus*

As amostras de *S. porcinus* foram avaliadas por análise da sequência de nucleotídeos do gene *rrs*, que codifica rRNA 16S. As sequências dos genes foram obtidas a partir do banco de dados do sítio do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (*National Library of Medicine* – NLM, Bethesda, MD, EUA), previamente depositadas por pesquisadores associados ao *Streptococcus Laboratory* (CDC, Atalanta, GA, EUA) em um trabalho de colaboração com o nosso grupo de pesquisa. Foram avaliadas as sequências provenientes de 18 amostras (do total de 24 amostras) de *S. pseudoporcinus* e cinco (dentre as seis amostras) de *S. porcinus*, que foram incluídas para fins comparativos.

Para a realização da análise filogenética foi utilizado o software MEGA versão 5.5.2 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, TAMURA *et al.*, 2011). As sequências extraídas foram alinhadas com auxílio do ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e foram construídas árvores pelo emprego do método de UPGMA e *Neighbor joining*, incluindo 1.000 *bootstraps*, com as distâncias evolutivas calculadas utilizando o método *maximum composite likelihood*.

2.6 Susceptibilidade aos Antimicrobianos

2.6.1 Teste de Difusão em Ágar

A partir de um crescimento recente, foi preparada uma suspensão bacteriana em solução salina fisiológica (NaCl a 0,85%) estéril, com turbidez correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland, representativa de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A suspensão bacteriana foi semeada na superfície do meio ágar Müeller-Hinton acrescido de 5% de sangue desfibrinado - de carneiro (PlastLabor, Ind. e Com.), com auxílio de *swabs* estéreis e em três direções distintas. Discos impregnados com antimicrobianos foram depositados sobre o inóculo de forma distribuída e espaçadamente e as placas incubadas a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 h.

Para o teste de susceptibilidade foram utilizados discos contendo os seguintes 15 antimicrobianos nas concentrações designadas entre parênteses: ampicilina (10 µg), cefoxitina (30 µg), clindamicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), levofloxacina (5 µg), penicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg). Os discos de antimicrobianos foram obtidos da Oxoid Ltd (Hampshire, Reino Unido). A amostra de referência *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 foi utilizada como controle nos testes.

Os halos de inibição foram interpretados de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), para a determinação das categorias de susceptibilidade (sensível, intermediário e resistente). A amostra de referência *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 foi utilizada como controle nos testes.

2.6.2 Teste de Microdiluição em Caldo

A concentração mínima inibitória (CMI) para ampicilina e eritromicina foi determinada de acordo com os padrões estabelecidos pelo documento M07-A10 CLSI (2015). Para tal, foram preparadas soluções 10 vezes concentradas dos antimicrobianos. Com essas soluções, foram feitas diluições duplas e seriadas em caldo Müeller-Hinton (BD Diag.) acrescido de 5% de sangue lisado de cavalo (MHB-Sg), Alíquotas de 100 µl de cada diluição foram distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços e de fundo em “U” (Corning Inc., Acton, MA, EUA).

Os inóculos constaram de suspensões bacterianas com turvação semelhante à escala 0,5 McFarland em MHB, posteriormente diluídas na razão de 1/20 no mesmo meio de cultura. A partir desta, foram distribuídos 10 µL em cada poço da placa, previamente preenchido com

100 µl das diluições dos antimicrobianos. As microplacas foram incubadas por 18 h – 24 h a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após o período de incubação, a CMI foi considerada como a menor concentração do antimicrobiano (em µg/mL) onde não foi identificado, visualmente, crescimento bacteriano. A amostra de referência *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 foi utilizada como controle nos testes.

A determinação da CMI foi realizada para as amostras tipo de *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus* e utilizadas também como parâmetros de comparação nas análises da susceptibilidade à estes antimicrobianos por biofilmes formados por essas amostras.

2.7 Caracterização de Atributos de Virulência de *S. porcinus* e *S. pseudoporcinus*

2.7.1 Formação de Biofilmes

2.7.1.1 Análise Quantitativa da Biomassa

A formação de biofilme foi realizada em placas de microtitulação com 96 poços, de poliestireno e fundo chato (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) de acordo com as recomendações de Teldolkar *et al.*, (2004). A partir de um crescimento recente ($36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18h – 24h) em ágar sangue de carneiro (Plast-Labor Ind. e Com., Rio de Janeiro) foi confeccionada uma suspensão apresentando turbidez equivalente à escala 0,5 da escala de McFarland no meio THB (*Todd-Hewitt Broth*, BD Diag. System, EUA).

A cada poço da placa de microtitulação, foram adicionados 200 µL das suspensões bacterianas padronizadas. As placas foram incubadas a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 h em atmosfera enriquecida com CO_2 (capnofilia). Após o período de incubação, o meio de cultura contendo células planctônicas foi removido e os poços, contendo biofilmes aderidos, foram lavados com 100 µL de solução salina fisiológica (0,85% de NaCl, USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) estéril.

Os biofilmes foram fixados com 100 µL de metanol 99% por 15 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e 50µL de cristal violeta 0,2% (Merck, Nova Jersey, EUA) foram distribuídos em cada um dos poços. Após incubação por 15 min, em temperatura ambiente, o excesso de cristal violeta foi gentilmente removido com água destilada. O corante impregnado foi solubilizado com 150 µL de ácido acético a 15% (Quimibrás Ind. Química S.A., Rio de Janeiro, Brasil). A absorvância foi medida a $\lambda 570$ nm em leitor de microplacas

IMark (Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad, Philadelphia, EUA). Como critério de análise, os resultados foram equivalentes à média das leituras de seis para cada oito réplicas por amostra, não sendo utilizados no cálculo o maior e o menor valor de DO de cada ensaio. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e as médias obtidas foram comparadas e os desvios padrão incluídos nos resultados. Os resultados obtidos foram utilizados nas avaliações comparativas da produção de biofilmes pelas espécies estudadas.

2.7.1.2 Influência da Presença de Glicose e de Sacarose na Formação de Biofilme

Para avaliar a influência de diferentes concentrações de açúcares, foram acrescentadas quantidades de 0,25%, 0,5%, 0,75% ou 1,0% de glicose ou de sacarose a o meio HIB, cuja fórmula original não inclui açúcares. A formação de biofilmes, durante 24 h a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e sob agitação e em capnofilia, foi avaliada pela quantificação da biomassa pelo método do cristal violeta, conforme descrito acima, na presença das diferentes concentrações testadas para ambos os açúcares.

2.7.1.3 Susceptibilidade aos Antimicrobianos dos Biofilmes de *S. pseudoporcinus*

A determinação da concentração inibitória de biofilmes (CIB) seguiu as recomendações de Pettit *et al.* (2005). Os ensaios foram realizados em placas de microtitulação de poliestireno com fundo chato. A cada um dos poços foram distribuídos 200 μL de uma suspensão bacteriana com turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland, confeccionada em meio BHI, provenientes de uma cultura recente em AS. As placas foram incubadas a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e por 24 h e sob agitação, em uma atmosfera capnofílica.

Após incubação, o meio de cultura foi removido e os biofilmes foram lavados gentilmente, por uma vez, com solução salina fisiológica (NaCl 0,85%). Sobre os biofilmes formados, foram adicionados 100 μL das soluções de ampicilina ou de eritromicina (Sigma-Aldrich Co.), confeccionadas em caldo Müeller-Hinton (MHB, BD Diag.) e previamente diluídas na razão dois. As concentrações testadas corresponderam ao intervalo entre 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para ambos os antimicrobianos. Após incubação a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h, foram adicionados, a cada um dos poços, 5 μL de uma solução aquosa contendo 0,22% de azul de Alamar (*Resazurin*, Sigma-Aldrich Co.).

As placas foram incubadas por 1 h a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e, posteriormente, foi realizada a leitura da absorvância nos comprimentos de onda 570 nm e 600 nm em um leitor Spectra Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA). Para todos os ensaios foram incluídos controles correspondentes a biofilmes cultivados nas mesmas condições dos testes, porém na ausência de antimicrobianos. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Foi considerada CIB os valores que apresentaram percentual de redução do Alamar menor ou igual a 50% em relação ao controle na ausência do antimicrobiano (100%).

O percentual de redução do azul de Alamar foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\frac{(\epsilon_{ox600})\lambda_{1A} - (\epsilon_{ox570})\lambda_{2A}}{(\epsilon_{red570})\lambda_{1A'} - (\epsilon_{red600})\lambda_{2A'}} \times 100$$

Onde:

ϵ_{ox600} = 117216, coeficiente molar de extinção do azul de Alamar na forma oxidada;

ϵ_{ox570} = 80586, coeficiente molar de extinção do azul de Alamar na forma oxidada;

ϵ_{red570} = 155677, coeficiente molar de extinção do azul de Alamar na forma reduzida;

ϵ_{red600} = 14652, coeficiente molar de extinção do azul de Alamar na forma reduzida;

A= absorvância nos poços testes;

A' = absorvância nos poços controle (sem antimicrobiano),

λ_1 = 570 nm;

λ_2 = 600 nm.

2.7.2 Ensaio de Aderência em Linhagem Celular HeLa

Os ensaios de aderência foram realizados em cultura de células utilizando a linhagem celular HeLa e a amostra de *S. pseudoporcinus* derivada de ATCC BAA 1381^T (amostra tipo), bem como de *S. porcinus* derivada ATCC 43138^T para fins comparativos. O protocolo utilizado seguiu as recomendações de Barocchi *et al.* (2006) e Burnham *et al.* (2007).

As amostras bacterianas foram cultivadas em meio ágar sangue por 18h-24h a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ em atmosfera contendo 5% de CO_2 e então suspensas em solução salina até atingirem turbidez equivalente à da escala 5 de McFarland ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL). Diluições seriadas deste inóculo foram semeadas em ágar sangue e incubadas para a contagem de UFC correspondente ao inóculo inicial do ensaio.

Utilizando placas de 24 poços para cultivo celular (TPP, Suíça), a linhagem celular HeLa foi cultivada até a formação de uma monocamada, a qual foi lavada 1x com tampão fosfato salina – PBS (0,1M fosfato de sódio monobásico; 0,1M fosfato de sódio dibásico; pH 7,4) e incubada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich Co.),

contendo a suspensão bacteriana na proporção de 1:50 a 37°C por 2 h em atmosfera enriquecida com 5% de CO₂.

Em seguida, foram realizadas três lavagens com tampão PBS (pH 7,4) para a remoção das células bacterianas não aderentes. Para a enumeração das bactérias aderentes, as células epiteliais foram descoladas dos poços da placa através do tratamento com 100 µL de tripsina (Sigma-Aldrich Co.) a 0,25%. A seguir, as células epiteliais foram lisadas por meio da adição de 200 µL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co.) a 0,025% gelado. Diluições seriadas em salina fisiológica estéril (NaCl a 0,85%) foram semeadas (10 µL) em meio de ágar sangue, as placas foram incubadas por 18h-24h a 36°C±1°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após o período de incubação, as colônias foram contadas e o valor das unidades formadoras de colônia por mililitro calculado. As placas utilizadas para contagem foram as que apresentaram entre 30 e 300 colônias. Valores obtidos de três experimentos independentes e em triplicata foram utilizados para construção de gráficos representativos das taxas de adesão das amostras em plataforma EXCEL (Microsoft Office Company).

2.8 Análise Proteômica Comparativa entre *S. porcinus* e *S. pseudoporcinus*

2.8.1 Preparo das Amostras

Após reativação em placas contendo *Trypticase Soy Agar* (TSA, Difco Labs.) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (TSA-S) e incubação a 35°C por 18h-24h em atmosfera com 5% de CO₂, as amostras RS-21 (*S. porcinus*) e RS-36 (*S. pseudoporcinus*) foram inoculadas em 25 mL de caldo Todd-Hewitt (Todd-Hewitt Broth, THB, Difco Labs.) em tubo cônico de 50 ML por 18 horas. Após o crescimento celular, os tubos foram centrifugados a 21000 x g por 10 minutos três vezes. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 10 mL de Tris HCL 40 mM (pH 8,0). O material foi novamente centrifugado nas mesmas condições. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5 mL de tampão de extração contendo Tris HCl 1M (pH 8,0), Ureia 8M e SDS 1%. Então, o material foi levado ao processador ultrasônico (Sonics VCX 130 Vibra-Cell, Sonics & Materials, EUA) por 15 minutos com intervalos de pulso de 5 segundos em potência de 15 watts. Durante o processo, as amostras foram mantidas refrigeradas com gelo ao redor do frasco. Por fim, o material foi novamente centrifugado a 21000 x g por 10 minutos.

As amostras foram precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) a 10% na proporção de 1,0 mL de proteína para 278 mL de TCA, seguida de incubação em banho de gelo durante 60 minutos. Após centrifugação a 14.000 x g durante 10 minutos a 4°C, as amostras foram lavadas cinco vezes com solução de etanol-éter 50% (v/v) seguida também de centrifugação sob as mesmas condições. A concentração de proteínas foi determinada com reagente BCA Protein Assay Reagent (Smith et al.,1985), utilizando como padrão, a albumina bovina sérica.

2.8.2 Análise dos Resultados

Os peptídeos obtidos foram avaliados em um instrumento do tipo Q-Tof Micro (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) acoplado a um NanoUPLC (Nanoaquicity, Waters Co.), pertencentes a Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica (UEMP) do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

Os dados brutos das sequências peptídicas foram processados com auxílio do aplicativo *Data Explorer 4.2* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), para serem identificados utilizando o banco de dados do NCBIInr, através do MASCOT (Matrix Science Ltd., disponível em <http://www.matrixscience.com>), na base Bacteria (Eubacteria).

O valor de $p < 0,01$ foi inferido como parâmetro limiar (*threshold*) na caracterização dos peptídeos, que foram analisados em ESI-Q-TOF, para identificação em MS/MS Ion. Todos os resultados (matches) foram conferidos visualmente em relação aos espectros originais obtidos, considerando identificações válidas somente aquelas, cujas proteínas apresentavam três ou mais peptídeos diferentes, desde que pelo menos um apresentasse cinco resíduos sequenciados consecutivamente na série Y, B ou ainda de forma complementar. Em caso de um número inferior a três peptídeos, foi confirmada como identificação válida, a presença de pelo menos um peptídeo com no mínimo sete resíduos de ácidos aminados sequenciados consecutivamente na série Y e/ou B ou complementar. Também foi aceito como identificação válida da proteína com menos de três peptídeos, desde que um dos peptídeos apresentasse 100% de identidade exclusiva para a proteína identificada. A análise funcional das proteínas identificadas neste estudo foi realizada através do bando de dados Uniprot acoplado ao EMBL-Bank (<http://www.ebi.ac.uk/embl>). As análises proteômicas foram feitas em triplicata técnica.

2.9 Genômica Comparativa de *S. porcinus* e *S. pseudoporcinus*

Para avaliação comparativa do genoma das espécies *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus* foram selecionadas sequências disponibilizadas no banco de dados do NCBI. Assim, foram obtidas as sequências do genoma completo de três amostras de *S. pseudoporcinus*, sendo uma derivada da amostra tipo ATCC BAA 1381^T, de origem humana, e duas SS-607 e SS-662, também incluídas nas demais análises deste estudo e oriundas de leite (origem animal). A sequência do genoma completo de uma amostra derivada da ATCC 43138^T de *S. porcinus* foi também obtida no mesmo banco de dados e avaliada (TABELA 1).

Para tal, foi empregado o software Mauve versão 2.3 (DARLING *et al.*, 2004), para o alinhamento dos genomas de ambas as espécies. Os dados de anotação estavam disponibilizados na plataforma PATRIC 3.2.76 (*University of Chicago, Chicago, Il, EUA*) e foram utilizados para compor as análises. Todos os genes anotados foram confirmados por alinhamento usando ferramenta BLAST (NCBI). Sequências de profagos foram identificadas utilizando o software PHASTER (*Phage Search Tool Enhanced Release; ARNDT et al.*, 2016).

Tabela 1 - Amostras e números de acesso no GenBank das respectivas sequências de genoma completo utilizadas neste estudo

Espécie	Amostra	Origem	Fonte	Nº de Acesso
<i>S. porcinus</i>	ATCC 43138 ^T	Suíno	Nódulos linfáticos	AEUU01
<i>S. pseudoporcinus</i>	ATCC BAA 1381 ^T	Humano	Trato geniturinário	AEUY02
<i>S. pseudoporcinus</i>	SS-607	Bovino	Leite	FMWC01
<i>S. pseudoporcinus</i>	SS-662	Bovino	Leite	FMWH01

3 RESULTADOS

Neste estudo foram avaliadas 24 amostras previamente caracterizadas como pertencentes a espécie *S. pseudoporcinus* (sendo 19 de origem humana e cinco obtidas de leite – origem bovina); além de seis *S. porcinus*, que foram incluídas para fins comparativos. As amostras foram avaliadas quanto a diferentes aspectos fenotípicos e genotípicos (TABELA 2).

Tabela 2 – Características das amostras de *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus* avaliadas neste estudo

Amostra	Ano de Isolamento	Espécime	Origem	Espécie
ATCC BAA-1381 ^T	ND	ND		
1217-87	1987	Placenta		
1451-92	1992	Placenta		
638-93	1993	Cérvix		
2144-93	1993	Cérvix		
209-94	1994	ND		
219-94	1994	Canal vaginal		
834-94	1994	Ferida		
1013-94	1994	Urina		
1014-94	1994	Biópsia de trato genital	Humana	
1256-95	1995	Ferida		
1533-95	1995	Cérvix		
2177-95	1995	Canal Vaginal		<i>Streptococcus pseudoporcinus</i>
2885-95	1995	Sangue		
3676-95	1995	Ferida		
3176-97	1997	Coto umbilical		
977-01	2001	ND		
143-04	2004	ND		
644-05	2005	ND		
3148-99	1999	Leite		
3152-99	1999	Leite		
3155-99	1999	Leite	Bovino	
SS-607	ND	Leite		
SS-662	ND	Leite		
ATCC 43138 ^T				
SS-608	ND	ND		
SS-611	ND	ND		
SS-740	ND	ND	Suíno	<i>Streptococcus porcinus</i>
SS-841	ND	ND		
SS-1124	ND	ND		
SS-608	ND	ND		

ND, não determinado

A confirmação da caracterização fenotípica foi realizada pela utilização de testes fisiológicos convencionais, que incluíram provas tanto destinadas à identificação em nível de gênero, quanto de espécie. Os resultados obtidos revelaram que, considerando a bateria de provas utilizada, nenhum dos testes empregados foi discriminatório para as espécies *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus*. Todas as 30 amostras foram positivas nos testes de hidrólise da esculina e descarboxilação da arginina, e nos testes de utilização dos açúcares manitol, sacarose, sorbitol e trealose. Todas as amostras de ambas as espécies também exibiram o fator CAMP (TABELA 3).

Os testes que se mostraram mais discriminatórios entre as espécies foram os de hidrólise do hipurato, onde 93% das amostras de *S. pseudoporcinus* de origem humana foram positivas e nenhuma *S. porcinus* apresentou este resultado. Entretanto, nenhuma das amostras de *S. pseudoporcinus* oriunda de leite foi positiva para o teste de hidrólise do hipurato. Além deste, foi observado também que todas as amostras de *S. porcinus* foram capazes de crescer na concentração de 6,5% de NaCl; enquanto que, apenas 42,1% das amostras de *S. pseudoporcinus* de origem humana e nenhuma oriunda de leite foi positiva para este teste (TABELA 3).

Considerando-se as variações observadas entre as amostras de *S. pseudoporcinus* de origens distintas, foi observado que nos testes de hidrólise do hipurato e de utilização do piruvato de sódio como única fonte de carbono, o percentual de amostras humanas positivas foi de 94,7% e 84,2%, respectivamente. Entretanto, nenhuma das amostras oriunda de leite foi positiva nesses testes. Por outro lado, enquanto todas as amostras de *S. pseudoporcinus* isoladas de leite foram positivas nos testes de utilização de lactose e teste de Voges-Proskauer, apenas 5,3% e 15,8%, respectivamente, das amostras de origem humana apresentaram esses mesmos resultados (TABELA 3).

Tabela 3 – Caracterização fenotípica de amostras de *Streptococcus pseudoporcinus* e *Streptococcus porcinus* por testes fisiológicos convencionais

Testes fenotípicos	Espécies / % de amostras positivas		
	<i>S. pseudoporcinus</i>		<i>S. porcinus</i> (n=6)
	Humanas (n=19)	Leite (n=5)	
CAMP	100%	100%	100%
PYR	84,2%	100%	83,3%
6,5% de cloreto de sódio (NaCl)	42,1%	0%	100%
Hidrólise da esculina	100%	100%	100%
Descarboxilação da arginina	100%	100%	100%
Hidrólise do hipurato	94,7%	0%	0%
Utilização do piruvato de sódio	84,2%	0%	66,7%
Teste de Voges-Proskauer	15,8%	100%	83,3%
Utilização dos açúcares:			
Lactose	5,3%	100%	33,3%
Manitol	100%	100%	100%
Sorbitol	100%	100%	100%
Sacarose	100%	100%	100%
Trealose	100%	100%	100%
MGP	94,7%	100%	66,7%

CAMP, Christie, Atkins e Munch-Petersen; PYR, pirrolidônio β-naftilamida; MGP, metil-α-glicopiranosídeo.

As amostras bacterianas foram também caracterizadas pelo emprego da metodologia de espectrometria de massa MALDI-TOF. Todas as amostras de *S. pseudoporcinus* e as de *S. porcinus* foram avaliadas por três protocolos distintos que incluíram a aplicação da colônia diretamente sobre a placa de aço polido (COL); o uso de ácido fórmico sobre a colônia (FOR); e a utilização de extrato proteico obtido pelo emprego de acetonitrila e ácido fórmico (EXT).

Os resultados obtidos revelaram valores de escores distintos dependendo do tipo do protocolo empregado. A partir dos protocolos COL e FOR foram obtidos escores que variaram de 1,572 a 2,149 e de 1,498 a 2,163, respectivamente. Enquanto que, para o protocolo EXT os escores variaram de 1,812 a 2,201. Dessa forma, com o uso do protocolo COL 20,8% (5/24) das amostras de *S. pseudoporcinus* não foram identificadas (escores < 1,699); e para FOR isto foi observado em 8,3% (2/24) das amostras. As que não foram

identificadas não foram coincidentes em ambos os protocolos. Também, não foi possível obter a caracterização de uma amostra de *S. porcinus* (16,7%; 1/6) com o emprego de COL.

Todas as amostras de *S. pseudoporcinus* e de *S. porcinus* foram corretamente identificadas com o emprego de EXT. Assim, com EXT foi identificado um maior percentual de amostras incluídas na faixa de escore de $>2,0$ a $< 2,29$, que considera segura a caracterização do gênero e provável para espécie. Nenhuma amostra apresentou escore $\geq 2,3$ que garante a caracterização do gênero e da espécie, segundo as recomendações do fabricante do equipamento. A TABELA 4 apresenta os resultados obtidos com a metodologia de MALDI-TOF. Os valores dos escore apresentados representam os maiores obtidos em três experimentos independentes, para cada protocolo empregado (COL, FOR e EXT). Também cabe ressaltar que, as amostras 1217-87 e 3155-99 foram caracterizadas como *S. porcinus* pelos protocolos COL e FOR e como *S. pseudoporcinus*, quando do emprego de EXT. Da mesma forma, as amostras SS-607 e SS-662 foram consideradas *S. porcinus* no protocolo COL e *S. pseudoporcinus* em FOR e EXT. Considerando os valores de desvio padrão, o protocolo EXT foi superior aos demais utilizados (TABELA 4). Adicionalmente, os resultados determinaram que escores $\geq 1,800$ asseguraram a caracterização da espécie.

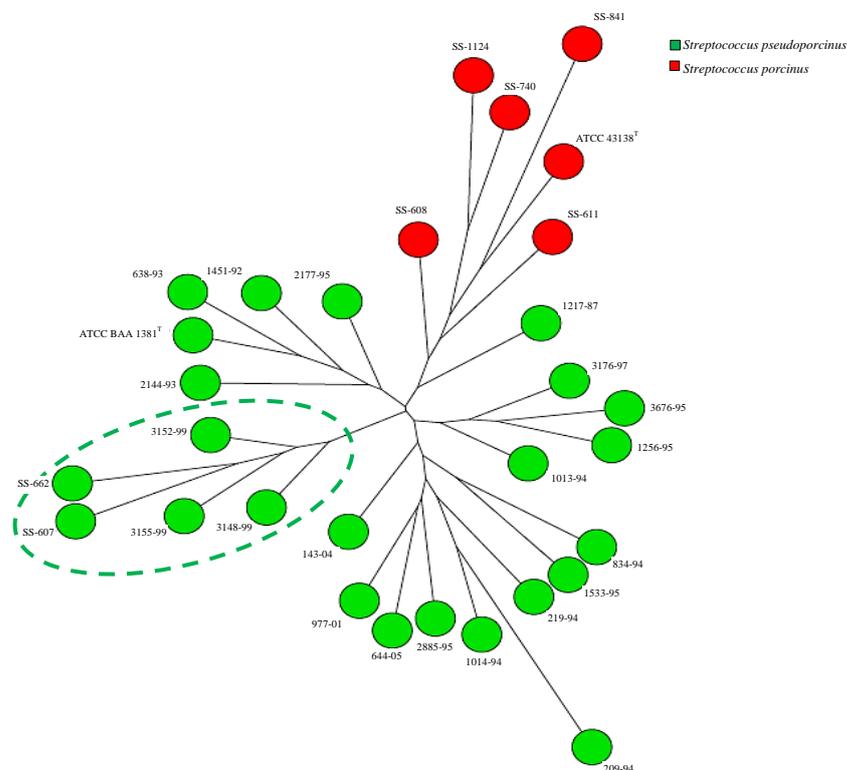
Tabela 4 – Distribuição das amostras de *Streptococcus pseudoporcinus* e *Streptococcus porcinus* em relação aos escores obtidos pelo emprego da metodologia de MALDI-TOF MS

Dados obtidos por MALDI-TOF MS	Espécies / Protocolos					
	<i>S. pseudoporcinus</i>			<i>S. porcinus</i>		
	COL	FOR	EXT	COL	FOR	EXT
	Faixas de escore (% de amostras):					
0,000 – 1,699	20,8%	8,3%	4,2%	16,7%	-	-
1,700 – 1,999	66,7%	54,2%	83,3%	66,7%	33,3%	-
2,000 – 2,299	12,5%	37,5%	12,5%	16,7%	66,7%	100%
2,300 – 3,000	-	-	-	-	-	-
	Valores de escore:					
Mínimo	1,572	1,498	1,733	1,688	1,861	2,036
Máximo	2,054	2,108	2,072	2,149	2,193	2,201
Média	1,820	1,900	1,915	1,917	2,048	2,107
Desvio padrão	0,134	0,150	0,082	0,141	0,122	0,056

Legenda: MALDI-TOF MS, ionização e dessorção a laser assistida por matriz; COL, colônia, FOR, ácido fórmico sobre a colônia, EXT, extrato proteico (Ver Materiais e Métodos); -, Nenhuma amostra.

Os maiores valores obtidos com o protocolo EXT foram utilizados para determinação da similaridade entre as amostras do estudo e para identificação de biomarcadores pela análise dos espectros obtidos, com auxílio do software BioNumerics. Para tal, parâmetros empregados incluíram o coeficiente de correlação de Pearson e o método de agrupamento de vizinhos (*Neighbor joining*), a partir dos dados provenientes dos espectros obtidos. Os resultados demonstraram que houve uma perfeita discriminação entre as amostras *S. pseudoporcinus* das de *S. porcinus*, conforme pode ser observado na FIGURA 2. Adicionalmente, as amostras de *S. pseudoporcinus* obtidas de leite (3148-99, 3152-99, 3155-99, SS-607 e SS-662) mostraram uma maior correlação entre si, do que com as demais amostras de origem humana ficando, portanto, agrupadas em um ramo único da árvore. Entretanto, a amostra 1217-87 (*S. pseudoporcinus*), que também apresentou o sorogrupo P de Lancefield, demonstrou uma maior correlação com as de *S. porcinus* (FIGURA 2)

Figura 2 – Agrupamento das amostras de *Streptococcus pseudoporcinus* e *Streptococcus porcinus* de acordo com os resultados obtidos pela metodologia de MALDI TOF

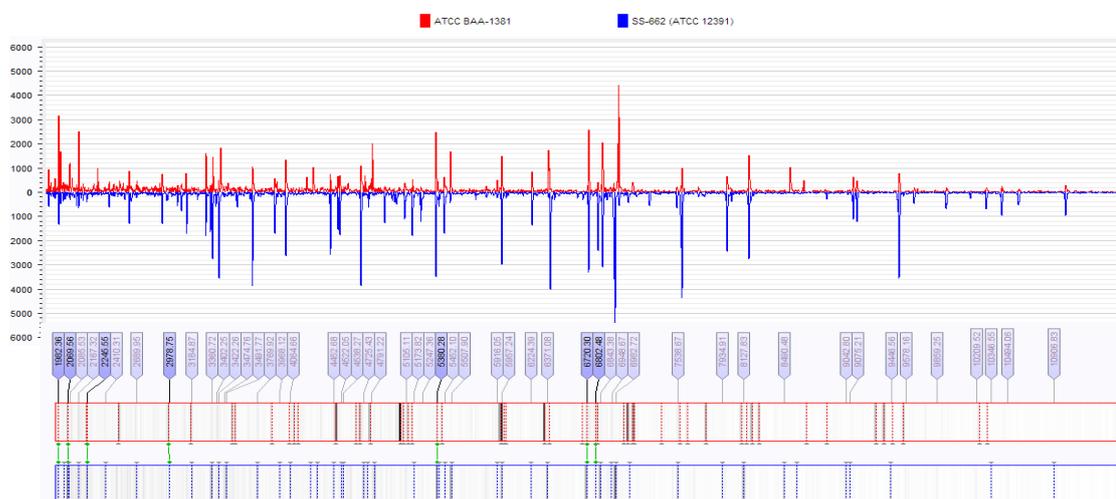


Legenda: Agrupament construído com auxílio do software BioNumerics (Applied Math, Belgica) utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o algoritmo *Neighbor Joining*. Em destaque, o ramo representativo das amostras de *S. pseudoporcinus* isoladas de leite.

Os dados obtidos com a metodologia de MALDI-TOF foram também avaliados quanto à identificação de biomarcadores, determinados pela comparação dos picos presentes nos espectros de massa de cada uma das amostras bacterianas e na determinação daqueles que se mostraram espécie-específicos. Estas análises também foram conduzidas no software BioNumerics, empregando-se os seguintes parâmetros: constante de tolerância (*constant tolerance*) = 5; tolerância linear (*linear tolerance*) = 300; deslocamento horizontal máximo (*maximum horizontal shift*) = 1.

A análise computadorizada quanto à presença ou ausência de biomarcadores inter e intra-espécies apontou um total de 50 picos analisados, considerando-se as 24 amostras de *S. pseudoporcinus* e as seis de *S. porcinus* (incluídas para fins comparativos). A FIGURA 3 demonstra a comparação entre os espectros obtidos com as amostras tipo de *S. pseudoporcinus* (ATCC BAA-1381^T) e de *S. porcinus* (ATCC 43138^T). Foram identificados sete picos idênticos e algumas regiões com marcadores semelhantes (FIGURA 3).

Figura 3 – Comparação dos espectros de massa obtidos pela metodologia de MALDI-TOF das amostras tipo de *Streptococcus pseudoporcinus* (ATCC BAA-1381^T) e de *Streptococcus porcinus* (ATCC 43138^T)



Já a comparação entre a amostra tipo de *S. pseudoporcinus*, de origem humana, com a amostra SS-662, oriunda de leite revelou 30 picos completamente coincidentes (FIGURA 4).

Figura 4 – Comparação dos espectros de massa obtidos pela metodologia de MALDI-TOF entre amostras de *S. pseudoporcinus* de origem humana (ATCC BAA-1381^T) e de leite (SS-662)



Legenda: Análise realizada com auxílio do software BioNumerics, empregando-se os seguintes parâmetros: constante de tolerância (*constant tolerance*) = 5; tolerância linear (*linear tolerance*) = 300; deslocamento horizontal máximo (*maximum horizontal shift*) = 1. Em destaque os valores de m/z dos picos comuns a ambas as amostras.

Considerando-se uma comparação de todas as amostras incluídas neste estudo, foi observado que um pico equivalente a 9446.56 m/z foi identificado em todas as amostras de *S. pseudoporcinus*, estando ausente nas de *S. porcinus*. Além deste, picos de 4064.66 m/z e 8127.83 m/z também foram ausentes em *S. porcinus* e presentes em *S. pseudoporcinus*, excetuando-se para amostra 1217-87 (TABELA 5). Em relação à origem das amostras de *S. pseudoporcinus* foi identificado que um pico de 6371.08 m/z esteve presente em todas as amostras de origem humana e ausente nas de leite. Além deste, os de 5916.05 m/z e de 66371.08 m/z parecem ser mais característicos de amostras de origem humana. A TABELA 5 apresenta os dados obtidos com as análises relativas à comparação dos picos identificados nos espectros obtidos por MALDI TOF.

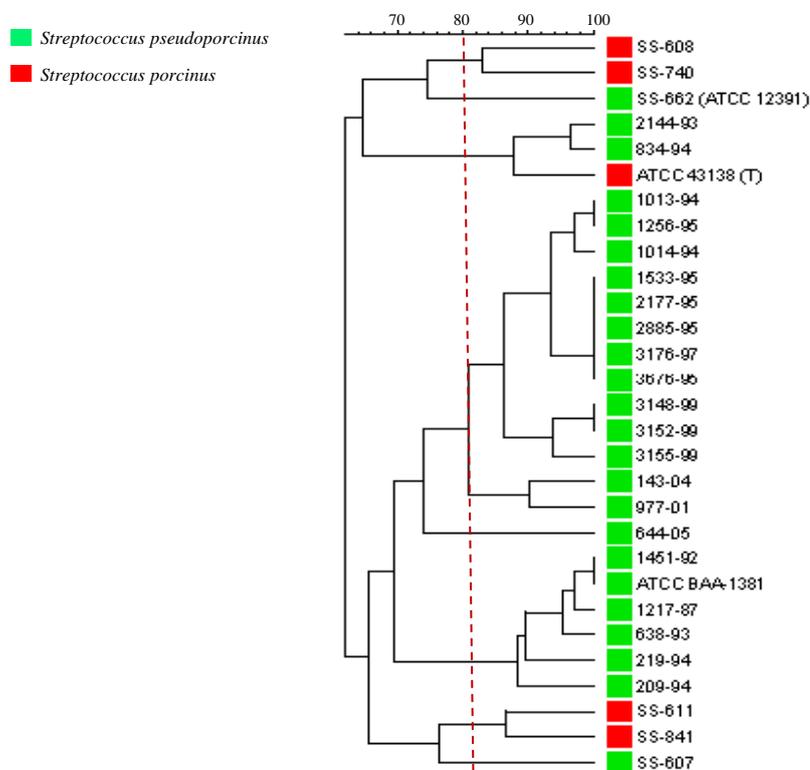
Tabela 5 – Comparação dos valores de m/z (massa carga) identificados nos espectros obtidos pela metodologia de MALDI-TOF MS para as espécies *Streptococcus pseudoporcinus* (n=24) e *Streptococcus porcinus* (n=6) para a determinação de biomarcadores

Valores de massa/carga (m/z)	Espécies (% de amostras)		
	<i>S. pseudoporcinus</i>		<i>S. porcinus</i> (n=6)
	Leite (n=5)	Humanas (n=19)	
1982.36	80,0	77,8	33,3
2069.56	100	88,9	33,3
2085.53	80,0	83,3	16,7
2167.32	60,0	77,8	66,7
2245.55	100	100	100
2410.31	40,0	77,8	16,7
2689.95	80,0	100	66,7
2689.95	100	77,8	83,3
3184.87	40,0	88,9	16,7
3360.72	100	100	83,3
3402.25	100	77,8	83,3
3422.26	100	100	83,3
3474.76	100	50,0	50,0
3491.77	-	94,4	-
3769.92	100	94,4	83,3
3968.12	100	77,8	83,3
4064.66	100	94,4*	-
4452.68	100	100	83,3
4522.05	100	94,4	66,7
4538.27	100	94,4	83,3
4725.43	100	100	83,3
4791.22	20,0	55,6	83,3
5105.11	80,0	55,6	83,3
5173.82	100	94,4	50,0
5247.36	100	66,7	83,3
5380.28	100	100	100
5452.10	100	83,3	83,3
5507.90	80,0	94,4	-
5916.05	-	94,4	16,7
5957.24	100	88,9	100
6224.39	100	100	33,3
6371.08	-	100	33,3
6720.30	100	100	100
6802.48	100	100	100
6843.38	100	100	83,3
6948.67	100	88,9	83,3
6982.72	20,0	94,4	-
7538.67	100	100	83,3
7934.91	100	100	83,3
8127.83	100	94,4*	-
8490.48	20,0	77,8	-
9042.80	100	94,4	83,3
9075.21	100	100	83,3
9446.56	100	100	-
9578.16	80,0	77,8	-
9859.25	80,0	61,1	50,0
10209.52	100	66,7	83,3
10346.55	100	100	50,0
10494.06	100	72,2	83,3
10906.83	100	100	83,3

*Exceto a amostra 1217-87; -, nenhuma amostra.

A análise dos perfis proteicos obtidos pelo emprego da metodologia de SDS-PAGE revelou uma grande similaridade (valores $> 80\%$) entre as espécies *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus* não tendo sido suficientemente discriminatória. Dessa forma, esta metodologia não se mostrou útil para identificação da espécie. A FIGURA 5 apresenta o dendrograma obtido por SDS-PAGE. O arranjo formado reuniu a amostra tipo de *S. porcinus* em um percentual de similaridade $> 80\%$ com as amostras com as amostras 2144-93 e 834-94 de *S. pseudoporcinus*. Além disso, percentuais de similaridade $>70\%$ foram identificados em arranjos determinados entre as amostras SS-662 de *S. pseudoporcinus* e SS-608 e SS-740 de *S. porcinus*; como também entre SS-607 de *S. pseudoporcinus* e SS-611 e SS-841 de *S. porcinus*. A amostra SS-1124 de *S. porcinus* não foi incluída nessa análise por não sido possível a obtenção de extratos proteicos com qualidade satisfatória.

Figura 5 – Dendrograma representativo do agrupamento das amostras de *Streptococcus pseudoporcinus* e *Streptococcus porcinus* determinado pelo emprego da metodologia de análise do perfil de proteínas totais obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida acrescido de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)



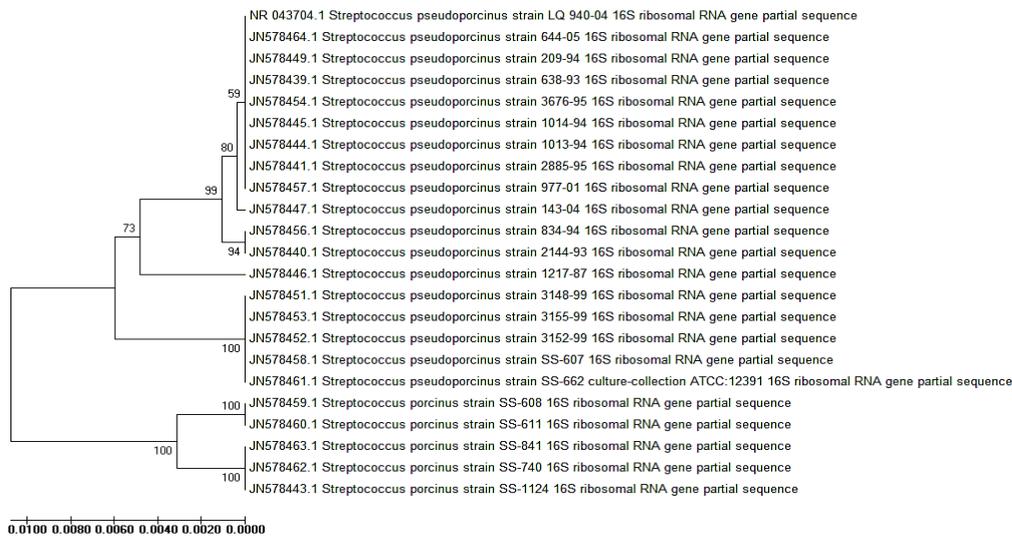
Legenda: - A construção do dendrograma foi realizada com auxílio do software BioNumerics (Applied Maths) empregando coeficiente Pearson, com tolerância de 1 % para o cálculo dos índices de similaridade e o método UPGMA para determinação dos agrupamentos. Amostras relacionadas foram consideradas as que apresentaram percentuais de similaridade $\geq 80\%$ (linha pontilhada).

Através da utilização da metodologia de SDS-PAGE pode-se, também, observar a formação de três arranjos e dois perfis únicos entre as amostras *S. pseudoporcinus*. O grupo prevalente reuniu 14 amostras (58,3%; 14/24), seguido de um segundo agrupamento com seis amostras (25,0%; 6/24) que incluiu a amostra tipo da espécie. Além deste, um terceiro grupo reuniu duas amostras de *S. pseudoporcinus* (2144-93 e 834-94) juntamente com a amostra tipo de *S. porcinus*. Os perfis únicos corresponderam as amostras SS-607 e SS-662.

Para analisar a relação evolutiva de *S. pseudoporcinus* foram alinhadas as sequências nucleotídicas dos genes *rrs* de 18 amostras de *S. pseudoporcinus*. Cinco amostras de *S. porcinus* foram incluídas para fins comparativos. Foram construídas duas árvores filogenéticas, uma pelo método de UPGMA (FIGURA 6) e outra por *Neighbor joining* (FIGURA 7). Todas as amostras de *S. pseudoporcinus* se mostraram distanciadas de *S. porcinus*.

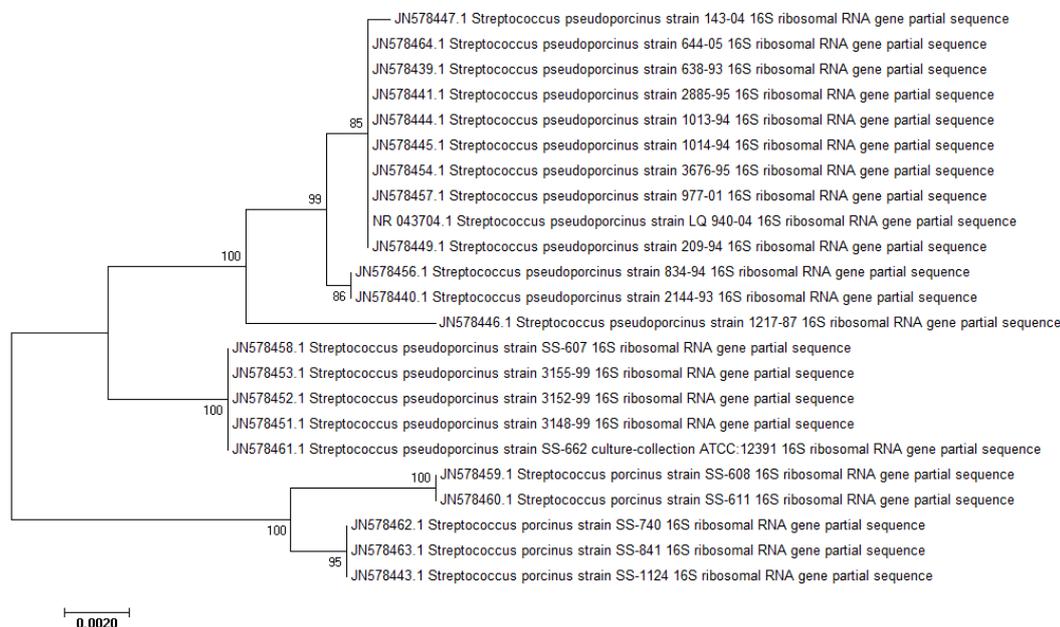
Além disso, dentre as 18 amostras de *S. pseudoporcinus* avaliadas foram identificados dois principais clados. Um deles foi constituído apenas pelas amostras de origem humana; enquanto o outro reuniu apenas as amostras obtidas de leite (de origem animal). Adicionalmente, a amostra 1217-87 foi a mais divergente. Além disso, as amostras 2144-93, 834-94 e 143-04 também não apresentam similaridade de 100% com as demais. As duas análises revelaram que as amostras de *S. pseudoporcinus* de fonte humanas menos relacionadas com as amostras de fonte animal.

Figura 6 – Árvore filogenética mostrando a relação de *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus* com base no alinhamento de sequências do gene *rrs* (16S rRNA) pelo método de UPGMA



Legenda: Construída com emprego de 1.000 *bootstraps*; distâncias evolutivas calculadas utilizando o método *maximum composite likelihood*. A régua indica a distância evolutiva relativa. Os números nos braços do dendograma são o valores de *bootstraps* na formação do grupo.

Figura 7 – Árvore filogenética mostrando a relação de *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus* com base no alinhamento de seqüências do gene *rrs* (16S rRNA) pelo método de *Neighbor Joining*



Legenda: Construída com emprego de 1.000 *bootstraps*; distâncias evolutivas calculadas utilizando o método *maximum composite likelihood*. A régua indica a distância evolutiva relativa. Os números nos braços do dendograma são o valores de *bootstraps* na formação do grupo.

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos por metodologia de difusão em ágar revelaram que todas as amostras (de ambas espécies) foram sensíveis a cefoxitina, levofloxacina e vancomicina. Além disso, as amostras de *S. pseudoporcinus* isoladas de leite foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Por outro lado, 66,0% das amostras de *S. pseudoporcinus* de origem humana foram resistentes à tetraciclina. Da mesma forma, 50,0% das amostras de *S. porcinus* também apresentaram esta característica. Além da tetraciclina, taxas de não susceptibilidade relativas as amostras de *S. porcinus* foram identificadas apenas para penicilina (16,6%).

Entretanto, 16,2%, 11,1% e 5,5% das amostras de *S. pseudoporcinus* de origem humana foram não susceptíveis ao cloranfenicol, clindamicina e eritromicina, respectivamente. Em relação aos beta-lactâmicos, 11,1% e 5,5% dessas amostras não foram susceptíveis a penicilina e a ampicilina, respectivamente.

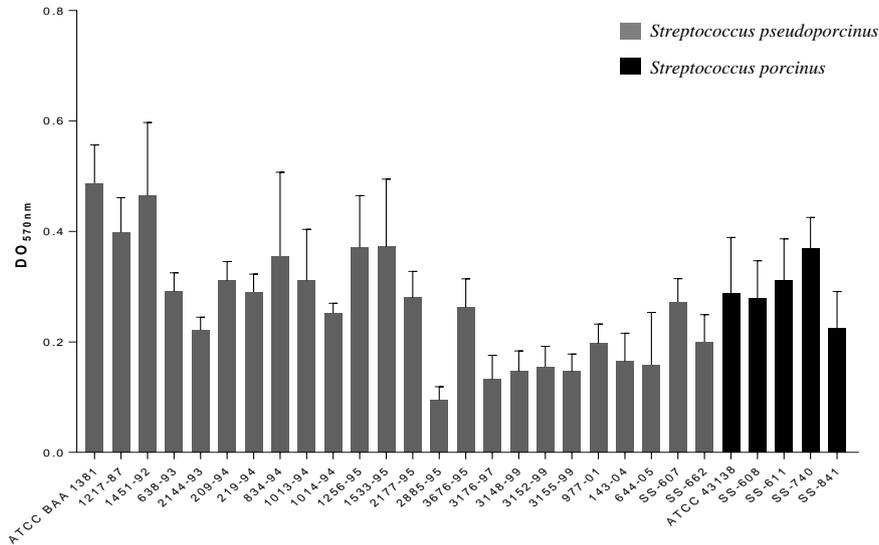
A capacidade de formar biofilmes foi investigada no contexto da expressão de atributos de virulência por esses microrganismos. A quantificação da biomassa relativa à formação de biofilme foi realizada pela avaliação espectrofotométrica a $\lambda=570\text{nm}$. Os resultados foram obtidos pela variação na impregnação do cristal violeta na matriz do biofilme formado nas paredes e no fundo dos poços das placas de microtitulação. Os valores das leituras são proporcionais à intensidade da cor obtida na solução descorante (ácido acético), pela retirada do corante impregnado no biofilme. Conforme descrito nos materiais e métodos, a formação do biofilme foi categorizada em: forte $\text{DO}_{570} \geq 0,6$; média $0,3 < \text{DO}_{570} < 0,599$; ou fraca $0,1 < \text{DO}_{570} < 0,299$.

Todas as amostras de *S. pseudoporcinus*, assim como de *S. porcinus*, se mostraram capazes de formar biofilmes. Entretanto, os resultados obtidos com a formação de biofilmes das 24 amostras de *S. pseudoporcinus* em meio THB (que contém 0,2% de glicose em sua constituição original) revelaram que 37,5% das amostras foram produtoras em níveis médios, com valores que variaram de DO_{570} 0,31 a 0,49. As demais amostras formaram biofilmes em níveis fracos (DO_{570} 0,1 a 0,28). Nenhuma amostra de *S. pseudoporcinus* produziu biofilmes em níveis fortes sob essas condições de cultivo. As amostras de *S. porcinus* incluídas para fins comparativos também produziram biofilmes em níveis fracos a médios (três amostras cada com valores DO_{570} 0,2 a 0,29 e 0,3 a 0,37, respectivamente). Estes dados estão apresentados na FIGURA 8.

A formação de biofilmes pelas amostras tipo de *Streptococcus pseudoporcinus* (ATCC BAA-1381^T) e de *Streptococcus porcinus* (ATCC 43138^T) foi avaliada também em meio de cultura adicionado glicose ou sacarose. Os resultados obtidos mostraram um aumento de até dez vezes nos valores de densidade ótica. Em presença de sacarose, o aumento na formação de biofilme pela amostra de *S. pseudoporcinus* foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de açúcar. Este fato não foi observado para a amostra de *S. porcinus*, que formou uma maior biomassa na menor concentração deste açúcar – 0,25% e 0,5% (p/v); excetuando-se a concentração 1,0% (p/v), em decorrência do elevado desvio padrão.

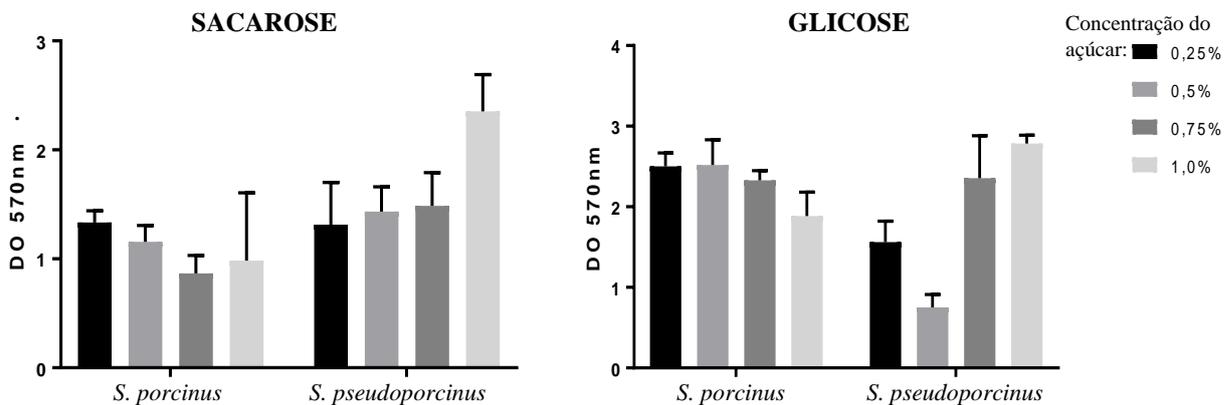
Com relação à adição de glicose, foi observado um efeito diferente para ambas as espécies. De fato a adição de glicose proporcionou os maiores valores de DO, refletindo uma maior biomassa. Entretanto, para *S. pseudoporcinus* pode-se observar um aumento considerável quando da adição de 0,75% e 1,0% de glicose. Enquanto que, para *S. porcinus*, apesar dos valores de DO serem comparáveis em todas as concentrações deste açúcar, pode-se observar uma discreta redução da biomassa quando da adição das concentrações mais elevadas (0,75% e 1,0%). A FIGURA 9 apresenta estes resultados.

Figura 8 – Valores de densidade ótica relativos a quantificação da biomassa em biofilmes produzidos por amostras de *S. pseudoporcinus* e de *S. porcinus*



Legenda: Colunas representam as médias da DO em dois experimentos independentes com seis réplicas cada; barras representam desvio padrão.

Figura 9 – Valores de densidade ótica relativos a quantificação da biomassa em biofilmes produzidos pelas amostras tipo de *Streptococcus pseudoporcinus* (ATCC BAA-1381^T) e de *Streptococcus porcinus* (ATCC 43138^T) na presença de diferentes concentrações de sacarose e de glicose



Legenda: Colunas representam as médias da DO em dois experimentos independentes com seis réplicas cada; barras representam desvio padrão.

Foi também avaliado comparativamente a susceptibilidade de biofilmes formados pelas amostra tipo de *S. pseudoporcinus* e de *S. porcinus*, frente à ação de ampicilina e eritromicina, que são antimicrobianos normalmente utilizados no tratamento das infecções causadas por microrganismos do gênero *Streptococcus*. Foram determinados os valores de concentração inibitória mínima (CIM, para células planctônicas) e de concentração inibitória dos biofilmes (CIB). Os valores de CIB, obtidos pelo ensaio de redução do azul de Alamar, foram extremamente elevados para ambos os antimicrobianos, variando de 5.000 (para eritromicina) para mais de 40.000 (para ampicilina) vezes. Biofilmes de *S. pseudoporcinus* se mostraram menos susceptíveis à ação de ampicilina do que *S. porcinus* (TABELA 6).

Tabela 6 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM)¹ e concentração inibitória de biofilmes (CIB)² das amostras tipo de *Streptococcus pseudoporcinus* e de *Streptococcus porcinus*

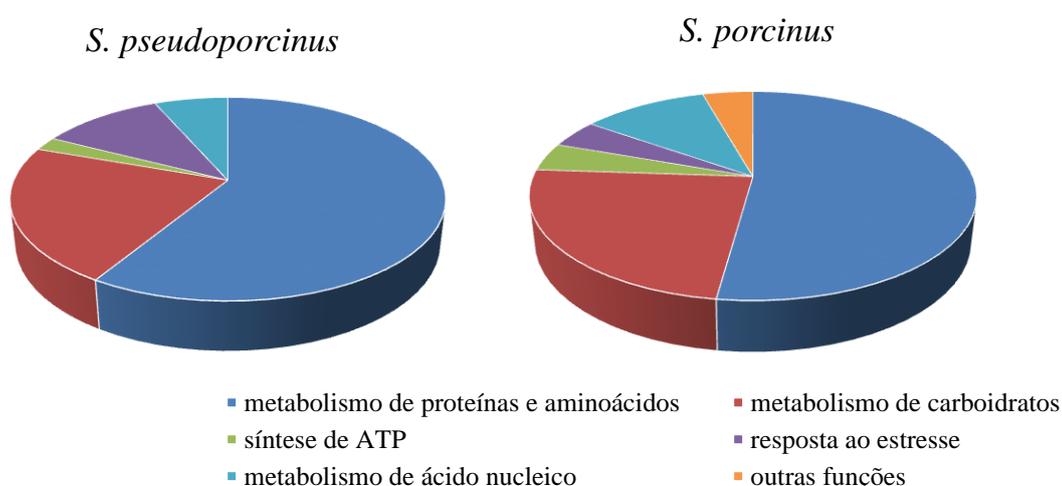
Amostras	Antimicrobianos					
	AMPICILINA (em µg/mL)			ERITROMICINA (em µg/mL)		
	CIM	CIB	% de aumento ²	CIM	CIB	% de aumento ²
<i>S. pseudoporcinus</i> (ATCC BAA-1381 ^T)	≤ 0,015	> 640	>40.000	0,12	> 640	>5.000
<i>S. porcinus</i> (ATCC 43138 ^T)	0,06	> 640	>10.000	0,12	> 640	>5.000

¹CIM, determinada pelo teste de microdiluição em caldo; ²percentual de aumento da CIB em relação a CIM

A aplicação da técnica de espectrometria de massa (ESI-Q-TOF) permitiu identificar um total de 92 proteínas, sendo 46 para cada amostra tipo das espécies *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus*. A análise das sequências de peptídeos revelou que para *S. pseudoporcinus* foram identificadas 27 proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e proteínas, 10 relacionadas ao metabolismo de carboidratos, uma única relacionada à síntese de ATP, cinco proteínas relacionadas ao metabolismo de ácido nucleico e três correspondentes a outras funções. Em *S. porcinus* foram identificadas 24 proteínas relacionadas ao metabolismo de proteínas e aminoácidos, 11 relacionadas ao metabolismo de carboidratos, duas a síntese de ATP, duas a resposta ao estresse, cinco ao metabolismo de ácido nucleico e duas correspondentes a outras funções. A análise funcional foi realizada na base de dados EMBL-

Bank (<<http://www.ebi.ac.uk/embl>>). A distribuição das proteínas por espécie e por categoria funcional está apresentada na FIGURA 10.

Figura 10 – Distribuição das proteínas por função biológica obtidas das amostras tipo de *Streptococcus pseudoporcinus* (ATCC BAA-1381^T) e de *Streptococcus porcinus* (ATCC 43138^T), após separação por SDS-PAGE e identificação por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF)



Na Tabela 7 estão identificadas as proteínas encontradas pela análise proteômica, agrupadas de acordo com sua função, identificadas com o respectivo código do banco de dados *Swiss Prot*. Para garantir uma segurança maior na identificação, somente foram listadas as proteínas que apresentavam um $score \geq 60$. É possível notar a presença de diversas proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, provavelmente pelo fato do extrato proteico ter sido confeccionado no momento de crescimento exponencial das células bacterianas.

Tabela 7 – Caracterização¹ das proteínas das amostras tipo de *Streptococcus pseudoporcinus* (ATCC BAA-1381^T) e de *Streptococcus porcinus* (ATCC 43138^T) identificação por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF)

Função biológica / Proteínas	SwissProt (código de acesso)	Amostras	
		ATCC BAA-1381 ^T	ATCC 43138 ^T
• Metabolismo de Aminoácidos e proteínas:			
Fator de elongação Tu	EFTU_STRP3 EFTU_STRS2	+	+
Fator de elongação G	EFG_STRU0 EFG_STRU0	+	+
Fator de elongação Ts	EFTS_STRPD	+	-
Fator de elongação P	EFP_STREM	+	-
Arginina deaminase	ARCA_STRU0	+	+
Ornitina carbamoiltransferase	OTC_STRU0	+	+
Proteína ribossomal 50S L1	RL1_STRU0	+	+
Proteína ribossomal 50S L2	RL2_STRU0	+	+
Proteína ribossomal 50S L3	RL3_STRU0 RL3_STRT1	+	+
Proteína ribossomal 50S L4	RL4_STRSV RL4_STRP1	-	+
Proteína ribossomal 50S L5	RL5_STRU0	+	+
Proteína ribossomal 50S L6	RL6_STRU0	+	-
Proteína ribossomal 50S L7/L12	RL7_STRE4	-	+
Proteína ribossomal 50S L13	RL13_LACPL	+	-
Proteína ribossomal 50S L14	RL14_STRA1	-	+
Proteína ribossomal 50S L15	RL15_STRU0	+	-
Proteína ribossomal 50S L16	RL16_STRU0	+	-
Proteína ribossomal 50S L17	RL17_LACLA	+	-
Proteína ribossomal 50S L20	RL20_STRP1	+	-
Proteína ribossomal 50S L22	RL22_STRA1	+	-
Proteína ribossomal 30S S1	RS1_STRR6	+	+
Proteína ribossomal 30S S2	RS2_STRE4	-	+
Proteína ribossomal 30S S3	RS3_STRU0	+	+
Proteína ribossomal 30S S4	RS4_STRU0	+	+
Proteína ribossomal 30S S5	RS5_STRP6 RS5_STRR6	+	+
Proteína ribossomal 30S S7	RS7_STRU0	+	+
Proteína ribossomal 30S S8	RS8_STRP1	+	+
Proteína ribossomal 30S S9	RS9_STRR6	+	-
Proteína ribossomal 30S S10	RS10_STRE4	-	+

Continua

Tabela 7 – Caracterização¹ das proteínas das amostras tipo de *Streptococcus pseudoporcinus* (ATCC BAA-1381^T) e de *Streptococcus porcinus* (ATCC 43138^T) por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF). Continuação

Função biológica / Proteínas	SwissProt (código de acesso)	Amostras	
		ATCC BAA-1381 ^T	ATCC 43138 ^T
Proteína ribossomal 30S S11	RS11_STRA1	+	-
Proteína ribossomal 30S S12	RS12_STRP1	+	-
Proteína ribossomal 30S S13	RS13_STRPB	+	-
Partícula de proteína de reconhecimento de sinal	SRP54_STRMU	-	+
Superóxido dismutase	SODM_STRPO	-	+
Fator de iniciação de tradução IF-2	IF2_STRE4	-	+
Fator de reciclagem de ribossomo	RRF_STRE4	-	+
• Metabolismo de Carboidratos:			
Enolase	ENO_STRS2	+	+
	ENO_STRA1		
Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	G3P_STREQ	+	+
Glutamino-frutose-6-fosfato aminotransferase	GLMS_STRP6	+	-
	ACKA_STRA3		
Acetato quinase	ACKA_STREM	+	+
	ACKA_STRU0		
	ACKA_STRP1		
Fosfoglicerato quinase	PGK_STRP2	+	+
	PGK_STRR6		
	PGK_LACPL		
Trifostato isomerase	TPIS_STRA1	+	-
Formato acetiltransferase	PFL_STRMU	+	+
Piruvato quinase	KPYK_LACLA	+	+
Frutose bifosfato aldolase	ALF_STRP1	-	+
Glicose-6-fosfato isomerase	G6PI_STREM	-	+
Fosfoglicerato mutase	GPMA_STRU0	-	+
Lactato desidrogenase	LDH_STRU0	-	+
• Síntese de ATP:			
ATP sintase subunidade alfa	ATPA_STRU0	+	+
	ATPA_STRPD		
ATP sintase subunidade beta	ATPB_STRU0	-	+
• Resposta ao Estresse:			
Chaperonina 60 kDa	CH60_STRA1	+	+
Chaperona DnaK	DNAK_STRAG	+	+
	DNAK_STRPZ		

Continua

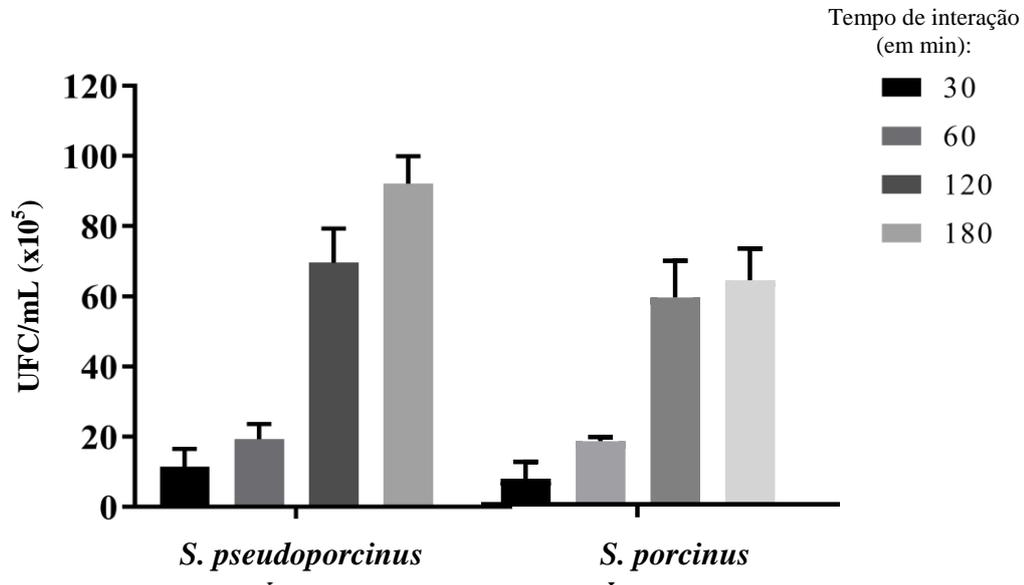
Tabela 7 – Caracterização¹ das proteínas das amostras tipo de *Streptococcus pseudoporcinus* (ATCC BAA-1381^T) e de *Streptococcus porcinus* (ATCC 43138^T) por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF). Continuação

Função biológica / Proteínas	SwissProt (código de acesso)	Amostras	
		ATCC BAA-1381 ^T	ATCC 43138 ^T
• Metabolismo de Ácido Nucleico:			
RNA polimerase subunidade alfa	RPOA_STRS2 RPOA_STRA1	+	+
RNA polimerase subunidade beta	RPOC_STRR6	-	+
Uracil fosforibosil transferase	UPP_STRU0 UPP_STRE4	+	+
Repressor transcricional de CodY sensor de GTP	CODY_STRU0	+	-
Fosforilase de Purina Nucleosidica tipo DeoD	DEOD_STRPB	+	+
CTP sintetase	PYRG_STRA1	+	-
Ribose-fosfato pirofosfoquinase	KPRS1_STRPN	-	+
• Outras Funções:			
Fator <i>trigger</i>	TIG_STRU0 TIG_STRE4	+	+
Acetil-coA carboxilase carboxil transferase subunidade Beta	ACCD_STRE4	+	-
AAC/APH Bifuncional	AACA_ENTFA	+	-
Provável pirofosfatase inorgânica manganês dependente	PPAC_STRU0	-	+

Legenda: ¹A caracterização das proteínas foi realizada com auxílio do *Mascot* (ver Materiais e Métodos), com escores iguais ou superiores a 60 e $p < 0,01$; ²A função determinada por consulta a base de dados EMBL-Bank (<http://www.ebi.ac.uk/embl>); SDS-PAGE, eletroforese em gel de poliacrilamida acrescido de dodecil sulfato de sódio.

Considerando-se aderência como uma etapa fundamental ao estabelecimento de um processo infeccioso, foi avaliado também a capacidade da amostra tipo de *S. pseudoporcinus* em aderir a células de linhagem HeLa. Os resultados foram comparados com os obtidos para a amostra tipo de *S. porcinus*. Foi demonstrado que a adesão às células HeLa, em ambas as espécies, ocorreu na ordem de grandeza de até 10 já com 30 min de contato. Para ambas espécies, o número de células aderidas aumentou de maneira progressiva até 180 min. Entretanto, foi observado que o número de células de *S. pseudoporcinus* aderidas foi de até 100% maior do que de *S. porcinus* nos tempos avaliados (FIGURA 11).

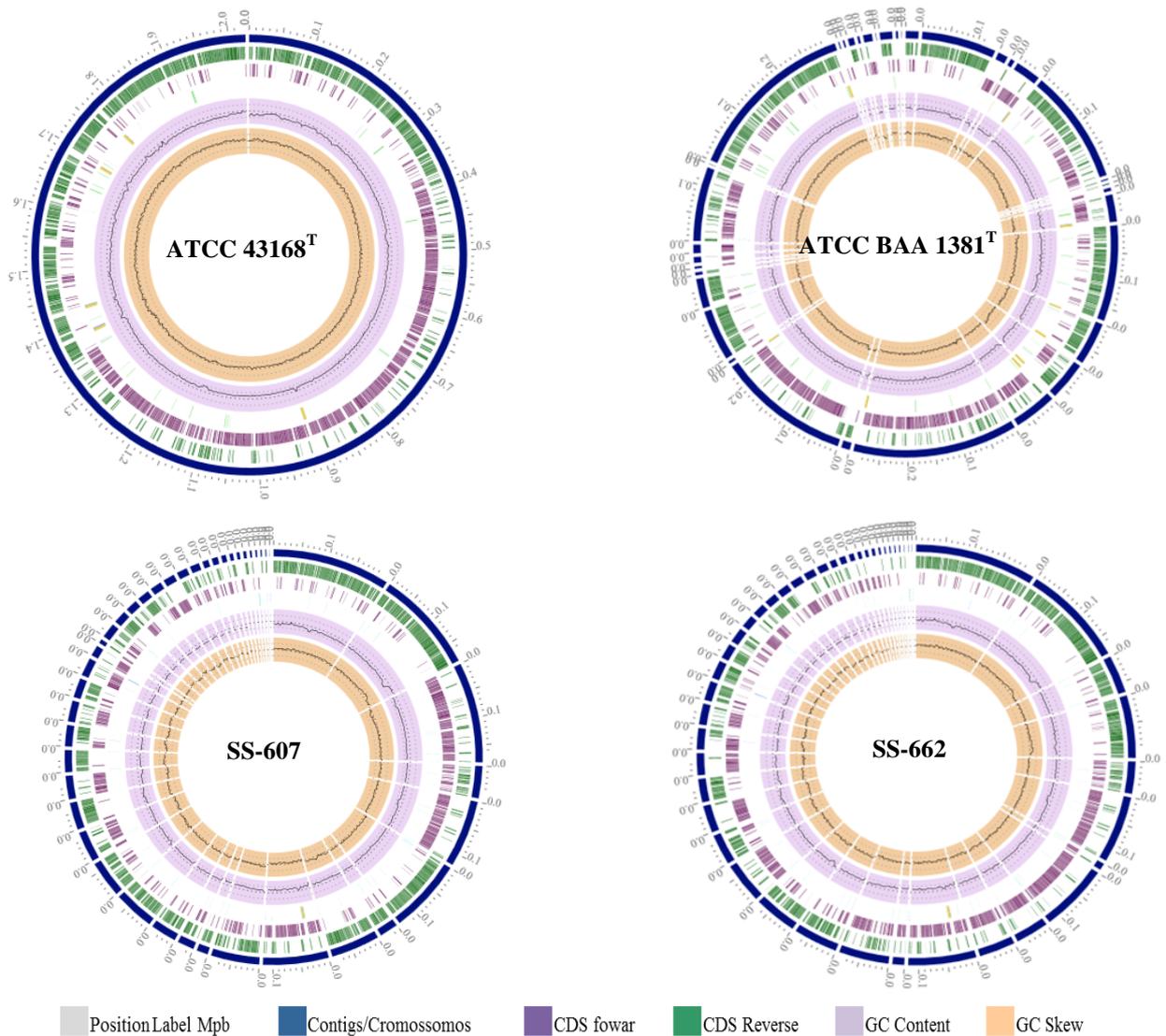
Figura 11 – Interação das amostras tipo de *Streptococcus pseudoporcinus* (ATCC BAA-1381^T) e de *Streptococcus porcinus* (ATCC 43138^T) com células HeLa



Legenda: Colunas representam as médias das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) em três experimentos independentes com três réplicas cada; barras representam desvio padrão.

Em relação às análises realizadas com as sequências do genoma completo das amostras de *S. pseudoporcinus* foi observado que, para a amostra tipo desta espécie ATCC BAA-1381^T, de origem humana, foram identificados 2.045 genes preditos, 37,23% de conteúdo G+C, 20 operons de rRNA, 58 genes de tRNA. Para as amostras de origem de leite, a SS-607 apresentou 2.082 genes preditos, 37,39% de conteúdo C+G, quatro operons de rRNA, 42 genes de tRNA; e SS-607 apresentou 2.088 genes preditos, 37,34% de conteúdo C+G, quatro operons de rRNA, 43 genes de tRNA (FIGURA 12). Já a amostra tipo de *S. porcinus* (ATCC 43168^T) apresentou 1.956 genes preditos, 36,8% de conteúdo C+G, 15 operons de rRNA, 57 genes de tRNA.

Figura 12 – Mapa circular do genoma de amostras das espécies *S. porcinus* (ATCC 43168^T) e *S. pseudoporcinus* de origem humana (ATCC BAA-1381^T) e de leite (SS-607 e SS-662)

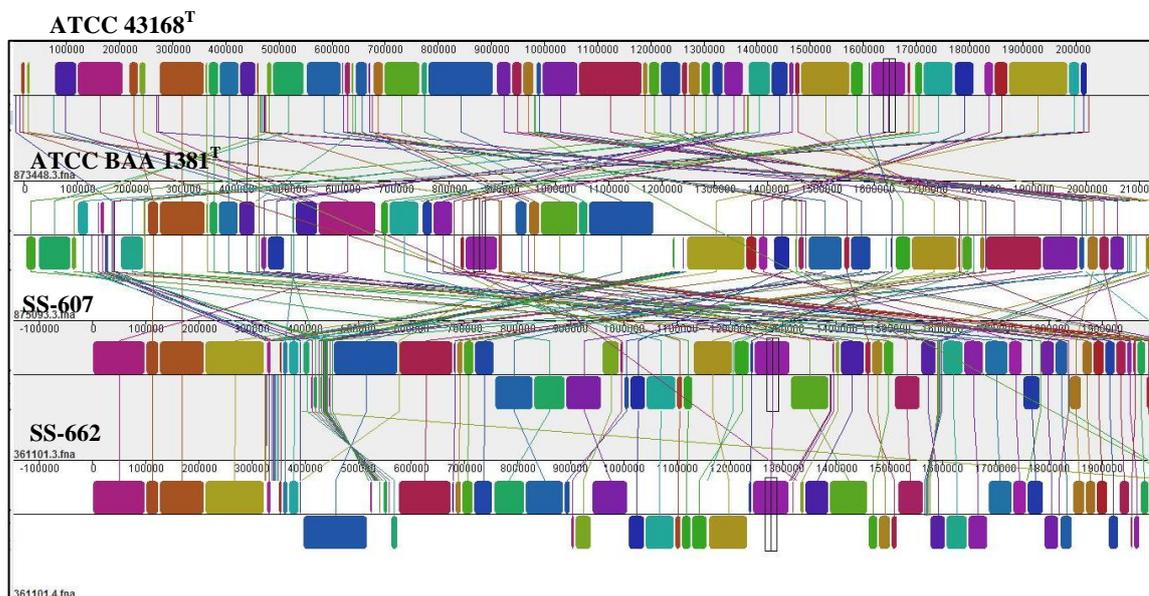


Legenda: Mapa construído utilizando a ferramenta CGview na plataforma PATRIC; G, guanina; C, citosina; GC content+; GC skew – (Assimetria do conteúdo GC nas fitas positiva e negativa). *S. porcinus* / 1 contig; *S. pseudoporcinus* ATCC 43168^T / 34 contigs; SS-607/44 contigs e SS-662/47 contigs.

O alinhamento dos genomas revelou que as amostras de *S. pseudoporcinus*, ATCC BAA 1381^T, SS-607 e SS-662, apresentaram algumas exclusões e várias regiões de inversões e translocações em relação ao genoma da amostra ATCC 43168 de *S. porcinus*. Foi observado também, vários rearranjos decorrentes de translocação e inversões de regiões de sequência nos genomas das amostras de *S. pseudoporcinus*, entretanto as amostras isoladas de animal, SS-

607 e SS-662, foram mais relacionadas e apresentou um menor número de rearranjos cromossômicos quando comparadas a amostra de *S. pseudoporcinus* de origem humana (FIGURA 13).

Figura 13 – Alinhamento do genoma de amostras das espécies *S. porcinus* (ATCC 43168^T) e *S. pseudoporcinus* de origem humana (ATCC BAA-1381^T) e de leite (SS-607 e SS-662)



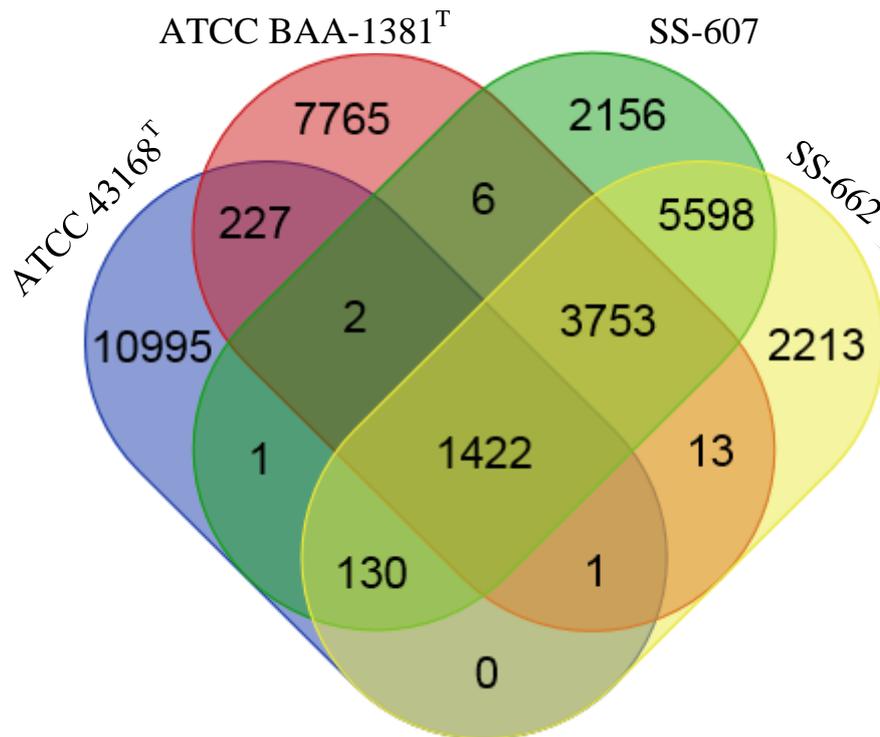
Legenda: Alinhamento dos genomas usando o software Mauve. Os blocos com cores idênticas representam blocos colineares locais (LCB), indicando regiões de DNA homólogas compartilhadas por dois ou mais cromossomos sem rearranjos de sequência. Os LCB indicados abaixo da linha preta horizontal representam regiões que alinham na orientação inversa. Rearranjos cromossômicos e inversões de regiões de sequência podem ser vistos representados por blocos coloridos ligados pelas linhas.

Das proteínas previstas a partir da anotação do genoma sequenciado, foram identificadas 13.189 proteínas para a amostra de *S. pseudoporcinus* ATCC 43168^T; e para SS-607 e SS-662 (amostras isoladas de leite), foram previstas um total de 13.068 e 13.130, respectivamente. Já para a amostra de *S. porcinus* o número de proteínas previstas foi de 12.778.

Um total de 1.422 proteínas previstas foi compartilhado pelos quatro genomas (FIGURA 14). Das proteínas previstas a partir da anotação dos genomas, observamos que a amostra de *S. porcinus*, apresentou um total de 10.995 proteínas não compartilhadas com os

genomas de *S. pseudoporcinus* avaliados. Já as amostras de *S. pseudoporcinus* isoladas de leite, SS-607 e SS-662, compartilharam um maior número de proteínas preditas entre si (5.598); enquanto que, a amostra isolada de humano compartilhou 3.759 e 3.766 proteínas com a amostra SS-607 e SS-662, respectivamente. Isto demonstrou uma diferença maior entre a amostra humana e as oriundas de leite do que estas duas entre si. As três amostras de *S. pseudoporcinus* compartilharam entre si um total de 3.753 proteínas preditas (FIGURA 14).

Figura 14 – Diagrama de Venn construído para determinar a relação das proteínas preditas do genoma de amostras das espécies *S. porcinus* (ATCC 43168^T) e *S. pseudoporcinus* de origem humana (ATCC BAA-1381^T) e de leite (SS-607 e SS-662)

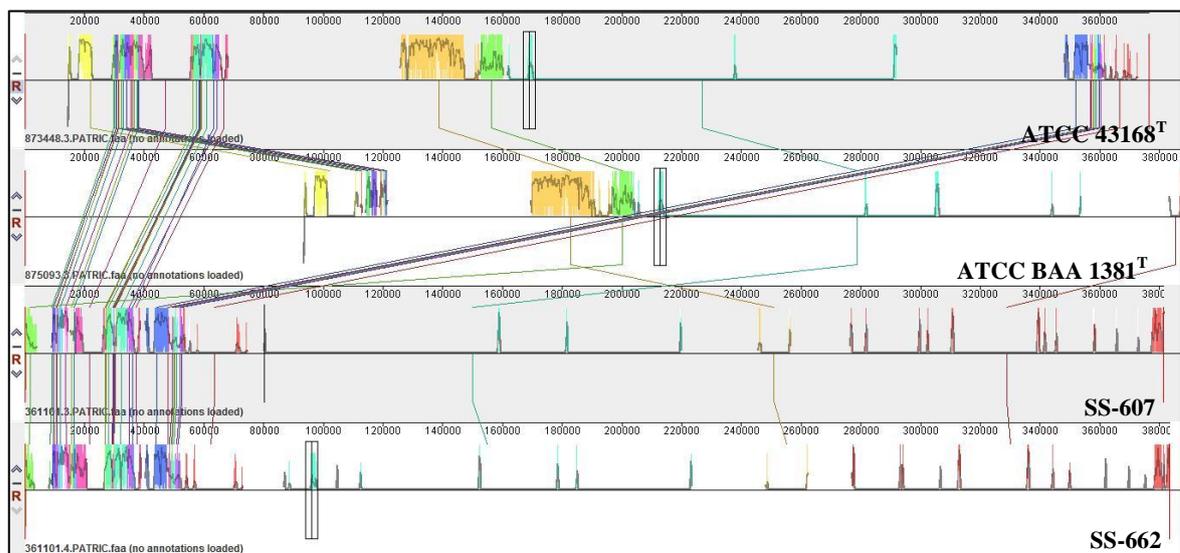


Legenda: Diagrama de Venn apresentando o número de proteínas preditas pelo sequenciamento do genoma completo, compartilhadas ou não entre as amostras. As amostras foram representadas por cores diferentes. Os números na região interseccional indicam proteínas compartilhadas por duas ou mais amostras.

O alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos de proteínas preditas dos genomas sequenciados revelou um elevado número de eventos de translocação entre a

amostra de *S. porcinus* com as de *S. pseudoporcinus*. Também foi observado que as amostras da espécie *S. pseudoporcinus*, SS-607 e SS-662, isoladas de leite, foram altamente relacionadas entre si e determinaram uma menor homologia com a de origem humana. Proteínas homólogas preditas e que se encontravam na região de 280.000 a 380.000 (pelo Mauve) foram observadas apenas para as amostras de *S. pseudoporcinus*; mesmo a amostra de origem humana tendo demonstrado uma menor região de homologia com as amostras provenientes de leite (FIGURA 15).

Figura 15 – Alinhamento das proteínas preditas a partir das sequências do genoma de amostras das espécies *S. porcinus* (ATCC 43168^T) e *S. pseudoporcinus* de origem humana (ATCC BAA-1381^T) e de leite (SS-607 e SS-662)



Legenda: Alinhamento das sequências de aminoácidos originárias da anotação dos genomas usando o software Mauve. As regiões de mesma cor representam homologia do mesmo bloco em locais colineares do genoma.

O sequenciamento do genoma também revelou a presença de determinantes de resistência a tetraciclina. Na amostra de origem humana de *S. pseudoporcinus* foi identificado o gene *tetM*; enquanto que na amostra de *S. porcinus*, o gene *tetO*. Também, de forma surpreendente foi anotada uma enzima modificadora de aminoglicosídeos [aminoglicosídeo nucleotidiltransferase / ANT(6)], responsável pela resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, na amostra de *S. pseudoporcinus* de origem humana. Nas amostras de *S.*

pseudoporcinus isoladas de animal (SS-607 e SS-662) não foram anotados genes ou mutações associados a mecanismos de resistência aos antimicrobianos.

Como elementos relacionados à virulência dessas amostras, destacamos que em todas as amostras avaliadas (de *S. pseudoporcinus* e de *S. porcinus*) foram anotadas as proteínas cisteína protease de estreptococos SpeB (codificada por *speB*), a frutose bifosfato aldolase de classe II (codificada por *fba*) e a UTP--glucose-1-phosphate uridililtransferase (codificada por *galU*). Entretanto, apenas na amostras de *S. pseudoporcinus* foi identificada a proteína de ligação à fibronectina – Fbp.

A anotação do genoma também revelou a presença de fagos apenas no genoma de *S. porcinus*. Um fago intacto (PHAGE_Strept_Str_PAP_1_NC_028666) de origem em *Streptococcus* e dois incompletos, um de *Staphylococcus* e outro de *Bacillus*, foram anotados no genoma da amostra desta espécie avaliada.

4 DISCUSSÃO

Estudos relacionados ao esclarecimento das características e atributos de virulência e de resistência da espécie *Streptococcus pseudoporcinus*, considerado por alguns autores como uma espécie subnotificada, diante de sua proximidade filogenética com outras espécies do gênero, como *S. porcinus* e até mesmo *S. agalactiae*, ainda são raros. Após o reconhecimento de *S. pseudoporcinus* como uma nova espécie de estreptococos e a realocação de amostras anteriormente identificadas como *S. porcinus* (BEKAL *et al.*, 2006.), algumas poucas tentativas de estabelecimento da epidemiologia, prevalência, incidência e caracterização desses microrganismos foram realizadas. Nesse sentido, a relação de *Streptococcus pseudoporcinus* como agente de infecções em humanos vem sendo paulatinamente estabelecida (GAUDREAU *et al.*, 2007; STONER *et al.*, 2011, SHEWMAKER *et al.*, 2012).

A maioria dos estudos disponíveis tem relacionado *S. pseudoporcinus* à colonização e infecções do trato genitourinário feminino. Entretanto, casos descritos na literatura recente também associaram ruptura prematura de membranas e insuficiência cervical em mulheres grávidas à espécie *S. porcinus* (PEREIRA *et al.*, 2013). Portanto, ainda há características peculiares destas duas espécies que precisam ser determinadas, com a finalidade de esclarecer melhor a participação de ambas em infecções de origem humana, além dos casos descritos em animais. Sendo assim, é fundamental a busca de metodologias eficazes de discriminação entre essas espécies que possam subsidiar estudos epidemiológicos que esclareçam a participação de *S. pseudoporcinus* nas infecções humanas.

Este estudo teve por objetivo caracterizar diferentes aspectos de amostras pertencentes à espécie *S. pseudoporcinus* quanto à virulência, perfil de proteínas, métodos de caracterização (fenotípico, MALDI-TOF MS e molecular), resistência aos antimicrobianos e estudos de proteômica e genômica, em uma abordagem comparativa com amostras de *S. porcinus*. Cabe declarar que a amostragem utilizada neste estudo foi gentilmente cedida pelo *Streptococcus Laboratory* pertencente ao *Centers for Disease Control and Prevention*, um laboratório de referência mundial no estudo de microrganismos do gênero *Streptococcus* e que já estavam previamente caracterizadas em nível de espécie pelo emprego de uma bateria extensa de testes fisiológicos.

De fato, mesmo assim poucas são as diferenças relacionadas aos testes de caracterização fisiológica entre as espécies *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus*. Neste estudo, empregamos uma bateria de testes, apesar de também extensa, mais simplificada do que o

frequentemente sugerido para caracterização das espécies de *Streptococcus* (FACKLAM, 2002; SPELLERBERG; BRANDT, 2015). Nossos resultados obtidos neste estudo apontaram a hidrólise do hipurato como o teste que se mostrou mais discriminatório, dentre as provas convencionais que foram utilizadas. Este dado está de acordo com o relatado por Shewmaker e colaboradores (2012) que também consideraram este teste como diferencial para essas espécies.

Por outro lado, cabe ressaltar que o teste de hidrólise do hipurato também é considerado uma prova diferencial na caracterização de *S. agalactiae*, uma espécie há muito reconhecida como importante patógeno associado à colonização do trato genitourinário de gestantes, responsável, também, por doenças invasivas em neonatos e adultos imunossuprimidos (NAN *et al.*, 2015; VORNHAGEN; ADAMS WALDORF; RAJAGOPAL, 2017). Além disso, esses microrganismos estão também relacionados como causadores de mastite bovina, determinando com frequência impacto econômico à produção de leite (DEB *et al.*, 2013; KEEFE, 2012). Considerando a semelhança de quadros clínicos e hospedeiros entre *S. pseudoporcinus* e *S. agalactiae*, fica claro que a caracterização fisiológica baseada nos testes comumente indicado para caracterização das espécies do gênero *Streptococcus* falham na separação desses microrganismos, particularmente, frente à provas que fazem parte da rotina diagnóstica em laboratórios de microbiologia. Cabe ressaltar que, também como *S. agalactiae*, as amostras de *S. pseudoporcinus*, bem como *S. porcinus*, foram produtoras do fator CAMP.

Recentemente, a técnica de MALDI-TOF MS está se firmando como uma ferramenta eficaz em laboratórios de microbiologia, tanto para pesquisa quanto para a rotina diagnóstica, apesar da sugestão de utilização já tenha ocorrido há pelo menos três décadas (SENG *et al.*, 2009). Diante do interesse crescente no emprego dessa metodologia na caracterização bacteriana e da escassez de dados relativos a espécie em estudo, consideramos a necessidade de avaliar a eficácia da espectrometria de massa MALDI-TOF na caracterização de *S. pseudoporcinus*.

Neste estudo foi destacado como um parâmetro fundamental à esta análise, a etapa de preparação das amostras. Diversos estudos já declararam a importância desta etapa, visando a garantia de uma melhor qualidade dos espectros obtidos, que certamente resultam em uma caracterização mais eficiente, bem como uma maior reprodutibilidade dos resultados (DEVRIANEK *et al.*, 2012; McELVANIA *et al.*, 2013; SCHULTESS *et al.*, 2016; TOH-BOYO; WULFF; BASILE, 2012).

Assim, foram avaliadas três preparações diferentes baseadas na utilização direta da colônia, no emprego de ácido fórmico sobre a colônia e na extração de proteínas (com a

utilização de ácido fórmico e acetonitrila) como uma etapa prévia à análise no equipamento. Neste estudo, a metodologia de MALDI-TOF MS foi conduzida no equipamento da Bruker Daltonics, que inclui o espectrômetro de massa MicroflexLT e os softwares FlexControl e Biotyper 3.0. Protocolos diferentes foram empregados na tentativa também de avaliar se situações mais simples, menos laboriosas e rápidas (como o caso da aplicação direta da colônia bacteriana) seriam viáveis, considerando a maior praticidade para o uso por laboratórios de rotina.

Entretanto, os resultados obtidos reforçaram que, para as amostras avaliadas neste estudo, de ambas espécies *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus*, o preparo da amostra, através da extração prévia das proteínas pelo emprego de acetonitrila e ácido fórmico, se revelou como uma etapa fundamental para obtenção de bons escores, conseqüentemente, uma identificação mais segura. Além disso, foi observado também, que os parâmetros determinados pelo fabricante do equipamento, como níveis de segurança para caracterização de gênero de espécie, diretamente relacionado a escores iguais ou superiores a 2,300, podem ser revistos e adaptados para esses microrganismos. De fato, uma caracterização coerente foi obtida com escores a partir de 1,800, tanto para a espécie *S. pseudoporcinus*, quanto para *S. porcinus*.

A utilização diretamente da colônia sobre a placa de aço polido que é inserida diretamente no aparelho, seria a metodologia mais prática e rápida, mas foi observado que neste caso, 20,8% (5/24) das amostras de *S. pseudoporcinus* não foram identificadas (escores < 1,699). Da mesma forma, foi observado que 8,3% (2/24) das amostras não foram identificadas pelo método do emprego de ácido fórmico diretamente na colônia. Já a utilização de extratos proteicos, não somente garantiu a caracterização de todas as amostras incluídas neste estudo como também revelou valores baixos de desvio padrão, quando da análise dos escores obtidos. Este fato ressalta a homogeneidade desses valores, corroborando assim a eficácia do método.

Os escores obtidos pelo método de extração foram também avaliados no software BioNumerics (Applied Math, Belgica) para avaliação dos agrupamentos dessas amostras baseados nos espectros obtidos por essa metodologia. Os resultados obtidos foram surpreendentes e sugerem que a metodologia de MALDI-TOF MS, nessa plataforma utilizada para o uso em diagnóstico microbiológico, foi capaz de discriminar as espécies *S. pseudoporcinus* de *S. porcinus* em ramos distintos de uma árvore construída baseada no coeficiente de correlação de Pearson e agrupamento por *Neighbor joining*. Além disso, foi observado que, as amostras de *S. pseudoporcinus* de origem humana se reuniram em agrupamentos distintos das amostras oriundas de leite, que constituíram um agrupamento

único. Certamente, o número de amostras empregadas neste estudo é de fato reduzido para que possamos estabelecer com segurança a eficácia da metodologia de MALDI-TOF MS com esse nível de discriminação.

Além disso, o emprego de MALDI-TOF MS também nos permitiu sugerir a existência de biomarcadores que podem vir a auxiliar na separação dessas espécies. Considerando-se uma comparação de todas as amostras incluídas neste estudo, foi observado que um pico equivalente a 9446.56 m/z foi identificado em todas as amostras de *S. pseudoporcinus*, estando ausente nas de *S. porcinus*. Além deste, picos de 4064.66 m/z e 8127.83 m/z também foram ausentes em *S. porcinus* e presentes em *S. pseudoporcinus*, excetuando-se para amostra 1217-87, que se mostrou mais relacionada à *S. porcinus* que as demais amostras. Em relação à origem das amostras de *S. pseudoporcinus* foram também identificados picos de 6371.08 m/z, 5916.05 m/z e de 66371.08 m/z que foram mais relacionados as amostras de origem humana, e que certamente contribuíram para o arranjo distinto entre amostras de origens diferentes (humana e leite),

Além disso, a separação das amostras oriundas de leite em um ramo distinto, também foi observada com as análises filogenéticas obtidas pelo pareamento das sequências do gene *rrs*, que codifica o rRNA 16S, reiterando, portanto, o sucesso da metodologia de MALDI-TOF na caracterização das amostras utilizadas neste estudo. A análise da sequência do gene que codifica o 16S rRNA já foi declarada como o melhor método para a identificação de microrganismos da espécie *S. porcinus* e *Streptococcus pseudoporcinus* (DUARTE *et al.*, 2005).

Considerando uma comparação entre os arranjos obtidos pela metodologia de MALDI-TOF MS e a árvore filogenética construída pelo pareamento das sequências obtidas do gene *rrs*, para 25 das 30 amostras incluídas neste estudo, foi também possível observar outro resultado concordante, além da separação das amostras de leite em ramos distintos. Em ambas as metodologias, a amostra de *S. pseudoporcinus* 1217-87 foi destacada das demais. No caso dos resultados por MALDI-TOF-MS, esta amostra foi, dentre as de *S. pseudoporcinus*, a que se mostrou mais relacionada as de *S. porcinus*. Também, pelos arranjos obtidos pelas análises das sequências de *rrs*, a amostra de *S. pseudoporcinus* 1217-87 foi a mais destacada entre as amostras de origem humana, constituindo um ramo único na árvore filogenética. No momento, o único dado que dispomos para justificar esse achado é que, dentre as amostras incluídas no estudo 1217-87 é pertencente ao sorogrupo P de Lancefield (comunicação pessoal, Shewmaker ,P.L.) um dos mais frequentes associados a amostras de *S. porcinus* (DUARTE *et al.*, 2005; SPELLERBERG; BRANDT, 2015). Estes resultados podem

apenas sugerir uma maior proximidade dessa amostra com a espécie *S. porcinus*. Entretanto, análises adicionais, que incluam até mesmo o sequenciamento do genoma completo de 1217-87 são necessárias para que se possa determinar com segurança as razões desses achados. De qualquer forma, a concordância dos resultados obtidos, corroboram a eficácia da metodologia de MALDI-TOF na caracterização de *S. pseudoporcinus*.

Apesar dos relatos sobre *S. pseudoporcinus* serem extremamente escassos na literatura, um estudo recente destacou a importância da utilização de MALDI-TOF MS na caracterização desta espécie em um estudo de busca ativa, para identificação das taxas de colonização por *S. agalactiae* (SUWANTARAT *et al.*, 2015). A partir de 3.276 culturas de secreção do trato genital de mulheres, os autores identificaram 32 amostras (1,0%) de *S. pseudoporcinus* (cuja caracterização também foi confirmada pelo sequenciamento do gene *rrs*) e ressaltaram a importância do emprego de MALDI-TOF MS neste achado. Da mesma forma, declararam que o número reduzido de espectros disponíveis no banco de dados do equipamento, provavelmente refletem escores mais baixos do que os considerados como seguros para caracterização em nível de espécie. Os mesmos autores indicaram que apenas 53% das amostras de *S. pseudoporcinus* teriam sido identificadas com base nos critérios determinados pelo fabricante do aparelho. Esses dados corroboram nossos achados e indicam a eficácia dessa metodologia de caracterização de microrganismos, cuja utilização em maior escala ainda é recente, considerando que pode auxiliar em estudos sobre a prevalência de *S. pseudoporcinus* em casos de colonização e de infecção de origem humana.

A análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poli(acrilamida) acrescido de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) tem se mostrado relativamente simples, fácil e reprodutível para uma rápida e segura diferenciação e caracterização das espécies de diferentes gêneros bacterianos (MERQUIOR *et al.*, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 2011), pois determinam com frequência perfis espécie-específicos. Embora esta metodologia represente características fenotípicas, ela também proporciona uma excelente aproximação da informação genômica de um microrganismo. Entretanto, em nosso estudo, esta metodologia não se mostrou eficaz na discriminação das espécies *S. porcinus* e *S. pseudoporcinus*.

Sabendo da importância de se elucidar as características expressas por *S. pseudoporcinus*, realizamos uma investigação inicial, através de espectrometria de massas ESI-Q-TOF das diferentes proteínas expressas pela amostra tipo desta espécie em comparação à *S. porcinus*. As análises revelaram um padrão muito semelhante em ambas as espécies, que apresentaram proteínas envolvidas em diferentes funções como: metabolismo de carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, enovelamento de proteínas, biossíntese de ácidos graxos,

proteases, reações de oxirredução, síntese da parede celular e translocação de polipeptídeos e uma grande número de proteínas ribossomais. Porém, consideramos que, de forma cautelosa, os dados obtidos devam ser utilizados como suporte para avaliações futuras que empreguem metodologias quantitativas de espectrometria de massas. De qualquer forma, é interessante registrar que o perfil protéico dessas espécies; porém, sabemos da necessidade imperiosa na condução de análises quantitativas para que perfis comparativos entre as espécies possam ser melhor avaliados.

Streptococcus apresentam-se como causadores de infecções principalmente, devido ao potencial de colonização e infecção. Esta versatilidade certamente está associada a um arsenal de fatores de virulência que estão distribuídos entre a maioria dos membros do gênero, os quais incluem adesinas, toxinas, proteases e a formação de biofilmes. Este último proporciona aos microrganismos um ambiente em que podem se proteger das defesas do hospedeiro e de possíveis agentes antimicrobianos, atuando também como um reservatório. *Streptococcus* são conhecidos por formarem biofilmes em diferentes sítios anatômicos como superfície do dente, válvulas cardíacas e amígdalas, além de dispositivos médicos implantados (MOSCOSO; GARCÍA; LÓPEZ, 2006). No gênero destacam-se *S. mutans* e *S. pneumoniae*, como espécies cuja formação de biofilmes tem participação crucial no estabelecimento de infecção (JIANG *et al.*, 2016; WALSH & CAMILLI, 2011). Além disso, com relação ao *S. agalactiae*, existem amostras envolvidas em casos de mastite bovina, que levam a considerar que a cronicidade da infecção está diretamente relacionada a formação de biofilmes (CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011; MICHIE *et al.*, 2003). Porém, em *S. agalactiae* a participação de biofilmes nas infecções humanas ainda não está completamente esclarecido (KONTOGHIORGI *et al.*, 2009; PARKER *et al.*, 2016; RINAUDO *et al.*, 2010).

Apesar de nos últimos anos estudos sobre a formação de biofilmes e sua estrutura tem sido objeto de diversos estudos envolvendo diferentes gêneros e espécies bacterianas, não existem relatos, que sejam de nosso conhecimento até o momento, a cerca dessas características relacionadas as espécies *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus*. Diante disso, analisamos a formação de biofilmes por todas as amostras incluídas neste estudo. Também foi investigada a influência de concentrações de açúcares (sacarose e glicose), bem como dos antimicrobianos ampicilina e eritromicina, que rotineiramente são utilizados no tratamento de infecções estreptocócicas, no desenvolvimento dos biofilmes destes microrganismos.

Todas as amostras foram capazes de produzir biofilme em meio THB. Entretanto, as amostras de ambas espécies produziram biofilmes em níveis fracos a médios de acordo com o protocolo utilizado. Porém, ao avarliamos a influência de diferentes concentrações de glicose

e sacarose no desenvolvimento dos biofilmes de *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus*, foi observado um aumento considerável na biomassa acumulada determinando valores elevados de densidade ótica, indicando uma elevada formação dessas estruturas. Foi observado que os diferentes açúcares promoveram efeitos variados para ambas espécies. A glicose nas concentrações maiores gerou um leve decaimento na produção de biofilmes por *S. porcinus* quando comparado com as concentrações menores que mantiveram estável. O efeito em *S. pseudoporcinus* foi mais peculiar, onde na concentração de 0,5% houve uma leve redução, porém ocorreu um aumento considerável nas concentrações mais altas. Essa mesma espécie apresentou um comportamento mais previsível com relação a sacarose. O aumento na formação de biofilmes foi diretamente relacionado a concentração do açúcar, sendo o cultivo em 1% de glicose onde foram observadas os maiores valores de densidade ótica relativa a biomassa acumulada. Cabe ressaltar que nesta condição, foi observado um discreto declínio nos valores de densidade ótica para *S. porcinus*.

Sabe-se que, um dos fatores que influenciam na produção de biofilmes é a disponibilidade de nutrientes (MOHAMED; HUANG, 2007). O metabolismo de carboidratos é essencial para a geração de energia e em bactérias e tanto a aquisição, quanto o consumo de açúcares são etapas altamente reguladas. Portanto, a disponibilidade de tais moléculas, principalmente as que são facilmente metabolizadas, como a glicose, ativa e suprime outras vias catabólicas desencadeando diversos mecanismos (TITGEMEYER; HILLEN, 2002). Relatos presentes na literatura já demonstraram que o metabolismo de carboidratos regula a produção de biofilme, como por exemplo a rafinose que aumenta a formação por *S. mutans* quando cultivado mesmo em baixas concentrações de sacarose (NAGASAWA *et al.*, 2017; McDOUGALD *et al.*, 2011). Um efeito inverso pode ser exemplificado pela ação da glicose e lactose que reduzem a produção de biofilmes por *Streptococcus uberis* (MOLIVA *et al.*, 2017).

Esses processos foram denominados de repressão de catabólicos carbônicos (*carbon catabolite repression* – CCR), uma rede reguladora na qual genes responsáveis por um metabolismo de determinado carboidrato são silenciados durante o crescimento do microrganismo na presença de um outro açúcar de maior preferência (ASANUMA *et al.*, 2004, BLANCHETTE *et al.*, 2016). Portanto, existe um sensível controle que dependendo da disponibilidade de nutrientes regula a expressão gênica e certamente reflete nos níveis de produção de biofilmes (DUARTE *et al.*, 2008; PILLAI *et al.*, 2004; WILLENBORG *et al.*, 2011).

Diante dos dados obtidos, podemos sugerir que o processo de estímulo e repressão catabólica possa ser responsável, ou pelo menos um dos fatores, para a formação de biofilme nas condições apresentadas neste estudo. Um mecanismo que está envolvido nesse processo e que é capaz de perceber as variações de nutrientes, levando ativação ou repressão de genes, é o mediado por proteínas presentes na superfície bacteriana, que participam do sistema de fosfotransferases de açúcares (*sugar phosphotransferase system* - PTS) (GALINIER; DEUTSCHER, 2017). Este sistema além de estar relacionado com o metabolismo de carboidratos, está conectado a outros processos celulares relacionados a virulência e a própria formação de biofilmes. A sensibilidade do sistema está relacionada a composição do meio e varia de microrganismo para microrganismo (GÖRKE; STÜLKE, 2008). Consideramos essencial uma avaliação mais aprofundada dos dados apresentados em nosso estudo, para que possam ser identificados os mecanismos pelos quais a influência da presença de açúcares no meio de cultura tenha sido um diferencial na formação de biofilmes por *S. pseudoporcinus*.

Neste estudo foi avaliada a susceptibilidade para ampicilina e eritromicina, dos biofilmes formados pelas amostras tipo das espécies *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus*, comparativamente com a determinação da concentração inibitórias de células em cultura (planctônicas), por ensaios empregando o azul de Alamar.

A escolha pela ampicilina, um beta-lactâmico que atua na parede celular, se deve ao fato de ser um dos antimicrobianos utilizados para a profilaxia e tratamento das infecções estreptocócicas (HARANDIAN *et al.*, 2016). A segunda opção no tratamento das infecções estreptocócicas são os macrolídeos e as lincosaminas, particularmente para pacientes alérgicos aos beta-lactâmicos. O principal representante dos macrolídeos é a eritromicina que impede os movimentos de translocação do ribossomo fixando-se à subunidade ribossomal 50S (DE MOUY *et al.*, 2001; GONZÁLEZ; ANDREU, 2003).

Vários ensaios de susceptibilidade já demonstraram que células sésseis são capazes de tolerar níveis significativamente elevados de antimicrobianos em comparação com células planctônicas (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2002; MONZÓN *et al.*, 2002; HASHEM *et al.*, 2017) estabelecendo a resistência de biofilmes a ação destas substâncias. A estrutura do biofilme e matriz extracelular formada por polissacarídeos, proteínas e DNA, proporcionam um impedimento físico para as moléculas antimicrobianas, fazendo com que no interior da comunidade, a concentração destas não seja suficientemente alta para inibir o crescimento ou eliminar células. As reduzidas taxas de crescimento e de respiração celular e a presença de células persistentes impedem a ação de antimicrobianos que possuem mecanismo de ação no metabolismo de células ativas. Além disso, a presença

de enzimas que degradam moléculas bactericidas e bombas de efluxo auxiliam na defesa dessas estruturas (SINGH *et al.* 2017).

Neste estudo, foram realizados ensaios empregando azul de Alamar, na determinação dos valores de concentração inibitória de biofilmes (CIB), que foram definidos como a menor concentração do antimicrobiano que resultou em $\leq 50\%$ na redução do composto. O azul de Alamar é indicador de oxirredução, e tem sido usado para a determinação da susceptibilidade de biofilmes a drogas antimicrobianas devido à sua praticidade e menor custo (BANDEIRA *et al.*, 2013, DALECKI *et al.*, 2016; PETTIT; WEBER; PETTIT, 2009). Também, já foi empregado em ensaios de susceptibilidade de microrganismos cultivados na forma planctônica, bem como na determinação da citotoxicidade de células eucariotas (BACK *et al.*, 1999; COLLINS *et al.*, 1997).

A ação dos antimicrobianos testados nos biofilmes foi extremamente reduzida quando comparada com os resultados obtidos com as células planctônicas, nos levando a crer que o controle ou tratamento de infecções com a presença de biofilme das espécies testadas seria inaplicável. Os resultados apresentados estão de acordo com o descrito na literatura para outros microrganismos (Pettit *et al.*, 2005; Donlan & Costerton, 2002, Bandeira *et al.*, 2013).

Stewart e Costerton (2001) já afirmaram que quando no estado sésil, as bactérias tornam-se 10-1.000 vezes menos susceptíveis a vários agentes antimicrobianos do que células planctônicas. Nossos resultados apontaram valores ainda superiores a estes relativos a redução da susceptibilidade das espécies estudadas, tendo sido ainda mais evidente em relação a espécie *S. pseudoporcinus*.

Uma etapa importante tanto para a formação de biofilmes, quanto para o estabelecimento de uma infecção é adesão dos microrganismos às células do hospedeiro. Neste estudo foi avaliada a capacidade de *S. pseudoporcinus* em aderir a células da linhagem HeLa. Foram também conduzidos ensaios com a amostra tipo de *S. porcinus* para fins comparativos.

O cultivo de células HeLa representou a primeira linhagem bem sucedida *in vitro* de células humanas e é derivada de células oriundas de câncer cervical (MASTERS, 2002). Esta linhagem foi escolhida considerando a possível importância de *S. pseudoporcinus* na colonização e infecção do trato genital feminino.

Nossos dados demonstraram a capacidade de *S. pseudoporcinus* em aderir em células humanas. Entretanto, apesar dos resultados demonstrarem taxas inferiores, a amostra de *S. porcinus*, também apresentou valores consideráveis de adesão às células utilizadas. Consideramos que, a continuidade desses estudos possam vir a influenciar na determinação do

potencial patogênico da espécie *S. pseudoporcinus* corroborando com dados que determinem sua participação na patogênese das infecções humanas. Adicionalmente, dados iniciais que motivaram a separação das espécies *S. porcinus* e *S. pseudoporcinus* (BEKAL *et al.*, 2006; FACKLAM, 2002; FULDE *et al.*, 2013) como diferença de hospedeiros (animal e humano, respectivamente) precisam ser revistos, pois nossos resultados relativos a adesão à linhagem humana habilitam a ambas à interação e com o hospedeiro humano.

O fato de encontrarmos na análise genômica sequência relacionada a fibronectina, também, reforça a ideia de uma especialização de *S. pseudoporcinus* a adesão às células humanas. Outro dado que obtivemos, desta vez, através da análise proteômica das espécies e que dá respaldo a este potencial, é a presença de proteínas ligantes de constituintes teciduais. A gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, encontrada em ambas espécies, além de participar do metabolismo de carboidratos, possui reconhecida capacidade de se unir ao plasminogênio (BERGMANN *et al.*, 2004, MOREAU *et al.*, 2017). Outra proteína também encontrada, nas análises proteômicas, foi a enolase, que também apresenta as características de pertencer a via glicolítica e estar relacionada a adesão ao hospedeiro e evasão do sistema complemento humano (AGARWAL *et al.*, 2012 ; FULDE *et al.*, 2013). Essa propriedade da proteína de possuir mais de uma função a torna conhecida como *moonlighting protein*. DnaK e a fosfoglicerato quinase, ligante de plasminogênio e ligante de actina, respectivamente, enquadram-se nesta categoria e também foram encontradas em ambas amostras (BOONE; TYRRELL, 2012; HENRY *et al.*, 2015; JEFFERY, 2016).

Em 2012, Shewmaker e colaboradores propuseram a subdivisão de *S. pseudoporcinus* em duas subespécies de acordo com as diferenças de hospedeiro e variações em alguns testes bioquímicos (*S. pseudoporcinus* subsp *hominis* e *S. pseudoporcinus* subsp *lactis*). Essa proposta, ainda não referendada nos motivou a avaliar e comparar as sequências de genoma completo, por análises *in silico*.

Os dados obtidos em nossa análise genômica reforça esta proposta, pois foi observado que as amostras de origem animal, SS-607 e SS-662, apresentaram entre si uma menor quantidade de rearranjos e translocações do que quando comparadas com a amostra de *S. pseudoporcinus* de origem humana. Além disso, o número de proteínas preditas comuns entre as amostras SS-607 e SS-662 é consideravelmente maior do que entre a de origem humana. Esses dados, aliados aos provenientes do mapeamento desses genomas, podem ser considerados de relevância para sustentar propostas de separação dessas subespécies, que inclusive se relacionam com hospedeiros distintos. Adicionalmente, todas as demais análises realizadas neste estudo, como o alinhamento das sequências de *rrs*, e também de forma

surpreendente as análises por MALDI-TOF MS (que inclui o arranjo dos agrupamentos e a definição de picos específicos), indicam a existência de amostras com comportamentos distintos dentro de uma mesma espécie. Além disso, as análises do genoma completo também ressaltaram as diferenças entre *S. porcinus* e *S. pseudoporcinus*.

O alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de proteínas preditas dos genomas sequenciados revelou um elevado número de eventos de translocação entre a amostra de *S. porcinus* com as de *S. pseudoporcinus*. Também foi observado que as amostras da espécie *S. pseudoporcinus*, SS-607 e SS-662, isoladas de leite, foram altamente relacionadas entre si e determinaram uma menor homologia com a de origem humana.

A análise genômica também demonstrou a presença de elementos relacionados a virulência como cisteína protease de estreptococos SpeB (codificada por *speB*), a frutose bifosfato aldolase classe II (codificada por *fba*) e UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (codificada por *galU*), assim como a presença de fagos, reforçando o potencial de transferência gênica que pode incrementar tanto os fatores de virulência, quanto a resistência destes microrganismos. SpeB é uma cisteína proteinase e uma das toxinas eritrogênicas de reconhecida no gênero *Streptococcus*, sendo mais frequente pela espécie *S. pyogenes* (NELSON; GARBE; COLLINS, 2011). Este fato nos alerta para o potencial patogênico associado a essas amostras.

Uma proteína identificada pelas análises proteômicas em *S. pseudoporcinus* foi a acetiltransferase/fosfotransferase (AAC/APH), uma enzima bifuncional que confere a Gram positivos resistência a aminoglicosídeos (KRZYMIŃSKA *et al.*, 2015, SMITH *et al.*, 2014). Na genômica da mesma amostra, foi encontrado uma sequência relacionada a aminoglicosídeo 6-nucleotidiltransferase que também confere resistência a aminoglicosídeos (EL-BADAWY *et al.*, 2017, YU *et al.*, 2017). Esses dados nos parecem relativamente conflitantes e este fato precisa ser melhor avaliado. Entretanto, consideramos a hipótese de que as sequências proteicas podem de fato terem identificado uma enzima modificadora de aminoglicosídeos e apontou, mesmo que numa faixa de relativa segurança, uma das mais comuns presentes nos bancos de dados disponíveis. Assim, ressaltamos a existência desses marcadores em *S. pseudoporcinus*. Mas, possivelmente o gene anotado pelas análises genômicas seja o dado mais corretamente associado a essas amostras. Análises futuras deverão ser realizadas para traçar o perfil de resistência a um painel extenso de antimicrobianos pertencentes a classe aminoglicosídeos para que possamos definir o espectro de atuação da enzima anotada.

Ainda com relação a resistência aos antimicrobianos, na análise genômica foram encontrados determinantes de resistência a tetraciclina (*tetO* e *tetM*), que dão suporte aos resultados encontrados no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Foi, portanto, interessante notar que determinantes distintos foram relacionados a espécies diferentes (*S. pseudoporcinus* – *tetM*; *S. porcinus* – *tetO*). A resistência a tetraciclina, que já foi identificada em amostras dessas espécies em estudos anteriores (FACKLAM *et al.* 1995; DUARTE *et al.*, 2005, SHEWMAKER *et al.*, 2012).

Assim sendo, o grande motivador deste estudo foi considerar a necessidade de avaliar, uma coleção de amostras de *S. pseudoporcinus* frente a uma gama de metodologias que pudessem explorar diferentes aspectos relacionados a esta espécie, que sugestivamente tem sido subnotificada ao longo dos últimos anos. Nesse sentido, nossos dados tem a pretensão de se somar ao ainda escassos documentos disponíveis na literatura internacional, e de contribuir com resultados relacionados ao emprego de metodologias atuais, envolvendo genômica e proteômica, auxiliando no entendimento de diferentes aspectos relacionados a biologia dessa espécie de *Streptococcus*. Adicionalmente, foi nosso objetivo buscar metodologias que contemplem de maneira mais eficaz a discriminação entre *S. pseudoporcinus* e espécies altamente relacionadas, como *S. porcinus*. Neste contexto, consideramos que MALDI-TOF MS deva ser considerada como candidata, em estudos futuros, em avaliações adicionais envolvendo um número maior de amostras, como também, em análises comparativas com outras espécies filogeneticamente relacionadas.

CONCLUSÃO

Utilizando-se a bateria de testes propostos para a caracterização de cocos Gram-positivos, catalase negativos e beta-hemolíticos, não é possível a diferenciação entre as espécies *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus*. Os resultados obtidos neste estudo apontaram apenas a hidrólise do hipurato como o teste mais discriminatório, dentre as provas convencionais que foram utilizadas. Entretanto, este teste também é considerado um teste chave na caracterização de amostras de *S. agalactiae*, uma espécie há muito reconhecida como importante patógeno associado à colonização do trato genitourinário de gestantes, bem como agente de mastite bovina, compartilhando assim sítios que reconhecidamente estão também associados à *S. pseudoporcinus*.

Sem dúvidas a metodologia mais discriminatória para a caracterização dessa espécie envolve a comparação de sequências do gene *rrs* (rRNA 16S). Porém, neste estudo foi possível determinar que a metodologia de MALDI-TOF MS foi capaz de identificar corretamente todas as amostras de ambas espécies. Entretanto, ficou claro que uma atenção especial se faz necessária nas etapas de preparo das amostras, antes das análises no espectrômetro. Resultados eficazes somente foram obtidos quando as amostras foram submetidas a extração de proteínas com acetonitrila e ácido fórmico.

Os resultados obtidos por MALDI-TOF MS, revelaram que os parâmetros determinados pelo fabricante do equipamento, como níveis de segurança para caracterização de gênero de espécie, diretamente relacionado a escores iguais ou superiores a 2,300, devem ser revistos e adaptados para esses microrganismos. De fato, uma caracterização coerente foi obtida com escores a partir de 1,800, tanto para a espécie *S. pseudoporcinus*, quanto para *S. porcinus*. Além disso, foi possível identificar biomarcadores que podem ser melhor explorados na caracterização dessas espécies entre si e em relação a outro estreptococos.

Os espectros obtidos em MALDI-TOF MS, pelo método de extração, quando submetidos a uma avaliação automatizada foi capaz de produzir agrupamentos entre amostras relacionadas, que refletiram na discriminação intra e inter-espécies. Este dado foi coerente com os resultados obtidos pela metodologia comparação de sequências do gene *rrs*.

Apesar da técnica de SDS-PAGE ser uma boa indicação para uma rápida e segura diferenciação e caracterização das espécies de diferentes gêneros bacterianos, ela não foi capaz de discriminar entre as espécies *S. pseudoporcinus* e *S. porcinus*.

Um percentual considerável dentre as amostras pertencentes a espécie *S. pseudoporcinus*, bem como as de *S. porcinus*, foram não susceptíveis a tetraciclina. Além destes, percentuais de não susceptibilidade foram mais evidentes nas amostras de *S. pseudoporcinus* para os principais antimicrobianos utilizados no tratamento das estreptococcias, como ampicilina e eritromicina. De fato, as análises de genômica e proteômica identificaram importantes marcadores de resistência aos antimicrobianos nas amostras tipo dessas espécies, como aqueles relacionados a resistência a tetraciclina e a aminoglicosídeos.

Em relação à virulência foi observado que todas as amostras avaliadas de ambas as espécies são capazes de produzir biofilmes que se intensificam de maneira altamente perceptível, quando os microrganismos são cultivados em presença dos açúcares sacarose e glicose.

Proteínas relacionadas a virulência das amostras foram identificadas, além de outras relacionadas ao metabolismo de carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, enovelamento de proteínas, biossíntese de ácidos graxos, proteases, reações de oxirredução, síntese da parede celular e translocação de polipeptídeos e um grande número de proteínas ribossomais foram identificadas por proteômica. Enquanto que toxinas (SpeE), frutose bifosfato aldolase classe II (codificada por *fba*) e UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (codificada por *galU*), assim como a presença de fagos, reforçando o potencial de transferência gênica que pode incrementar tanto os fatores de virulência, quanto a resistência destes microrganismos, foram caracterizadas pela avaliação de genômica *n silico*.

A verificada adesão dos microrganismos às células humanas da linhagem HeLa, que foi mais evidente para a amostra tipo de *S. pseudoporcinus* do que *S. porcinus*. A presença de proteínas detectadas pela espectrometria de massas e previstas pela análise genômica, indica uma adaptação das espécies ao hospedeiro humano, revelando que esses microrganismos exibem um potencial patogênico.

Reunindo os resultados obtidos com MALDI-TOF MS e análise das sequências do gene *rrs* (16S rRNA), e as avaliações por proteômica e genômica consideramos que a proposta de criação de subespécies (*Streptococcus pseudoporcinus* subsp *hominis* e *Streptococcus pseudoporcinus* subsp *lactis*, SHEWMAKER *et al.*, 2012) associadas a esses microrganismos é coerente, já que amostras de hospedeiros diversos mostraram características distintas tanto fisiológicas como associadas ao seu genoma *Streptococcus pseudoporcinus* subsp *hominis* e *Streptococcus pseudoporcinus* subsp *lactis*.

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES J, NASCIMENTO MM, ZENG L, *et al.* CcpA regulates central metabolism and virulence gene expression in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 2008; 190(7): 2340-9.
- AGERGAARD CN, KNUDSEN E, DARGIS R, *et al.* Species identification of *Streptococcus bovis* group isolates causing bacteremia: a comparison of two MALDI-TOF MS systems. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017 May;88(1):23-25.
- AKIYAMA H, MORIZANE S, YAMASAKI O, *et al.* Assessment of *Streptococcus pyogenes* microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy. J Dermatol Sci. 2003; 32(3):193-9.
- AL-AJMI JA, HILL P, O' BOYLE C, *et al.* Group A *Streptococcus* Toxic Shock Syndrome: An outbreak report and review of the literature. J Infect Public Health. 2012 Dec;5(6):388-93. doi: 10.1016/j.jiph.2012.07.006. Epub 2012 Nov 30.
- ALATOOM AA, CUNNINGHAM SA, IHDE SM, *et al.* 2011. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 49:2868 –2873.
- ALICE R. WATTAM, JAMES J. Davis, *et al.* "Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center." Nucleic Acids Res 2017; 45 (D1): D535-D542.
- ALMEIDA RA, OLIVER SP. Growth curve, capsule expression and characterization of the capsular material of selected strains of *Streptococcus uberis*. Zentralbl Veterinarmed B. 1993; 40(9-10):697-706.
- ALMUZARA M, BARBERIS C, VELÁZQUEZ VR *et al.* Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) as a Reliable Tool to Identify Species of Catalase-negative Gram-positive Cocci not Belonging to the *Streptococcus* Genus. Open Microbiol J. 2016 Dec 28;10:202-208.
- AMORENA B, GRACIA E, MONZÓN M *et al.* Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. J Antimicrob Chemother. 1999; 44(1):43-55.
- AN JS, KIM K, CHO S *et al.* Compositional differences in multi-species biofilms formed on various orthodontic adhesives. Eur J Orthod. 2017 Jan 25.
- ANDERL JN, ZAHLLER J, ROE F *et al.* Role of Nutrient Limitation and Stationary-Phase Existence in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47:1251–6.

ANDERSON GG & O'TOLLE GA. Innate and inducet resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 322: 85-105.

ARCIOLA CR, CAMPOCCIA D, MONTANARO L *et al*. Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. *Expert Rev Mol Diagn*. 2002; 2(5):478-84.

ARNDT, D., GRANT, J., MARCU, A. *et al*. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.*, 2016 May 3.

ASANUMA N, YOSHII T, HINO T. Molecular characterization of CcpA and involvement of this protein in transcriptional regulation of lactate dehydrogenase and pyruvate formate-lyase in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Sep;70(9):5244-51.

AYENI FA, ANDERSEN C, NØRSKOV-LAURITSEN N. Comparison of growth on mannitol salt agar, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, VITEK® 2 with partial sequencing of 16S rRNA gene for identification of coagulase-negative staphylococci. 2017 *Microb Pathog.*;105:255-259.

BACK SA, KHAN R, GAN X *et al*. A new Alamar Blue viability assay to rapidly quantify oligodendrocyte death. *J Neurosci Methods*. 1999; 91(1-2):47-54.

BAILLIE GS, DOUGLAS LJ. Candida biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Methods Enzymol*. 1999; 310:644-56.

BAKER JL, FAUSTOFERRI RC, QUIVEY RG. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans*-the more we know, the more we don't. *Mol Oral Microbiol*. 2017 Apr;32(2):107-117.

BALDASSARRI L, CRETU R, RECCHIA S *et al*. Therapeutic failures of antibiotics used to treat macrolide-susceptible *Streptococcus pyogenes* infections may be due to biofilm formation. *J Clin Microbiol*. 2006 Aug;44(8):2721-7.

BALTER S, BENIN A, PINTO SW *et al*. Epidemic nephritis in Nova Serrana, Brazil. *Lancet*. 2000; 355(9217):1776-80.

BANAS JA, VICKERMAN MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(2):89-99.

BANDEIRA TDE J, MOREIRA CA, BRILHANTE RS *et al* . In vitro activities of amoxicillin-clavulanate, doxycycline, ceftazidime, imipenem, and trimethoprim-sulfamethoxazole against biofilm of Brazilian strains of *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Nov;57(11):5771-3.

BEALL B, FACKLAM RR, JACKSON DM *et al*. Rapid screening for penicillin susceptibility of systemic pneumococcal isolates by restriction enzyme profiling of the pbp2B gene. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(8):2359-62

- BEKAL S, GAUDREAU C, LAURENCE RA *et al.* *Streptococcus pseudoporcinus* sp. nov., a novel species isolated from the genitourinary tract of women. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(7):2584-6.
- BENGA L, FRIEDL P, VALENTIN-WEIGAND P. Adherence of *Streptococcus suis* to porcine endothelial cells. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005; 52(9):392-5.
- BERLANGA M, GUERRERO R. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb Cell Fact.* 2016 Oct 1;15(1):165.
- BERNE C, KYSELA DT, BRUN YV. A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm. *Mol Microbiol.* 2010; 77(4):815-29
- BIZZINI A, DURUSSEL C, BILLE J *et al.* 2010. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 48:1549 –1554.
- BIZZINI, A. & GREUB, G Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 1614-1619, 2010
- BLANCHETTE KA, SHENOY AT, MILNER J 2ND *et al.* Neuraminidase A-Exposed Galactose Promotes *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Formation during Colonization. *Infect Immun.* 2016 Sep 19;84(10):2922-32.
- BLEHERT DS, PALMER RJ JR, XAVIER JB *et al.* Autoinducer 2 production by *Streptococcus gordonii* DL1 and the biofilm phenotype of a luxS mutant are influenced by nutritional conditions. *J Bacteriol.* 2003;185(16):4851-60.
- BOGAERT, D.; DE GROOT, R. & HERMANS, P. W. M. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. *Lancet. Infect. Dis.*, 4, 144-154, 2004.
- BORRIELLO G, WERNER E, ROE F *et al.* Oxygen Limitation Contributes to Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:2659–64.
- BOUDJEMAA, R. *et al.* New insight into daptomycin bioavailability and localization in *Staphylococcus aureus* biofilms by dynamic fluorescence imaging. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 60, n. 8, p. 4983-4990, 2016.
- BOWDEN GH, LI YH. Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res.* 1997; 11(1):81-99
- BOWEN WH, KOO H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45(1):69-86.
- BOWEN WH. Dental caries - not just holes in teeth! A perspective. *Mol Oral Microbiol.* 2016 Jun;31(3):228-33.

BRANDT CM, SPELLERBERG B. Human infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. Clin Infect Dis. 2009;49(5):766-72.

BRIANDET R, HERRY J, BELLON-FONTAINE M. Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static Gram-positive microbial biofilms. Colloids Surf B Biointerfaces. 2001; 21(4):299-310.

BROUWER S, BARNETT TC, RIVERA-HERNANDEZ T, *et al.* *Streptococcus pyogenes* adhesion and colonization. FEBS Lett. 2016 Nov;590(21):3739-3757.

BURNHAM CA, SHOKOPLES SE, TYRRELL GJ. Invasion of HeLa cells by group B *Streptococcus* requires the phosphoinositide-3-kinase signalling pathway and modulates phosphorylation of host-cell Akt and glycogen synthase kinase-3. Microbiology. 2007;153(Pt 12):4240-52.

CABALLERO GÓMEZ N, ABRIOUEL H, ENNAHAR S *et al.* Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* exposed to enterocin AS-48 in planktonic and sessile states. Int J Food Microbiol. 2013 Oct 15;167(2):202-7.

CAGGIANO S, ULLMANN N, DE VITIS E *et al.* Factors That Negatively Affect the Prognosis of Pediatric Community-Acquired Pneumonia in District Hospital in Tanzania. Int J Mol Sci. 2017 Mar 13;18(3).

CAMILLI R, PANTOSTI A, BALDASSARRI L. Contribution of serotype and genetic background to biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30(1):97-102.

CERCA N, MARTINS S, SILLANKORVA S *et al.* Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. Appl Environ Microbiol. 2005;71(12):8677-82.

CHAO Y, BERGENFELZ C, HÅKANSSON AP. In Vitro and In Vivo Biofilm Formation by Pathogenic Streptococci. Methods Mol Biol. 2017;1535:285-299.

CHARLAND N, NIZET V, RUBENS CE *et al.* *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. Infect Immun. 2000; 68(2):637-43.

CHERKAOUI A, HIBBS J, EMONET S *et al.*. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. 2010 J. Clin. Microbiol. 48:1169 –1175.

CHUA, S.L. *et al.* Selective labelling and eradication of antibiotic-tolerant bacterial populations in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Nat. Commun., v. 7, p. 10750, 2016.

CLARK AE, KALETA EJ, ARORA A . *et al* 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin Microbiol Ver 26:547–603.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, document M100-S17. CLSI, Wayne, Pa, USA

COLLINS L, FRANZBLAU SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(5):1004-9.

COLLINS MD, FARROW J, KATIC V *et al*. Taxonomic studies on streptococci of serological groups E, P, U and V: Description of *Streptococcus porcinus* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol*. 5:402-413

COLMAN G, WILLIAMS RE. The cell walls of streptococci. *J Gen Microbiol*. 1965; 41(3):375-87.

COLMAN G. *Streptococcus* and *Lactococcus*. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology, and Immunity. 8th ed.; 1991. 119–59.

CONTRERAS GA, RODRÍGUEZ JM. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011; 16(4):339-56.

COSTALONGA M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett*. 2014 Dec;162(2 Pt A):22-38.

COSTERTON JW, CHENG KJ, GEESEY GG *et al*. Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Ann. Rev. Microbiol*. 1987. 41: 435-464

COSTERTON JW, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL DE *et al*. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995; 49:711-45.

COURTNEY HS, OFEK I, PENFOUND T *et al*. Relationship between expression of the family of M proteins and lipoteichoic acid to hydrophobicity and biofilm formation in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One*. 2009;4(1):e4166.

COYKANDALL AL. Classification and identification of the viridans streptococci. *Clin Microbiol Rev*. 1989; 2(3):315-28.

CROUCHER NJ, HARRIS SR, GRAD YH *et al*. Bacterial genomes in epidemiology--present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013 Feb 4;368(1614):20120202.

CUNNINGHAM MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13(3):470-511.

DAGAN R, LEIBOVITZ E, CHELETZ G *et al*. Antibiotic treatment in acute Otitis Media promotes superinfection with resistant *Streptococcus pneumoniae* carried before initiation of treatment. *J Infect Dis*. 2001 Mar 15;183(6):880-6.

DALEBROUX ZD, SVENSSON SL, GAYNOR EC *et al*. ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010; 74(2):171-99.

DALECKI AG, CRAWFORD CL, WOLSCHEENDORF F. Targeting Biofilm Associated *Staphylococcus aureus* Using Resazurin Based Drug-susceptibility Assay. J Vis Exp. 2016 May 5;(111)

DARLING AC, MAU B, BLATTNER FR *et al.* Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. Genome Res. 2004Jul;14(7):1394-403.

DARLING AC, MAU B, BLATTNER FR *et al.* Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. Genome Res 14, 1394–1403 (2004)

DAVEY ME & O'TOOLE GA. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. Microbiol Mol Biol Rev. 2000; 64: 847–67.

DE MOUY D, CAVALLO JD, LECLERCQ R, *et al.* Antibiotic susceptibility and mechanisms of erythromycin resistance in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae*: French multicenter study. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(8):2400-2.

DEB R, KUMAR A, CHAKRABORTY S, *et al.* Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. Pak J Biol Sci. 2013 Dec 1;16(23):1653-61.

DELAQUIS, P. J., CALDWELL, D. E., LAWRENCE, J. R. *et al.* Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from biofilms on glass surfaces in response to nutrient stress. Microb. Ecol. 1989; 18:199–210

DELILLE, A., QUILES, F. & HUMBERT, F. In situ monitoring of the nascent *Pseudomonas fluorescens* biofilm response to variations in the dissolved organic carbon level in low-nutrient water by attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy. Appl. Environ. Microbiol., 2007; 73:5782–8

DENEVE C, BOUTTIER S, DUPUY B, *et al.* Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on colonization factor expression by moxifloxacin-susceptible and moxifloxacin-resistant *Clostridium difficile* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(12):5155-62.

DEURENBERG RH, BATHOORN E, CHLEBOWICZ MA, *et al.* Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. J Biotechnol. 2017 Feb 10;243:16-24.

DEWINTER LM, LOW DE, PRESCOTT JF. Virulence of *Streptococcus canis* from canine streptococcal toxic shock syndrome and necrotizing fasciitis. Vet Microbiol. 1999; 70(1-2):95-110.

DEWINTER LM, PRESCOTT JF. Relatedness of *Streptococcus canis* from canine streptococcal toxic shock syndrome and necrotizing fasciitis. Can J Vet Res. 1999 Apr;63(2):90-5.

DOERN CD, ROBERTS AL, HONG W, *et al.* Biofilm formation by group A *Streptococcus*: a role for the streptococcal regulator of virulence (Srv) and streptococcal cysteine protease (SpeB). Microbiology. 2009; 155(Pt 1):46-52.

- DONLAN RM & COSTERTON JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 167–93.
- DONLAN RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 881-90
- DRANCOURT M, ROUX V, FOURNIER PE, *et al.* rpoB gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(2):497-504.
- DUARTE RS, BARROS RR, FACKLAM RR, *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics of *Streptococcus porcinus* isolated from human sources. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(9):4592-601.
- DUARTE S, KLEIN MI, AIRES CP, *et al.* Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(3):206-12.
- DUNNE JR WM. Bacterial Adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 2002. 15: 155-66.
- EL-BADAWY MF, TAWAKOL WM, EL-FAR SW, *et al.* Molecular Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Recovered from Egyptian Patients. *Int J Microbiol.* 2017;2017:8050432.
- ERSKINE RJ, BARTLETT PC, JOHNSON GL 2nd *et al.* Intramuscular administration of ceftiofur sodium versus intramammary infusion of penicillin/novobiocin for treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 1996; 208(2):258-60.
- ERSKINE RJ, EBERHART RJ, SCHOLZ RW. Experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in selenium-deficient and selenium-supplemented dairy cows. *Am J Vet Res.* 1990; 51(7):1107-11.
- ESGLEAS M, LACOUTURE S, GOTTSCHALK M. *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Mar 1;244(1):33-40.
- EUZÉBY JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [homepage na internet] Toulouse: Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse; [atualizada em 2012 January 12; acesso 2012 January 20]. Disponível em: [http:// www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)
- EYRE DW, KENKRE JS, BOWLER IC *et al.* *Streptococcus equi* subspecies zooepidemicus meningitis--a case report and review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010 Dec;29(12):1459-63.
- FACKLAM R, BEALL B, EFSTRATIOU A *et al.* emm typing and validation of provisional M types for group A streptococci. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5(2):247-53.
- FACKLAM R, ELLIOTT J, PIGOTT N *et al.* Identification of *Streptococcus porcinus* from human sources. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(2):385-8.

FACKLAM R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(4):613-30.

FACKLAM R & WASHINGTON II, JA, *Streptococcus* and related catalase-negative gram-positive cocci, p. 238-257. In Balows, A; W. Hausler, Jr.; Hermann, KL; Isenberg, HD & Shadomy, HJ. *Manual of clinical microbiology*, American Society for Microbiology.

FAN WT, QIN TT, BI RR *et al.* Performance of the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for rapid identification of streptococci: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 Jun;36(6):1005-1012.

FANG W, ALMEIDA RA, OLIVER SP. Effects of lactoferrin and milk on adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells. *Am J Vet Res.* 2000 ;61(3):275-9.

FISCHETTI VA. M Protein and Other Surface Proteins on Streptococci. 2016 Feb 10. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016.

FITTIPALDI N, SEGURA M, GRENIER D *et al.* Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol.* 2012 Feb;7(2):259-79.

FLEMMING HC. EPS-Then and Now. *Microorganisms.* 2016 Nov 18;4(4).

FLEMMING K, KLINGENBERG C, CAVANAGH JP, *et al.* High in vitro antimicrobial activity of synthetic antimicrobial peptidomimetics against staphylococcal biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(1):136-45

FRANCOLINI I, VUOTTO C, PIOZZI A, *et al.* Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview. *Apmis.* 2017 apr;125(4):392-417.

FULDE M, VALENTIN-WEIGAND P. Epidemiology and pathogenicity of zoonotic streptococci. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;368:49-81.

FULDE, M.; ROHDE, M.; POLOK, A *et al.* Cooperative plasminogen recruitment to the surface of *Streptococcus canis* via m protein and enolase enhances bacterial survival. 2013, *MBio* ,4, oi:10.1128/mBio.00629-12.

GAIARSA S, DE MARCO L, COMANDATORE F *et al.* Bacterial genomic epidemiology, from local outbreak characterization to species-history reconstruction. *Pathog Glob Health.* 2015;109(7):319-27.

GALINIER A, DEUTSCHER J. Sophisticated Regulation of Transcriptional Factors by the Bacterial Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System. *J Mol Biol.* 2017 Mar 24;429(6):773-789

GARDNER AD. Morphological effects of penicillin on bacteria. *Nature.* 1940;146:837-8.

GARRISON, A.T. *et al.* Structure-activity relationships of a diverse class of halogenated phenazines that targets persistent, antibiotic-tolerant bacterial biofilms and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.*, v. 59, n. 8, p 3808-3825, 2016.

GAUDREAU C, SIMONEAU E, LABRECQUE O, *et al.* Epidemiological, biochemical and antimicrobial susceptibility characteristics of *Streptococcus pseudoporcinus* isolated in Quebec, Canada, from 1997 to 2006. *J Med Microbiol.* 2007; 56(Pt 12):1620-4.

GE Y, CAUFIELD PW, FISCH GS, Li Y. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization correlated with caries experience in children. *Caries Res.* 2008; 42(6):444-8.

GERBER M, WALCH C, LOFFLER B *et al.* Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol.* 2008; 57pt (6):776-83.

GHIGO JM. Are there biofilm-specific physiological pathways beyond reasonable doubt? *Res Microbiol.* 2003; 154: 1-8.

GILLEY RP, ORIHUELA CJ. Pneumococci in biofilms are non-invasive: implications on nasopharyngeal colonization. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014 Nov 6;4:163.

GLAUSER S, ASTASOV-FRAUENHOFFER M, MÜLLER JA *et al.* Bacterial colonization of resin composite cements: influence of material composition and surface roughness. *Eur J Oral Sci.* 2017 Jun 15.

GOLLER CC & ROMEO T. Environmental influences in biofilm development. *Curr top Microbiol Immunol.* 2008; 322: 37-66.

GOMES F, SAAVEDRA MJ, HENRIQUES M. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathog Dis.* 2016 Apr;74(3)

GONZÁLEZ JJ, ANDREU A. Sensibilidad a antimicrobianos del estreptococo del grupo B de transmisión vertical. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22(5):286-91.

GÖRKE B, STÜLKE J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol.* 2008

GOYETTE-DESJARDINS G, AUGER JP, XU J, *et al.* *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg Microbes Infect.* 2014 Jun;3(6):e45.

GRINWIS ME, SIBLEY CD, PARKINS MD, *et al.* Characterization of *Streptococcus milleri* group isolates from expectorated sputum of adult patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2010 Feb;48(2):395-401.

GRISSA, I., VERGNAUD, G. & POURCEL, C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35,W52–57 (2007).

GUILHEN C, FORESTIER C, BALESTRINO D. Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. *Mol Microbiol.* 2017 Apr 19.

GÜNTHER J, CZABANSKA A, BAUER I *et al.* *Streptococcus uberis* strains isolated from the bovine mammary gland evade immune recognition by mammary epithelial cells, but not of macrophages. *Vet Res.* 2016 Jan 7;47:13.

HALL-STOODLEY L, HU FZ, GIESEKE A *et al.* Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA.* 2006;296(2):202-11.

HANADA N. Current understanding of the cause of dental caries. *Jpn J Infect Dis.* 2000 Feb;53(1):1-5.

HARANDIAN F, PHAM D, BEN-SHOSHAN M. Positive penicillin allergy testing results: a systematic review and meta-analysis of papers published from 2010 through 2015 *Postgrad Med.* 2016 Aug;128(6):557-62

HARDIE JM, WHILEY RA. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Ap Micro Symp Suplem.* 1997; 83:1S-11S.

HESKETH A, HILL C, MOKHTAR J, *et al.* Genome-wide dynamics of a bacterial response to antibiotics that target the cell envelope. *BMC Genomics.* 2011; 12:226.

HØIBY N, BJARNSHOLT T, GIVSKOV M *et al.* Antibiotic Resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 35: 322-32.

HØIBY N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS.* 2017 Apr;125(4):272-275.

HOLMBERG, A.; RASMUSSEN, M. Mature biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are highly resistant to antibiotics. *Diagn.Microbiol. Infect. Dis.*, v. 84, n. 1, p. 19-21, 2016

ING J, MASON EO, KAPLAN SL *et al.* Characterization of nontypeable and atypical *Streptococcus pneumoniae* pediatric isolates from 1994 to 2010. *J Clin Microbiol.* 2012 Apr;50(4):1326-30.

ISIAKU AI, SABRI MY, INA-SALWANY MY *et al.* Biofilm is associated with chronic streptococcal meningoencephalitis in fish. *Microb Pathog.* 2017 Jan;102:59-68.

JAGGI P. Rheumatic Fever and postgroup-a streptococcal arthritis. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 May;30(5):424-5. doi: 10.1097/INF.0b013e318217ca5a.

JAMES SA, HILAL N, WRIGHT CJ. Atomic force microscopy studies of bioprocess engineering surfaces - imaging, interactions and mechanical properties mediating bacterial adhesion. *Biotechnol J.* 2017 May 10.

JAMES GA, KORBER DR, CALDWELL DE *et al.* Digital image-analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp. *J. Bacteriol.* 1995; 177: 907–15.

- JEDRZEJAS, M. J. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.*, 65, 187-207, 2001.
- JEFFERSON KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Letters*. 2004; 236:163–73.
- JENKINSON HF, LAMONT RJ. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997; 8(2):175-200.
- JIANG S., GAO X., JIN L *et al.* Salivary microbiome diversity in caries-free and caries-affected children. *Int. J. Mol. Sci*. 2016 17:E1978
- JOHANSSON I, WITKOWSKA E, KAVEH B, *et al.* The Microbiome in Populations with a Low and High Prevalence of Caries. *J Dent Res*. 2016 Jan;95(1):80-6.
- JUNG CJ, YEH CY, HSU RB, *et al.* Endocarditis pathogen promotes vegetation formation by inducing intravascular neutrophil extracellular traps through activated platelets. *Circulation*. 2015 Feb 10;131(6):571-81.
- KADIOGLU A; WEISER, JN; PATON, JC *et al.* The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.*, 6, 288-301, 2008.
- KADRY A, TAWFIK A, EL-ASRAR A *et al.* Reduction of mucoid *Staphylococcus epidermidis* adherence to intraocular lenses by selected antimicrobial agents. *Chemotherapy* 1999; 45:56–60.
- KAPLAN JB, JABBOURI S, SADOVSKAYA I. Extracellular DNA-dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Res Microbiol*. 2011; 162(5):535-41.
- KAUR H, KUMAR P, RAY P *et al.* Biofilm formation in clinical isolates of group B streptococci from north India. *Microb Pathog*. 2009; 46(6):321-7.
- KAWAMURA Y, HOU XG, SULTANA F *et al.* Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol*. 1995; 45(2):406-8.
- KEEFE G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2012 Jul;28(2):203-16.
- KEEFE GP. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can. Vet. J*. 1997; 38:429-37
- KERR JR (1999) Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection. *Mol Pathol* 52:220–230
- KIM SK, LEE JH. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol*. 2016 Feb;54(2):71-85.

- KIM W, PARK HK, HWANG WJ *et al.* Simultaneous detection of *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis*, and *S. oralis* by a novel multiplex PCR assay targeting the *gyrB* gene. *J Clin Microbiol.* 2013 Mar; 51(3):835-40.
- KLEIN MI, HWANG G, SANTOS PH *et al.* *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015 Feb 13; 5:10.
- KÖHLER W. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int J Med Microbiol.* 2007; 297(3):133-50.
- KOLENBRANDER PE, ANDERSEN RN, BLEHERT DS *et al.* Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66(3):486-505.
- KOLENBRANDER PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. Annu Rev Microbiol.* 2000; 54:413-37.
- KONTO-GHIORGHI Y, MAIREY E, MALLET A *et al.* Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog.* 2009; 5(5):e1000422.
- KRZYMIŃSKA S, SZCZUKA E, DUDZIŃSKA K *et al.* Virulence and the presence of aminoglycoside resistance genes of *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from clinical specimens. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2015 Apr; 107(4):857-68
- KRZYŚCIAK W, PAPIEŻ M, JURCZAK A *et al.* Relationship between Pyruvate Kinase Activity and Cariogenic Biofilm Formation in *Streptococcus mutans* Biotypes in Caries Patients. *Front Microbiol.* 2017 May 16; 8:856
- KURAMITSU HK. Virulence properties of oral bacteria: impact of molecular biology. *Curr Issues Mol Biol.* 2001; 3(2):35-6.
- LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5
- LAL D, VERMA M, LAL R. Exploring internal features of 16S rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus *Streptococcus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2011; 10:28.
- LAM MM, CLARRIDGE JE 3RD, YOUNG EJ *et al.* The other group G *Streptococcus*: increased detection of *Streptococcus canis* ulcer infections in dog owners. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(7):2327-9.
- LAMM CG, FERGUSON AC, LEHENBAUER TW *et al.* Streptococcal infection in dogs: a retrospective study of 393 cases. *Vet Pathol.* 2010; 47(3):387-95.
- LANCEFIELD RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 1933; 57:571-95.

- LANDINNI P, ANTONIANI D, BURGESS JG *et al.* Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 86: 813-826.
- LANGILLE, M. G. & BRINKMAN, F. S. IslandViewer: an integrated interface for computational identification and visualization of genomic islands. *Bioinformatics* 25, 664–665 (2009).
- LAPPIN-SCOTT HM & BASS C. Biofilm formation: Attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. *Am J Infect Control.* 2001; 29: 250-1.
- LASCH P. *et al.* Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. *J Microbiol Methods*; v. 100, p. 58-69, 2014.
- LEIGH JA. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet J.* 1999; 157(3):225-38.
- LEMBKE C, PODBIELSKI A, HIDALGO-GRASS C *et al.* Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. 2006 *Appl Environ Microbiol* 72, 2864–2875.
- LEME AF, KOO H, BELLATO CM, *et al.* The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res.* 2006;85(10):878-87.
- LEMOIS JA, ABRANCHES J, BURNE RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol.* 2005;7(1):95-107.
- LEWIS K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 999–1007.
- LIANG X, CHEN YY, RUIZ T *et al.* New cell surface protein involved in biofilm formation by *Streptococcus parasanguinis*. *Infect Immun.* 2011; 79(8):3239-48.
- LIZCANO A, CHIN T, SAUER K *et al.* Early biofilm formation on microtiter plates is not correlated with the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog.* 2010; 48(3-4):124-30.
- LORA-TAMAYO J, SENNEVILLE É, RIBERA A, *et al.* The Not-So-Good Prognosis of Streptococcal Periprosthetic Joint Infection Managed by Implant Retention: The Results of a Large Multicenter Study. *Clin Infect Dis.* 2017 Jun 15;64(12):1742-1752.
- LORIAN V. Medical relevance of low concentrations of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31 Suppl D: 137-48.
- LU C, ZHENG Y, ZHONG Q. Corrosion of dental alloys in artificial saliva with *Streptococcus mutans*. *PLoS One.* 2017 Mar 28;12(3):e0174440.
- LUKOMSKI S, BACHERT BA, SQUEGLIA F *et al.* Collagen-like proteins of pathogenic streptococci. *Mol Microbiol.* 2017 Mar;103(6):919-930.

- LYNSKEY NN, LAWRENSEN RA, SRISKANDAN S. New understandings in *Streptococcus pyogenes*. *Curr Opin Infect Dis*. 2011 Jun;24(3):196-202.
- MADDOCKS SE, WRIGHT CJ, NOBBS AH, *et al*. *Streptococcus pyogenes* antigen I/II-family polypeptide AspA shows differential ligand-binding properties and mediates biofilm formation. *2011 Mol Microbiol* 81, 1034–1049.
- MADSEN JS, LIN YC, SQUYRES GR, *et al*. Facultative control of matrix production optimizes competitive fitness in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilm models. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Dec;81(24):8414-26.
- MAJUMDAR S, MONDAL S. Conversation game: talking bacteria. *J Cell Commun Signal*. 2016 Dec;10(4):331-335.
- MANETTI AG, KÖLLER T, BECHERELLI M *et al*. Environmental acidification drives *S. pyogenes* pilus expression and microcolony formation on epithelial cells in a FCT-dependent manner. *PLoS One*. 2010; 5(11):e13864
- MANI RJ, THACHIL AJ, RAMACHANDRAN A. Discrimination of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus* using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Vet Diagn Invest*. 2017 Apr 1:1040638717702687. doi: 10.1177/1040638717702687.
- MARSHALL KC. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *Features*. 1992; 58: 202-7.
- MARTIN C, FERMEAUX V, EYRAUD JL *et al*. *Streptococcus porcinus* as a cause of spontaneous preterm human stillbirth. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(9):4396-8.
- MARTIN WJ, STEER AC, SMEESTERS PR, *et al*. Post-infectious group A streptococcal autoimmune syndromes and the heart. *Autoimmun Rev*. 2015 Aug;14(8):710-25.
- MASTERS, JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2 (4): 315–319.
- MATSUI R, CVITKOVITCH D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol*. 2010; 5(3):403-17.
- MCARTHUR JD, COOK SM, VENTURINI C *et al*. The role of streptokinase as a virulence determinant of *Streptococcus pyogenes*--potential for therapeutic targeting. *Curr Drug Targets*. 2012 Mar;13(3):297-307.
- MCDOUGALD D, RICE SA, BARRAUD N, *et al*. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 10(1):39-50.
- MCDOUGALL S, PARKINSON TJ, LEYLAND M, *et al*. Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cows' milk. *J Dairy Sci*. 2004; 87(7):2062-72.

MCMILLAN DJ, DAVIES MR, GOOD MF *et al.* Immune response to superoxide dismutase in group A streptococcal infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004; 40(3):249-56.

MCMILLAN DJ, DRÈZE PA, VU T *et al.* Updated model of group A *Streptococcus* M proteins based on a comprehensive worldwide study. *Clin Microbiol Infect.* 2013 May;19(5):E222-9.

METZGAR D, ZAMPOLLI A. The M protein of group A *Streptococcus* is a key virulence factor and a clinically relevant strain identification marker. *Virulence.* 2011 Sep-Oct;2(5):402-12.

MICHIE S, MILES J, WEINMAN J. Patient-centredness in chronic illness: what is it and does it matter? *Patient Educ Couns.* 2003; 51(3):197-206

MITCHELL, M. *et al.* Enhancing MALDI Time-Of-Flight Mass Spectrometer Performance through Spectrum Averaging. *PLoS ONE*; v. 10, n. 3, p. e0120932, 2015.

MOHAMED, J.A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.*,v. 56, p. 1581-1588, 2007

MOLIVA MV, CERIOLI F, REINOSO EB. Evaluation of environmental and nutritional factors and sua gene on in vitro biofilm formation of *Streptococcus uberis* isolates. *Microb Pathog.* 2017 Jun;107:144-148

MONZÓN M, OTEIZA C, LEIVA J, *et al.* Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 44(4):319-24.

MORICONI M, ACKE E, PETRELLI D, *et al.* Multiplex PCR-based identification of *Streptococcus canis*, *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus dysgalactiae* subspecies from dogs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2017 Feb;50:48-53

MOSCOSO M, GARCÍA E, LÓPEZ R. Pneumococcal biofilms. *Int Microbiol.* 2009; 12(2):77-85.

MOSER C, PEDERSEN HT, LERCHE CJ, *et al.* Biofilms and host response - helpful or harmful. *APMIS.* 2017 Apr;125(4):320-338.

MÜHLEMANN K, GRAF S, TÄUBER MG. *Streptococcus bovis* clone causing two episodes of endocarditis 8 years apart. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(3):862-3

MURRAY PR Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. 2010 *Clin Microbiol Infect.* Nov;16(11):1626-30

MURRAY PR. What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2012 Sep;14(5):419-23.

MURRAY, PR. What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on

molecular pathology. *J. Mol. Diagn.* 14: 419-423, 2012.

NADELL CD, XAVIER JB, FOSTER KR. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33: 206–224.

NAGASAWA R, SATO T, SENPUKU H. Raffinose induces biofilm formation by *Streptococcus mutans* in low concentrations of sucrose by increasing production of extracellular DNA and fructan. *Appl Environ Microbiol.* 2017

NAKAGAWA C; KASAHARA K; YONEKAWA S; *et al.* Purulent pericarditis due to *Streptococcus pneumoniae* diagnosed by pneumococcal urinary antigen assay and 16S rDNA sequence of the pericardial fluid. *Intern Med.*, 49, 1653-1656, 2010.

NAN C, DANGOR Z, CUTLAND CL, *et al.* Maternal group B *Streptococcus*-related stillbirth: a systematic review. *BJOG.* 2015 Oct;122(11):1437-45.

NELSON DC, GARBE J, COLLIN M. Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes* - a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. *Biol Chem.* 2011 Dec;392(12):1077-88.

NOBBS AH, LAMONT RJ, JENKINSON HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009; 73(3):407-50.

O'TOOLE G, KAPLAN HB, KOLTER R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54; 49–79.

ODENHOLT I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int J Antimicrob Agents.* 2001; 17(18):1.

OGUNNIYI AD; GRABOWICZ M; BRILES DE; *et al.* Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 75, 350 – 357, 2007.

OLIVEIRA, L.; MADUREIRA P; ANDRADE EB; *et al.* Group B *streptococcus* gapdh is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages. 2012 PLoS ONE, 7, e29963

OLIVER-KOZUP H, MARTIN KH, SCHWEGLER-BERRY D, *et al.* The group A streptococcal collagen-like protein-1, Scl1, mediates biofilm formation by targeting the extra domain A-containing variant of cellular fibronectin expressed in wounded tissue. 2013 *Mol Microbiol* 87, 672–689.

OLSEN RJ, MUSSER JM. Molecular pathogenesis of necrotizing fasciitis. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:1-31. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102135

PARKER RE, LAUT C, GADDY JA *et al.* Association between genotypic diversity and biofilm production in group B *Streptococcus*. *BMC Microbiol.* 2016 May 20;16:86

PARKER RE, LAUT C, GADDY JA, *et al.* Association between genotypic diversity and biofilm production in group B *Streptococcus*. *BMC Microbiol.* 2016 May 20;16:86.

PELTROCHE-LLACSAHUANGA H, FRYE B, HAASE G. Isolation of *Streptococcus urinalis* from a human blood culture. J Med Microbiol. No prelo 2012.

PEREIRA N, POWELL AM, NYIRJESY P *et al.* Vagino-rectal *Streptococcus porcinus* in pregnancy: an emerging pathogen? J Low Genit Tract Dis. 2013 Oct;17(4):e18-21

PÉREZ-DORADO, L.; GALAN-BARTUAL, S. & HERMOSO, J. A. Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. Mol. Oral Microbiol., 27, 221-245, 2012.

PÉREZ-SANCHO M, VELA AI, GARCÍA-SECO T, *et al.* Usefulness of MALDI-TOF MS as a Diagnostic Tool for the Identification of Streptococcus Species Recovered from Clinical Specimens of Pigs. PLoS One. 2017 Jan 26;12(1):e0170784.

PEROVIC O, CREWE-BROWN HH, KHOOSAL M *et al.* Invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999 May;18(5):362-4.

PETERSEN FC, TAO L, SCHEIE AA. DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. J Bacteriol. 2005; 187(13):4392-400.

PETROVA OE, SAUER K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. Curr Opin Microbiol. 2016 Apr;30:67-78.

PETTIT RK, WEBER CA, KEAN MJ *et al.* Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(7):2612-7.

PHILIPSON EH, PALERMINO DA, ROBINSON A. Enhanced antenatal detection of group B streptococcus colonization. Obstet Gynecol. 1995; 85(3):437-9.

PILLAI SK, SAKOULAS G, ELIOPOULOS GM *et al.* Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. J Infect Dis. 2004; 190(5):967-70.

PINHO MD, EROL E, RIBEIRO-GONÇALVES B *et al.* Beta-hemolytic Streptococcus dysgalactiae strains isolated from horses are a genetically distinct population within the Streptococcus dysgalactiae taxon. SciRep. 2016 Aug 17;6:31736.

PINTO TC, COSTA NS, CASTRO LF, *et al.* Potential of MALDI-TOF MS as an alternative approach for capsular typing Streptococcus pneumoniae isolates. Sci Rep. 2017 Mar 28;7:45572.

PIRES RH, CATALDI TR, FRANCESCHINI LM *et al.* Metabolic profiles of planktonic and biofilm cells of *Candida orthopsilosis*. Future Microbiol. 2016 Oct;11:1299-1313.

POLONIO RE, MERMEL LA, PAQUETTE GE *et al.* Eradication of biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) by a combination of sodium salicylate and vancomycin. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(11):3262-6.

POTRYKUS K, CASHEL M. (p)ppGpp: still magical? Annu Rev Microbiol. 2008; 62:35-51.

- POYART C, QUESNE G, COULON S *et al.* Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(1):41-7.
- POYART C, QUESNE G, TRIEU-CUOT P. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. coli' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype 11.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52(Pt 4):1247-55.
- PRINCIPI N, MARCHISIO P, ROSAZZA C *et al.* Acute otitis media with spontaneous tympanic membrane perforation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 Jan;36(1):11-18.
- RAMAGE G, VANDE WALLE K, WICKES BL *et al* JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(9):2475-9.
- RANI SA, PITTS B, BEYENAL H *et al.*. Spatial Patterns of DNA Replication, Protein Synthesis, and Oxygen Concentration within Bacterial Biofilms Reveal Diverse Physiological States. *J Bacteriol.* 2007; 189: 4223-33.
- RAUPACH B, MECSAS J, HECZKO U *et al.* Bacterial epithelial cell cross talk. 1999 *Curr Top Microbiol* 236:137–161.
- REPP KK, MENOR SA, PETTIT RK. Microplate Alamar blue assay for susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Med Mycol.* 2007;45(7):603-7.
- RICKARD AH, GILBERT P, HIGH NJ, *et al.* Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 2003; 11(2):94-100.
- RINAUDO CD, ROSINI R, GALEOTTI CL *et al.* Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B *Streptococcus*. *PLoS One.* 2010; 5(2):e9216.
- ROMERO-LASTRA P, SÁNCHEZ MC, RIBEIRO-VIDAL H, *et al.* Comparative gene expression analysis of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 in planktonic and biofilms states. *PLoS One.* 2017 Apr 3;12(4):e0174669.
- RURANGIRWA FR, TEITZEL CA, CUI J *et al.* *Streptococcus didelphis* sp. nov., a streptococcus with marked catalase activity isolated from opossums (*Didelphis virginiana*) with suppurative dermatitis and liver fibrosis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000; 50 Pt 2:759-65.
- SÁNCHEZ-SALCEDO S, GARCÍA A, VALLET-REGÍ M. Prevention of bacterial adhesion to zwitterionic biocompatible mesoporous glasses. *Acta Biomater.* 2017 May 5.
- SAWYER, L. K. & HERMANOWICZ, S. W. Detachment of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas aeruginosa* due to variations in nutrient supply. *Water Sci. Technol.* 2000 41, 139–145.

SCHADOW KH, SIMPSON WA, CHRISTENSEN GD. Characteristics of adherence to plastic tissue culture plates of coagulase-negative staphylococci exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *J Infect Dis.* 1988; 157(1):71-7.

SCHAEFFER CR, HOANG TN, SUDBECK CM *et al.* Versatility of Biofilm Matrix Molecules in *Staphylococcus epidermidis* Clinical Isolates and Importance of Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression during High Shear Stress. *mSphere.* 2016 Oct 5;1(5).

SCHLEIFER KH, KILPPER-BÄLZ. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1984; 34(1):31-4.

SCHLEIFER KH, KRAUS J, DVORAK C *et al.* Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst Appl Microbiol.* 1985; 6:183-95.

SCHÖNBORN S, WENTE N, PADUCH JH *et al.* In vitro ability of mastitis causing pathogens to form biofilms. *J Dairy Res.* 2017 May;84(2):198-201.

SEGURA M, CALZAS C, GRENIER D *et al.* Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses. *FEBS Lett.* 2016 Nov;590(21):3772-3799.

SEGURA M, FITTIPALDI N, CALZAS C *et al.* Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical? *Trends Microbiol.* 2017 Jul;25(7):585-599.

SENADHEERA D, CVITKOVITCH DG. Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 631:178-88.

SESHASAYEE AS, BERTONE P, FRASER GM *et al.* Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9(5):511-9.

SHOME BR, BHUVANA M, MITRA SD *et al.* Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* isolates from bovine milk. *Trop Anim Health Prod.* 2012 Dec;44(8):1981-92.

SILVERMAN RJ, NOBBS AH, VICKERMAN MM *et al.* Interaction of *Candida albicans* cell wall Als3 protein with *Streptococcus gordonii* SspB adhesin promotes development of mixed-species communities. *Infect Immun.* 2010; 78(11):4644-52.

SINGH R, RAY P, DAS A *et al.* Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(9):1955-58.

SINGH S, SINGH SK, CHOWDHURY I *et al.* Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol J.* 2017 Apr 28;11:53-62

SKOFF TH, FARLEY MM, PETIT S *et al.* Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *Clin Infect Dis.* 2009 1;49(1):85-92.

- SMITH CA, TOTH M, WEISS TM *et al.* Structure of the bifunctional aminoglycoside-resistance enzyme AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia revealed by crystallographic and small-angle X-ray scattering analysis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2014 Oct;70(Pt 10):2754-64.
- SPELLERBERG B, BRANDT C. Laboratory Diagnosis of *Streptococcus pyogenes* (group A streptococci). 2016 Feb 10. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016.
- SPORMANN AM. Physiology of Microbes in Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008. 322: 17-36.
- SPRINGMAN AC, LACHER DW, WAYMIRE EA *et al.* Pilus distribution among lineages of group b streptococcus: an evolutionary and clinical perspective. *BMC Microbiol.* 2014 Jun 19;14:159.
- STEER AC, DANCHIN MH, CARAPETIS JR. Group A streptococcal infections in children. *J Paediatr Child Health.* 2007; 43(4):203-13.
- STEER AC, LAMAGNI T, CURTIS N *et al.* Invasive group a streptococcal disease: epidemiology, pathogenesis and management. *Drugs.* 2012 Jun 18;72(9):1213-27.
- STEINBERG D, PORAN S, SHAPIRA L. The effect of extracellular polysaccharides from *Streptococcus mutans* on the bactericidal activity of human neutrophils. *Arch Oral Biol.* 1999; 44(5):437-44.
- STEINBERGER RE, ALLEN AR, HANSA HG *et al.* Elongation correlates with nutrient deprivation in *Pseudomonas aeruginosa*-unsaturated biofilms. *Microb Ecol.* 2002 May;43(4):416-23.
- STEWART PS, COSTERTON JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001 Jul 14;358(9276):135-8.
- STEWART PS, FRANKLIN MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6: 199-210.
- STONER KA, RABE LK, AUSTIN MN *et al.* Incidence and epidemiology of *Streptococcus pseudoporcinus* in the genital tract. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(3):883-6. Epub 2010.
- STOODLEY P, CARGO R, RUPP CJ *et al.* Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2002; 29(6):361-7.
- SUTCLIFFE J, TAIT-KAMRADT A, WONDRACK L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(8):1817-24
- SYKES JE. Pediatric feline upper respiratory disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2014 Mar;44(2):331-42.

- TAMILSELVAM B, ALMEIDA RA, DUNLAP JR *et al.* *Streptococcus uberis* internalizes and persists in bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog.* 2006; 40(6):279-85.
- TAMILSELVAM B, ALMEIDA RA, DUNLAP JR *et al.* *Streptococcus uberis* internalizes and persists in bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog.* 2006 Jun;40(6):279-85.
- TAMURA K, DUDLEY J, NEI M *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007;24(8):1596-9.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011 Oct;28(10):2731-9.
- TAMURA, K. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731–2739 (2011).
- TAPIAINEN T, KUJALA T, KAIJALAINEN T *et al.* Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* isolates from pediatric patients. *APMIS.* 2010; 118(4):255-60.
- TEIXEIRA, LM, CARVALHO, MGS.; MOREY, RE.; *et al.* 2005. Application of a polyphasic approach to reassess the taxonomic relationships and the identification of species belonging to the “*Streptococcus bovis* / *Streptococcus equinus*” complex. Abstracts of the 105th General Meeting of the American Society for Microbiology. Atlanta, p.203.
- TEIXEIRA, LM, FACKLAM, RR, STEIGERWALT, AG *et al.* Correlation between phenotypic characteristics and DNA relatedness within *Enterococcus faecium* strains. 1995 *J. Clin. Microbiol.* 33: 1520-1523
- TELGEMANN U, HORN H, MORGENROTH E. Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. *Water Res.* 2004; 38(17): 3671-84.
- TENDOLKAR PM, BAGHDAYAN AS, GILMORE MS *et al.* Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 2004 Oct;72(10):6032-9.
- THENMOZHI R, BALAJI K, KUMAR R *et al.* Characterization of biofilms in different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. 2011 *J Basic Microbiol* 51, 196–204.
- THOMPSON T, FACKLAM R. Cross-reactions of reagents from streptococcal grouping kits with *Streptococcus porcinus*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(7):1885-6.
- TIMONEY JF. The pathogenic equine streptococci. *Vet Res.* 2004 Jul-Aug;35(4):397-409.
- TITGEMEYER F, HILLEN W. Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2002; 82(1-4):59-71.
- TOH-BOYO GM, WULFF SS, BASILE F. Comparison of sample preparation methods and evaluation of intra- and intersample reproducibility in bacteria MALDI-MS profiling. *Anal Chem.* 2012 Nov 20;84(22):9971-80.

- TOMÉ FM, PAULA RAMOS L, FREIRE F *et al.* Influence of sucrose on growth and sensitivity of *Candida albicans* alone and in combination with *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy. 2017 Lasers Med Sci.
- TRAPPETTI C, MCALLISTER LJ, CHEN A, *et al.* Autoinducer 2 Signaling via the Phosphotransferase FruA Drives Galactose Utilization by *Streptococcus pneumoniae*, Resulting in Hypervirulence. MBio. 2017 Jan 24;8(1). pii: e02269-16.
- TRAPPETTI C, OGUNNIYI AD, OGGIONI MR *et al.* Extracellular matrix formation enhances the ability of *Streptococcus pneumoniae* to cause invasive disease. PLoS One. 2011; 6(5):e19844.
- URISH, K.L. *et al.* Antibiotic-tolerant *Staphylococcus aureus* biofilm persists on arthroplasty materials. *Clin.Orthop.Relat.Res.*, v.474, n. 7, p. 1649-1656, 2016.
- VARHIMO E, VARMANEN P, FALLARERO A *et al.*. Alpha- and β -casein components of host milk induce biofilm formation in the mastitis bacterium *Streptococcus uberis*. Vet Microbiol. 2011; 149(3-4):381-9.
- VELA AI, PEREZ M, ZAMORA L *et al.* *Streptococcus porci* sp. nov., isolated from swine sources. Int J Syst Evol Microbiol. 2010; 60(Pt 1):104-8.
- VELA AI, SÁNCHEZ V, MENTABERRE G *et al.* *Streptococcus porcorum* sp. nov., isolated from domestic and wild pigs. Int J Syst Evol Microbiol. 2011; 61(Pt 7):1585-9.
- VILAIN S, PRETORIUS JM, THERON J *et al.* DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. Appl Environ Microbiol. 2009; 75(9):2861-8.
- VORNHAGEN J, ADAMS WALDORF KM *et al.* Perinatal Group B Streptococcal Infections: Virulence Factors, Immunity, and Prevention Strategies. Trends Microbiol. 2017 Jun 17. pii: S0966-842X(17)30127-0.
- WALSH, R.L. & CAMILLI, A. *Streptococcus pneumoniae* is desiccation tolerant and infectious upon rehydration. 2011 MBio. 2, e00092-11
- WANG Y, ZHANG W, WU Z *et al.* Functional analysis of luxS in *Streptococcus suis* reveals a key role in biofilm formation and virulence. Vet Microbiol. 2011; 152(1-2):151-60.
- WASHINGTON JA. The effects and significance of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. Rev Infect Dis. 1979; 1(5):781-786.
- WATNICK P, KOLTER R. Biofilm, city of microbes. J Bacteriol. 2000; 182(10):2675-9.
- WEINSTEIN MR, LITT M, KERTESZ DA *et al.*. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. S. iniae Study Group. N Engl J Med. 1997; 337(9):589-94.
- WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER DA *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol. 1991; 173(2):697-703

- WEISER, J. N. The pneumococcus: why a commensal misbehaves. *J. Mol. Med.*, 88, 97-102, 2010.
- WHALEY DN, DOWELL JR, WANDERLINDER, LM *et al.* Gelatin agar medium for detecting gelatinase production by anaerobic bacteria. *J Clin. Microbiol.*, 1982, 16:224-229
- WHITCHURCH CB, TOLKER-NIELSEN T, RAGAS PC *et al.* Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002; 295(5559):1487
- WHITWORTH JM. Lancefield group F and related streptococci. *J Med Microbiol*. 1990; 33(3):135-51.
- WILKENING RV, FEDERLE MJ. Evolutionary Constraints Shaping *Streptococcus pyogenes*-Host Interactions. *Trends Microbiol*. 2017 Jul;25(7):562-572.
- WILLENBORG J, FULDE M, DE GREEFF A *et al.*. Role of glucose and CcpA in capsule expression and virulence of *Streptococcus suis*. *Microbiology*. 2011; 157(Pt 6):1823-33.
- WILLIAMS P, WINZER K, CHAN WC *et al.* Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007 Jul 29;362(1483):1119-34.
- WINZER K, HARDIE KR, WILLIAMS P. LuxS and autoinducer-2: their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. *Advances in applied microbiology*. 2003;53:291–396
- WOJEWODA C. Pathology consultation on matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for microbiology. 2013 *Am J Clin Pathol* 140:143–148.
- YU Y, ZHANG Q, DENG Z. Parallel pathways in the biosynthesis of aminoglycoside antibiotics. *F1000Res*. 2017 May 18;6. pii: F1000 Faculty Rev-723
- ZHOU, Y., LIANG, Y., LYNCH, K.H., DENNIS, J.J. and WISHART, D.S. 2011 PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.*, 39, W347–W352.