

# Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

Jéssica da Conceição Mendonça

Interação de *Streptococcus agalactiae* com modelo murino de diabetes induzida: formação de biofilme, expressão de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias

> Rio de Janeiro 2022

Jéssica da Conceição Mendonça

# Interação de *Streptococcus agalactiae* com modelo murino de diabetes induzida: formação de biofilme, expressão de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira

Rio de Janeiro 2022

## CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M539	Mendonça, Jéssica da Conceição. Interação de <i>Streptococcus agalactiae</i> com modelo murino de diabetes induzida: formação de biofilme, expressão de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias / Jéssica da Conceição Mendonça 2022. 177f.
	Orientadora: Prof.ª Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira
	Doutorado (Tese) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências. 1. Streptococcus agalactiae – Teses, 2. Endocardite – Teses.
	3.Citocinas - Teses. 4. Sistemas de secreção tipo VII. I. Ferreira, Prescilla Emy Nagao. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.
	CDU 575.111:579

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Jéssica da Conceição Mendonça

# Interação de *Streptococcus agalactiae* com modelo murino de diabetes induzida: formação de biofilme, expressão de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de maio de 2022.

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira (Orientadora) Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Prof<sup>a</sup>. Dra. Tatiana de Castro Abreu Pinto Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. João Alfredo de Moraes Gomes da Silva Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. André Luiz Mencalha Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

### AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a minha maior fonte de força e energia para alcançar qualquer objetivo. Mesmo com tantas falhas, Ele não me abandona e me auxiliou em cada etapa da elaboração desse trabalho;

Aos meus pais, Helena e Walter, que investem em mim e em minha educação desde o meu nascimento. Meus pais são meus maiores incentivadores, e por muitas vezes fizeram sacrifícios para que eu pudesse realizar meus sonhos, como a obtenção desse título;

Ao meu marido Wendell, por me apoiar e estar ao meu lado nas grandes decisões tomadas em minha vida. Superamos um relacionamento à distancia durante meu doutorado sanduíche, estresse por noites mal dormidas em decorrência dos estudos, e em todos os momentos ele sempre demonstrou muita paciência e amor, além de muito incentivo;

A minha orientadora, Dra. Prescilla Nagao, que nos últimos oito anos tem sido mais do que uma professora pra mim. Através dela ouvi palavras de incentivo, realizei sonhos, recebi conselhos e muitos ensinamentos importantes não só para a minha carreira, como para minha vida pessoal. Agradeço por sua confiança em meu trabalho e em meu potencial;

Aos membros da banca e a revisora, que prontamente aceitaram o convite e disponibilizaram seu tempo para contribuir com esse trabalho. Dra. Patrícia, Dra. Tatiana, Dr. André, Dr. João, Dra. Verônica e Dra. Gabriela, muito obrigada a todos vocês;

A Dra. Kelly Doran e seu grupo de pesquisa (Dra. Rebecca, Dra. Brady, Dra. Lindsey, Dr. Ricardo, Dra. Norhan, Haider e Laurie), além do Dr. Alex Horswill e os membros do laboratório dele. Durante meu período de doutorado sanduíche, além de ser muito bem recebida por eles, tive todo o suporte necessário num ano tão difícil com o início da pandemia. Nos tornamos amigos, com relações que foram além do ambiente de trabalho. Agradeço por tudo que aprendi com cada um deles nesse período;

Aos colaboradores desse trabalho, que se disponibilizaram a me ensinar novas técnicas, a utilizar equipamentos e materiais que não tínhamos em nosso laboratório, e a analisar dados que eu não estava familiarizada; Aos membros do LBMFE (Dra. Gabriela, Dra. Pamella, Dayane, Bruna, João, Noemi, Melissa, Eduarda, Julyana) que se tornaram uma segunda família durante meus oito anos no laboratório. Todo o aprendizado compartilhado, nossos momentos de celebração, e até as broncas serão sempre lembrados com muito carinho por mim;

A alguns membros do laboratório em destaque: A Dayane, que além de companheira de trabalho e amiga pessoal, é minha madrinha de casamento e uma das pessoas mais importantes em minha vida. Obrigada por nunca soltar a minha mão; ao João e a Noemi, que desde a entrada no laboratório trabalham diretamente comigo e me proporcionaram muitos momentos divertidos e de desenvolvimento importante para a minha carreira. Nossa amizade também expandiu as paredes do laboratório e tive o privilégio de ter o João como meu padrinho de casamento também; A Pamella, que apoia meu crescimento científico desde o primeiro dia no laboratório. Com ela aprendi muito profissionalmente, mas também sobre a vida e a verdadeira amizade; e a Priscila Miranda, que infelizmente não estará presente em minha defesa, mas que foi uma grande amiga e me ensinou muito sobre dedicação, amor ao trabalho, família, entre outros pontos muito importantes. Priscila, esse trabalho também é mérito seu. Um dia ao nos reencontrarmos será um prazer te agradecer por tudo que você significou pra mim nessa vida;

Por fim, gostaria de agradecer a todos os amigos que direta ou indiretamente contribuíram para que essa etapa fosse realizada. Sou grata pela vida de todos.

## RESUMO

MENDONÇA, Jéssica da Conceição. Interação de Streptococcus agalactiae com modelo murino de diabetes induzida: formação de biofilme, expressão de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias. 2022. 177p. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2022.

Streptococcus agalactiae, também conhecido como Estreptococos do Grupo B (EGB), são patógenos reconhecidos como causadores de infecções invasivas severas em mulheres grávidas e neonatos. Nos últimos anos, o número de adultos imunocomprometidos e idosos apresentando comorbidades causadas por S. agalactiae têm aumentado significativamente, tornando uma grande preocupação na clínica médica, especialmente em pacientes diabéticos. Indivíduos diabéticos apresentam maior susceptibilidade às infecções bacterianas e consequentemente ao desenvolvimento de doenças associadas como pneumonia e problemas cardiovasculares. De acordo com a literatura, existe uma correlação entre o S. agalactiae, diabetes e doenças pulmonares/cardíacas que ainda não foram bem elucidadas. Além de sua capacidade de aderir e invadir células hospedeiras causando distúrbios, alguns microrganismos Gram-positivos apresentam um sistema de secreção em resposta ao microambiente celular, sendo capazes de produzir maior virulência e evasão do sistema imune. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi compreender a ação de amostras hipervirulentas de S. agalactiae em resposta à infecção em modelo murino de diabetes induzida, o desencadeamento de doenças como sepse, pneumonia e endocardite, bem como a ação inflamatória do hospedeiro e a possível presença de um sistema de secreção atuando como potencializador da virulência em S. agalactiae. Neste trabalho, foram utilizados guatro modelos distintos de infecção, envolvendo camundongos CD-1 e C57BI/6 e inoculados com diferentes amostras virulentas de S. agalactiae. Os tecidos obtidos foram submetidos à produção de lâminas histológicas, confirmando o potencial de lesão tecidual do S. agalactiae, além de contagem de unidades formadoras de colônias superior em diferentes órgãos nos animais diabéticos e quantificação da expressão de espécies reativas de oxigênio significativamente maior em animais diabéticos infectados. Além disso, marcadores celulares de células imunes foram analisados por citometria de fluxo e gPCR, demonstrando um elevado número de macrófagos. Citocinas próinflamatórias como IL-1ß e proteína KC foram quantificadas e indicaram um ambiente hiper inflamado nos pulmões e corações desses animais. Após a construção da mutante para essC, foram realizadas interações em modelo murino que comprovaram a redução no potencial virulento guando o gene responsável pela ativação do sistema de secreção tipo 7 foi inativado. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que amostras hipervirulentas de S. agalactiae foram capazes de disseminar, desenvolver manifestações severas em múltiplos órgãos e promover um microambiente pró-inflamatório mais exacerbado em animais diabéticos infectados, potencializando a fragilidade e toxicidade celular já causada pela presença da diabetes. Além disso, a confirmação da presença do gene essC corroborou a atividade desse sistema de secreção como uma vantagem para evadir do sistema imune e sobreviver no hospedeiro por longos períodos de tempo.

Palavras-chave: Streptococcus agalactiae. Diabetes. Sepse. Endocardite. SST7.

## ABSTRACT

MENDONÇA, Jéssica da Conceição. *Streptococcus agalactiae interaction with a diabetic induced murine model: biofilm formation, reactive oxygen species expression and proinflammatory citokyne release.* 2022. 177p Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2022.

Streptococcus agalactiae, also known as Group B Streptococcus (GBS), is a pathogen recognized as one of the main causes of severe infections in pregnant women and neonates. In the past few years, the number of immunocompromised adults and elderly presenting diseases caused by S. agalactiae significantly increased, and this became a huge concern to immunosuppressive patients, especially with diabetes. Diabetic individuals present higher susceptibility to bacterial infections and consequently to the development of associated diseases such as pneumonia and cardiovascular problems. According to the literature, there is a correlation between S. agalactiae, diabetes and lung/heart diseases that is still not very elucidated. In addition to the ability to adhere and invade host cells, some Grampositive microorganisms present a secretion system in response to the cellular microenvironment, being able to evade the immune system and become more virulent. Therefore, the aim of this study was to understand the action of hypervirulent S. agalactiae strains in a murine model of induced diabetes, how they develop diseases such as sepsis, pneumonia and endocarditis, the inflammatory response of the host and the presence of a secretion system acting as a virulence mecanism in S. agalactiae strains. In this study, four different infection routes were performed, involving CD-1 and C57BI/6 mice inoculated with different virulent strains of S. agalactiae. Murine tissues were used to produce histological slides, confirming the potential of tissue damage after S. agalactie infection; in addition to a higher number of colony-forming units in different diabetic animals and quantification of the reactive oxygen species expression that was also significantly higher in diabetic infected animals. Cellular markers of immune cells were also analyzed by flow cytometry and RT-gPCR, showing a high number of macrophages in diabetic infected animals. Proinflammatory cytokines such as IL-1ß and KC protein were quantified and indicated a hyper-inflamed environment in lungs and hearts of diabetic infected animals. After the construction of the essC mutant, we performed tail vain and vaginal inoculations in murine models that showed the reduction in virulent potential when the gene responsible for activating the type 7 secretion system was deleted. Thus, the results obtained in this work demonstrated that hypervirulent S. agalactiae strains were able to disseminate, develop severe manifestations in multiple organs and promote an exacerbated pro-inflammatory microenvironment in infected diabetic animals, enhancing the cellular fragility and toxicity caused by diabetes. Furthermore, confirmation of the presence of essC gene showed that the activity of this secretion system is an advantage to evade the immune system and survive in the host for long periods of time.

Keywords: Streptococcus agalactiae. Diabetes. Sepsis. Endocarditis. SST7.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estágios da formação de biofilme	21
Figura 2 -	Organização genética do sistema de secreção tipo 7 (SST7) em	05
Eisense O	diferentes microrganismos	25
Figura 3 -	Modelo de Infecção murina Intranasal com amostra de S.	45
Figura 4 -	Modelo de infecção murina intraperitoneal com amostras de S.	10
i igui a i	agalactiae	46
Figura 5 -	Modelo de infecção murina vaginal com amostras de S. agalactiae	47
Figura 6 -	Modelo de infecção murina caudal com amostras de S.	
	agalactiae	48
Figura 7 -	Biofilme das amostras de <i>S. agalactiae</i> COH1, GBS90356 e D01 em	
	24h e diferentes condições do meio	61
Figura 8 -	Glicemia dos animais induzidos à diabetes por	
	estreptozotocina	63
Figura 9 -	Peso corporal dos animais ao final do experimento	63
Figura 10 -	Percentual de sobrevivência dos animais inoculados com amostras	
	hipervirulentas GBS90356 e COH1	64
Figura 11 -	Contagem de unidades formadoras de colônia de órgãos-alvo em	
	animais diabéticos ou não diabéticos infectados com amostra	
	GBS90356	65
Figura 12 -	Contagem de unidades formadoras de colônias nos órgãos-alvo em	
	animais diabéticos ou não diabéticos infectados com a amostra	
	GBS90356	66
Figura 13 -	Contagem de unidades formadoras de colônias nos órgãos-alvo em	
	animais diabéticos ou não diabéticos infectados com a amostra	
	COH1	67
Figura 14 -	Persistência bacteriana e contagem de unidades formadoras de colônia	
	em animais infectados com as amostras NCTC 10/84 e NCTC	
	10/84∆essC	68

Figura 15 -	Persistência bacteriana e contagem de unidades formadoras de colônia	
	Ill∆essC	69
Figura 16 -	Contagem de unidades formadoras de colônia dos órgãos-alvo em animais infectados via caudal com as amostras CJBIII ou CJBIII <i>ΔessC</i>	70
Figura 17 -	Interação in vivo em modelo animal diabético com amostra de <i>S. agalactiae</i> GBS90356	71
Figura 18 -	Ensaio de interação da amostra GBS90356 com macrófagos obtidos do lavado bronqueoalveolar de animais controle	72
Figura 19 -	Perfil de expressão das citocinas pró-inflamatórias KC/CXCL-1 e IL-1β no coração e pulmão dos animais diabéticos e não diabéticos infectados com a amostra COH1	73
Figura 20 -	Perfil de expressão das citocinas pró-inflamatórias KC/CXCL-1 e IL-1β no coração e pulmão dos animais diabéticos e não diabéticos infectados com a amostra GBS90356	74
Figura 21 -	Perfil de expressão da citocina pró-inflamatória IL-17 em animais CD-1 infectados com as amostras CJBIII e CJBIII∆ <i>essC</i>	75
Figura 22 -	Perfil de expressão da citocina pró-inflamatória IL-23 em animais CD-1 infectados com as amostras CJBIII e CJBIII∆essC	76
Figura 23 -	Perfil de expressão da citocina pró-inflamatória IL-17 em animais CD-1 infectados com as amostras NCTC 10/84 e NCTC 10/84∆ <i>essC</i>	77
Figura 24 -	Perfil de expressão das citocinas pró-inflamatórias KC/CXCL-1 e IL-1β em animais CD-1 infectados com as amostras CJBIII e CJBIIIΔ <i>essC</i>	78
Figura 25 -	Produção de espécies reativas de oxigênio nos animais diabéticos e não diabéticos infectados com amostra hipervirulenta de <i>S. agalactiae</i>	79
Figura 26 -	Presença de macrófagos no pulmão de animais diabéticos ou não diabéticos infectados com as amostras de <i>S. agalactiae</i> GBS90356 e COH1	80

Figura 27 -	Marcadores de células imunes encontrados nos animais diabéticos ou	
	não diabéticos infectados com a amostra de S. agalactiae	
	GBS90356	81
Figura 28 -	Marcadores de células imunes encontradas nos animais diabéticos ou	
	não diabéticos infectados com a amostra de S. agalactiae COH1	82
Figura 29 -	Lâminas histológicas cardíacas e lesões teciduais causadas por	
	amostra de S. agalactiae GBS90356 coradas com hematoxilina e	
	eosina	83
Figura 30 -	Lâminas histológicas cardíacas e lesões teciduais causadas por	
	amostra de <i>S. agalactiae</i> GBS90356 coradas com Giemsa	84
Figura 31 -	Lâminas histológicas cerebrais e espessamento da meninge causada	
	pela amostra de <i>S. agalactiae</i> CJBIII coradas com HE	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Lista das amostras de S. agalactiae utilizadas e suas respectivas	
	informações epidemiológicas	38
Tabela 2 -	Lista de primers utilizados para a reação de RT-qPCR	56
Tabela 3 -	Alteração do pH dos meios após 24h em placas de biofilme	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β-H/C	β-hemolisina/citolisina
BHI	Brain Heart Infusion Medium (Meio de infusão cérebro-coração)
С	Controle
CAMP	Técnica para confirmação laboratorial do EGB (sigla correspondente às
	iniciais Christie, Atkins e Miunch – Peterson)
CC17	complexo clonal 17
CDC	Center for Disease Control and Prevention (Centro de Controle e
	Prevenção de Doenças)
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CPS	Capsula polissacarídica
DI	Diabético infectado
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNI	Diabético não infectado
DO	densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGB	Estreptococos do Grupo B
EOGBS	early-onset Group B Streptococcus (Início precoce da infecção por
Estrepto	cocos do Grupo B)
EUA	Estados Unidos da América
EPS	substâncias poliméricas extracelulares
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESX	Early Secretory Antigen Target 6 System
FDA	Food and Drug Administration (Administração de Comida e Drogas)
HE	hematoxilina e eosina
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
IAP	Profilaxia de antibiótico intraparto
IP	Intraperitoneal
LBMFE	Laboratório de Biologia Molecular e Fisiologia de Estreptococos
LVB	Laboratório de Vacinas Bacterianas

- LOGBS *late-onset Group B Streptococcus* (Início tardio da infecção por Estreptococos do Grupo B)
- MIC Concentração Mínima Inibitória
- NDI Não diabético infectado
- PBS Phosphate buffer solution; solução de tampão fosfato
- PBP proteína de ligação à penicilina
- PCR *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)
- PML polimorfonucleares
- PN pós-natal
- ROS *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigênio)
- RT-qPCR Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction
- SST7 Sistema de secreção tipo 7
- ST-17 sequência tipo 17
- THA Todd Hewitt agar
- THB Todd Hewitt broth
- TSB Tryptic Soy Broth
- UDO unidades de densidade ótica
- UFC/mL unidades formadoras de colônia por mililitro
- WHO World's Health Organization (Organização Mundial de Saúde)
- WT wild type

# SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	36
2	METODOLOGIA	38
2.1	Amostras bacterianas	38
2.2	Comitê de ética	39
2.3	Identificação do tipo capsular e detecção dos genes da sequência	
	tipo 17 da amostra D01	39
2.4	Ensaios de biofilme	40
2.5	Animais	41
2.6	Grupos de estudo	42
2.6.1	Grupos de estudo para a realização dos experimentos em modelo murino	
	<u>de diabetes induzida</u>	42
2.6.2	Grupos de estudo para a realização dos experimentos visando a	
	<u>caracterização do SST7 em <i>S. agalactiae</i></u>	43
2.7	Indução da diabetes mellitus	43
2.8	Aferição da glicemia	44
2.9	Modelo de infecção intranasal com a amostra de S. agalactiae	
	GBS90356	44
2.10	Modelo de infecção intraperitoneal (IP) com as amostras de S.	
	agalactiae GBS90356 e COH1	45
2.11	Modelo de infecção vaginal com as amostras de S. agalactiae NCTC	
	10/84, NCTC 10/84∆essC, CJBIII e CJBIII∆essC	46
2.12	Modelo de infecção caudal com as amostras de S. agalactiae CJBIII	
	e CJBIII∆essC	48
2.13	Eutanásia dos animais	49
2.13.1	Eutanásia dos animais submetidos ao modelo de infecção intranasal	49
2.13.2	Eutanásia dos animais submetidos ao modelo de infecção intraperitoneal,	
	vaginal e caudal	50
2.14	Obtenção do lavado bronqueoalveolar	51

2.15	Ensaio de interação com macrófagos obtidos do lavado	
	bronqueoalveolar de animais infectados com amostra GBS90356 e	
	controle	51
2.16	Análise do perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias por	
	ELISA	52
2.17	Dosagem de espécies reativas de oxigênio (EROs)	53
2.18	Obtenção de células imunes pulmonares por dissociação enzimática	54
2.19	Análise do perfil de células imunes pulmonares por citometria de	
	fluxo	54
2.20	Obtenção das células imunes cardíacas e extração de RNA	55
2.21	Síntese de cDNA	55
2.22	Análise do perfil de células imunes cardíacas por RT-qPCR	56
2.23	Histologia do coração	56
2.24	Histologia do cérebro	57
2.25	Coloração de Hematoxilina e Eosina no coração	57
2.26	Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) no cérebro	58
2.27	Coloração de Giemsa	58
2.28	Análise estatística	59
3	RESULTADOS	60
4	DISCUSSÃO	86
	CONCLUSÃO	101
	REFERÊNCIAS	103
	ANEXO A - Artigo científico públicado durante o doutorado: A type VII	
	secretion system in Group B Streptococcus mediates	
	cytotoxicity and virulence	120
	ANEXO B - Artigo científico públicado durante o doutorado: Identification	
	of Zinc-Dependent Mechanisms Used by Group B	
	Streptococcus To Overcome Calprotectin-Mediated	
	Stress	145
	ANEXO C - Artigo científico públicado durante o doutorado: Identification	
	of a novel cationic glycolipid in Streptococcus agalactiae that	
	contributes to brain entry and meningitis	163

## INTRODUÇÂO

#### Características gerais

Streptococcus agalactiae, também conhecidos como Estreptococos do grupo B (EGB), são cocos patogênicos pertencentes à família *Streptococcaceae* e caracterizados como cocos Gram-positivos, beta-hemolíticos, anaeróbicos facultativos, catalase e oxidase negativos, hipurato e CAMP positivos. Possuem o antígeno do grupo B de Lancefield e são classificados em dez tipos capsulares (Ia, Ib, II-IX) de acordo com o polissacarídeo capsular específico, constituído por unidades repetidas de ramnose, galactose e N-acetilglicosamina (Lancefield, 1933; Kogan et al., 1996; Slotved et al., 2007).

Na década de 1930, *S. agalactiae* foi identificado por Rebecca Lancefield, após o isolamento em leite e em bovinos com mastite (Lancefield, 1933). Posteriormente, esse microrganismo foi descrito no trato vaginal de mulheres assintomáticas, porém a patogenicidade foi mencionada apenas em 1938 em infecção pós-parto fatal (Lancefield & Hare, 1935; Fry, 1938; Raabe & Shane, 2019; Navarro-Torné et al., 2021). Contudo, somente a partir da década de 70 esse patógeno passou a ser reconhecido como pertencente à microbiota anfibiôntica dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital de indivíduos saudáveis (Levent et al., 2010; Dutra et al., 2014; Raabe & Shane, 2019). Adicionalmente, o patógeno pode ser causa predominante de infecções invasivas em neonatos, sendo considerado um dos principais agentes causadores de sepse, meningite e pneumonia em recém-nascidos, atingindo 3 casos a cada 1.000 nascimentos (Glaser et al., 2002).

Em crianças, a infecção invasiva causada por *S. agalactiae* é classificada em doença de início precoce ("early-onset Group B *Streptococcus*", EOGBS) e doença de início tardio ("late-onset Group B *Streptococcus*", LOGBS), sendo a primeira apresentada em recém nascidos com até 6 dias de vida, e a segunda a partir da primeira semana até o terceiro mês de vida (Verani et al., 2010; Edmond et al., 2012). Aproximadamente 90% dos casos da doença precoce acontecem nas primeiras 24h de vida do neonato, enquanto a doença tardia ocorre mais frequentemente entre a quarta e quinta semanas de vida (Lamagni, 2013). A incidência de EOGBS no Reino

Unido é estimada em 0,4 a cada 1.000 nascimentos (Lamagni, 2013). Mundialmente a incidência da infecção causada por *S. agalactiae* é de 3/1000 nascimentos (Verani et al., 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, *S. agalactiae* é responsável por cerca de 150.000 mortes de recém-nascidos no âmbito global, apesar da profilaxia de antibiótico intraparto (IAP) ser efetiva (WHO, 2017). Alguns fatores de risco são associados à colonização por *S. agalactiae* em regiões urogenitais, tais como bacteriúria durante a gravidez, e histórico de colonização prévia pelo mesmo micro-organismo durante uma gravidez anterior (Colicchia et al. 2015, Pérez-Moreno et al., 2017). Em neonatos, a incidência da doença de início precoce diminuiu consideravelmente após o estabelecimento da profilaxia intraparto (Moltó-García et al., 2016; Chiu, 2019).

*S. agalactiae* é também responsável por elevada taxa de mortalidade e morbidade em adultos não-grávidos, particularmente em idosos e adultos com doenças subjacentes (Schuchat, 1997; Farley, 2001). Cerca de 1 a cada 20 adultos não-grávidos com infecções causadas por *S. agalactiae* são levados a óbito. A taxa de doenças invasivas é de aproximadamente 25 casos a cada 100.000 adultos com mais de 65 anos e a incidência de doenças letais causadas por esse patógeno em idosos pode chegar a mais de 50% (CDC, 2016; Navarro-Torné et al., 2021). O número de casos fatais em adultos com idade mais avançada é estimado em 15% dos pacientes nos EUA (Farley, 2001; Edwards, Baker, 2005).

Nos Estados Unidos, a incidência da doença em adultos não-grávidos tem aumentado significativamente nas últimas décadas, com um salto de 3,6 casos/100.000 pessoas em 1990 para 7,3 casos/100.000 pessoas em 2007 (Skoff et al., 2009). A maior taxa de mortalidade e casos de doenças causadas pelo *S. agalactiae* tem sido observada em pessoas negras em comparação a caucasianos. Contudo, não existem evidências científicas que expliquem a razão dessa diferença (Farley et al., 1993; Phares et al, 2008).

O risco é ainda mais alto em idosos, especialmente residentes de casa de repouso. Nos EUA, a infecção invasiva por *S. agalactiae* em adultos é capaz de levar à óbito 90% dos pacientes infectados (Verani et al., 2010). Um parâmetro similar tem sido visto no Reino Unido nas últimas duas décadas (Lamagni et al., 2013). De acordo com a revisão bibliográfica realizada por Navarro-Torné e colaboradores em 2021, infecções causadas por *S. agalactiae* são mais frequentes em adultos do que em

neonatos, com crescimento considerável de cerca de 19,40 casos/100.000 adultos com mais de 50 anos. Esse problema despertou o interesse de autoridades de saúde, e a partir de 1996, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) publicou um relatório de normas e recomendações, sob a perspectiva da saúde pública para prevenção perinatal de doenças causadas por *S. agalatiae* com apoio da *American College of Obstetricans and Gynecologygists*, *American Academy of Pediatrics* e outras agências.

São encontrados casos de doenças invasivas causadas por *S. agalactiae* em adultos saudáveis; contudo, a maioria dos casos ocorrem em pacientes com doenças adjacentes (Farley et al., 1993; Schuchat, 1997; Farley, 2001). A diabetes mellitus é a comorbidade mais comum, presente em 20%-25% dos casos de adultos não grávidos colonizados por *S. agalactiae*. Outras condições podem incluir cirrose, histórico de acidente vascular cerebral, obesidade, câncer de mama, úlceras e bexiga neurogênica (Jackson et al., 1995; Parks, Barrett, Jones, 2015). O aumento do número de casos de doenças causadas por *S. agalactiae* pode estar relacionado ao aumento da vida média da população adulta que tem apresentado maior expectativa de vida, mesmo apresentando comorbidades significantes (Farley, 2001). A utilização de dispositivos médicos invasivos como cateteres intravenosos ou urinários podem ser uma outra razão para o acometimento de infecções bacterianas na população idosa (Kothari et al, 2009).

Manifestações clinicas de adultos com infecções causadas por *S. agalactiae* são variadas e incluem infecções na pele, tecido mole e trato urinário, bacteremia, pneumonia, urosepse, peritonite, empiema, artrite e endocardite (Rajagopal, 2009; Navarro-Torné et al., 2021). A sepse é a síndrome clínica mais séria reportada em adultos e está associada a elevadas taxas de mortalidade; assim como a meningite, uma doença que pode ocorrer em consequência da infecção bacteriana generalizada (27-34%) (Salloum et al., 2011).

O tratamento indicado para infecções causadas pelo *S. agalactiae* continua sendo com antibióticos, sendo a penicilina e a ampicilina os de primeira escolha (Motallebirad et al., 2021). Em casos mais graves recomenda-se a utilização de um aminoglicosídeo, geralmente a gentamicina. Clindamicina e eritromicina são antibióticos também recomendados em casos de pacientes alérgicos à penicilina (CDC, 2010; Lopardo et al., 2003; Villar, Jugo, 2013).

Recentemente a resistência de amostras de *S. agalactiae* aos antibióticos como penicilina, clindamicina e eritromicina representa uma preocupação significante no tratamento das infecções (Dahesh et al., 2008; Kimura et al., 2008; Moltó-García et al., 2016). A redução da susceptibilidade à penicilina, detectada em isolados no Japão, aparenta ser secundária à expressão reduzida da proteína de ligação à penicilina (PBP) 2X (Kimura et al., 2013; Seki et al., 2015). Em amostras analisadas no Irã, cerca de 41,6% das amostras isoladas de mulheres grávidas e não grávidas adultas foram consideradas resistentes à eritromicina, conferindo preocupação com as opções disponíveis de antibióticos de segunda escolha (Motallebirad et al., 2021). Sutcliffe e colaboradores (1996) demonstraram que os genes *erm*B, *erm*TR e *metfA*/E estão envolvidos na resistência aos macrolídeos. Essa resistência reforça a necessidade do desenvolvimento de uma vacina universal, protegendo recém-nascidos, mulheres grávidas, pessoas com condições subjacentes e idosos do desenvolvimento de infecções graves causadas pelo *S. agalactiae* (Navarro-Torné et al, 2021).

#### Distribuição dos tipos capsulares

A distribuição dos tipos capsulares em amostras de *S. agalactiae* responsáveis por infecções invasivas neonatais e em adultos vem sendo modificada nas últimas décadas. O potencial invasivo dos diferentes tipos capsulares e sua distribuição variam de acordo com a idade e a região geográfica (Shabayek & Spellerberg, 2018; Navarro-Torné et al., 2021). A dominância do tipo capsular III nas infecções neonatais precoces ou tardias foi substituída por um padrão mais balanceado entre os tipos capsulares la (35%-40%), III (30%) e V (15%-20%) (Edwards, Baker, 2005; Farley, 2001).

Bergal e colaboradores (2015) demonstraram que o *S. agalactiae* tipo V é predominante na França, assim como no Kuwait (Boswihi, Udo, Al-Sweih, 2012) e Japão (Ueno et al., 2012). O tipo IV tem sido frequente nos Emirados Árabes (Aitmhand et al., 2000). Os tipos I, III e V são os mais encontrados nas infecções causadas por *S. agalactiae* em neonatos e adultos, no âmbito mundial (Ippolito et al., 2010; Martins et al., 2011; Abat et al., 2014). Contudo, estudos visando caracterizar a distribuição dos diferentes tipos capsulares de *S. agalactiae* têm demonstrado

variação nesse perfil com o passar dos anos e de acordo com a região geográfica analisada (Gherardi et al., 2007).

Na América do Norte, o tipo capsular V tem sido predominante, enquanto na América do Sul são poucos os relatos apontando a presença desse tipo capsular específico (Navarro-Torné et al., 2021). Entre adultos não-grávidos nos Estados Unidos, o tipo capsular mais comum causador de doenças invasivas segue sendo o tipo V (29% entre 2005-2006), seguido pelos tipos Ia, II e III (Skoff et al., 2009). No Canadá, amostras associadas a doenças invasivas causadas pelo *S. agalactiae* entre 2003-2013 demostrou um perfil distinto com o tipo capsular III como mais frequente (20%), seguido pelos tipos V (19%), Ia (13%), Ib (13%) e II (11%) (Alhhazmi, Hurteau, Tyrrell, 2016).

No Brasil, a ocorrência dos tipos capsulares Ia, Ib, II, III, IV e V tem sido descrita em isolados de várias regiões do país (Dutra et al., 2014, Pimentel et al., 2016). Cerca de 68,2% dos isolados brasileiros são provenientes do trato vaginal de mulheres grávidas. Em Curitiba, o tipo IV foi identificado em 13,1% das amostras coletadas de infecções invasivas graves, enquanto os tipos Ib (34,9%) e la (25,6%) foram predominantes em grávidas infectadas pelo vírus HIV e em pacientes com câncer (Palmeiro et al., 2010; Souza et al., 2013; Dutra et al., 2014). Estudo realizado por nosso grupo demonstrou que amostras coletadas de pacientes com câncer no Instituto Nacional do Câncer (INCA) pertenciam ao tipo capsular la (43,6%), seguido dos tipos V (23,6%), II (14.6%), III (11%), IV (3.6%), VI (1.8%), e VII (1.8%) (Sanches et al., 2021).

Torna-se importante ressaltar que ainda não existem estudos que correlacionem a prevalência do tipo capsular de *S. agalactiae* em pacientes diabéticos, onde o levantamento epidemiológico é primordial para o desenvolvimento de vacinas que protejam também esse grupo alvo.

### Fatores de virulência e formação de biofilme

A colonização e infecção por *S. agalactiae* em tecidos-alvo requer a capacidade dessa bactéria de aderir e persistir nas superfícies epiteliais da mucosa. Nesse habitat, a formação de comunidades semelhantes a biofilmes pode facilitar a

sobrevivência e proliferação microbiana, aumentando a resistência às defesas do hospedeiro e à privação de nutrientes (Rosini, Margarit, 2015).

As condições do microambiente são conhecidas por influenciar fortemente a capacidade de formação de biofilme por muitas espécies bacterianas (Froeliger e Fives-Taylor, 2001; Moscoso et al., 2006; Manetti et al., 2007). Os biofilmes representam fatores de virulência bem conhecidos por realizarem um papel vital em infecções persistentes e crônicas. No hospedeiro, as bactérias são frequentemente protegidas da ação do sistema imune através da construção de colônias sésseis embebidas em uma matriz extracelular constituída por exopolissacarídeos ou carboidratos, proteínas e ácidos nucléicos (Konto-Ghiorghi et al., 2009). A composição química da matriz extracelular do biofilme é heterogênica e complexa (Wimpenney et al., 1993; Shabayek and Spellerberg, 2018).

O primeiro passo na formação do biofilme é a adesão das bactérias planctônicas, ou seja, de vida livre à uma superfície que ocorre de forma aleatória, como demonstrado na Figura 1. Esta primeira adesão é reversível, sendo mantida por interações físico-químicas não específicas que constituem o alicerce para o crescimento do biofilme. A segunda fase da adesão consiste na transição do estágio reversível para o irreversível. As bactérias passam a secretar substâncias que serão responsáveis pela manutenção da adesão e da camada que envolve o biofilme. Nesta fase há o início da formação de micro colônias e do desenvolvimento da arquitetura do biofilme maduro. Os biofilmes maduros apresentam estrutura semelhante a cogumelos que são envoltos por diversas moléculas, denominadas substâncias poliméricas extracelulares (EPS), constituídas por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos que promovem estabilidade e capacidade de aderência à superfície; e rodeados por poros e canais de água que funcionam como um sistema de troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos que precisam ser secretados para fora do biofilme (Abee et al., 2011). A última fase da formação do biofilme ocorre quando o ambiente não é mais favorável à sua manutenção e consiste no descolamento do biofilme maduro em forma de agregados celulares ou células planctônicas. Após o desprendimento, as bactérias livres podem colonizar novos ambientes, reiniciando a formação de novos biofilmes.

#### Figura 1 – Estágios da formação de biofilme



Legenda: Processo de formação de biofilme bacteriano. Fonte: Adaptado de Maunders et al., 2017

Os biofilmes permitem a persistência bacteriana a longo prazo e protegem as bactérias do reconhecimento pelo sistema imunológico. Para o *S. agalactiae*, o baixo pH e a presença de plasma aparecem como fatores ambientais cruciais por meio do controle da expressão de estruturas associadas à superfície bacteriana, como pili e a cápsula polissacarídica, ambas envolvidas na promoção da formação de biofilme bacteriano (Bjarnsholt et al., 2018; Miranda et al., 2018).

A capsula polissacarídica (CPS) é um dos mais importantes fatores de virulência presentes no *S. agalactiae* e um possível alvo para a elaboração de uma vacina multivalente efetiva (Johri et al., 2006). Todos os isolados clínicos de *S. agalactiae* expressam uma cápsula polissacarídica; dez tipos capsulares diferentes foram identificados até a presente data (Kogan et al., 1996). Desde os primeiros estudos em *S. agalactiae*, a cápsula tem despertado muito interesse, pois anticorpos anticapsulares conferem imunidade protetora e porque a tipagem capsular é epidemiologicamente importante (Edwards e Baker, 2001).

Polissacarídeos capsulares distintos que fundamentam o sistema de tipagem, permitem a evasão imune, uma vez que as modificações de ácido siálico ligadas a  $\alpha 2 \rightarrow 3$  usam mimetismo molecular com epítopos de açúcar do hospedeiro. A ligação direta à lectinas semelhantes a imunoglobulinas (Siglecs) em leucócitos promove a

inibição da ativação do complemento C3 na superfície bacteriana (Pezzicoli et al., 2012; Chang et al., 2014).

A translocação de *S. agalactiae* através da barreira epitelial é facilitada ainda mais pelo fator de virulência  $\beta$ -hemolisina/citolisina ( $\beta$ -H/C) (Doran et al., 2002; Doran, Liu, Nizet, 2003).  $\beta$ -H/C induz a citólise em células eucarióticas e promove a invasão bacteriana através das barreiras epiteliais e endoteliais, incluindo a barreira hematoencefálica. Em camundongos,  $\beta$ -H/C induziu inflamação placentária e parto prematuro, independentemente da ascensão bacteriana (Doran et al., 2002). Amostras de *S. agalactiae* deficientes em  $\beta$ -H/C demonstraram apresentar virulência prejudicada em vários modelos *in vivo*, incluindo pneumonia, sepse e meningite (Doran et al., 2002; Hensler et al., 2005). Dessa forma, os níveis de expressão de  $\beta$ -H/C parecem determinar se *s. agalactiae* estabiliza seu nicho para permitir a colonização ou se torna invasivo. Além disso, a toxina formadora de poros e o fator CAMP podem contribuir para a patogênese de *S. agalactiae* sob certas circunstâncias (Lang, Palmer, 2003), mas é dispensável para virulência sistêmica (Hensler et al., 2008).

Um dos principais responsáveis por uma grande proporção das infecções neonatais invasivas são as amostras CC17 (complexo clonal 17) pertencentes ao tipo capsular III. As amostras sequência tipo 17 (ST-17), codificadas pelo gene *hvga*, ganharam interesse especial devido à sua forte associação com a meningite neonatal. As amostras pertencentes ao ST-17 são relatadas como hipervirulentas, representando mais de 80% das infecções neonatais de início tardio por *S. agalactiae* e estão frequentemente, mas não exclusivamente, associadas à meningite (Jones et al., 2003; Lamy et al., 2006; Manning et al., 2009; Tazi et al., 2010; Bellais et al., 2012; Florindo et al., 2014).

A análise filogenética comparativa de isolados humanos e bovinos revelou que as amostras pertencentes ao CC17 pertencem a um grupo homogêneo com origem recente e recombinação limitada em comparação com outros complexos clonais (Sørensen et al., 2010; da Cunha et al., 2014). Além disso, a análise evolutiva entre isolados de *S. agalactiae* de origem humana e bovina demonstrou que a ST-17 é a única linhagem humana agrupada dentro da população bovina (Bisharat et al., 2004).

Nas manifestações clínicas, o gene *hvga* medeia tanto a colonização quanto a invasão no intestino, conferindo tropismo meníngeo em camundongos neonatos (Banks et al, 2003; Baker et al., 2004). Curiosamente, as amostras de *S. agalactiae* 

isoladas de sangue e do fluido cerebroespinal durante a doença invasiva expressaram níveis mais elevados de *hvg*a em comparação ao *S. agalactiae* cultivado *in vitro*, indicando aumento da expressão de *hvga* durante a infecção.

### Sistema de Secreção tipo 7 (SST7)

Diferentes espécies bacterianas dependem de estruturas macromoleculares altamente especializadas embutidas em seus envelopes celulares para injetar proteínas efetoras em células eucarióticas, procarióticas, ou para liberá-las no ambiente extracelular (Rivera-Calzada et al., 2021). Bactérias no geral utilizam sistemas de secreção como moduladores celulares no hospedeiro como um mecanismo de defesa contra a morte interbacteriana, para adquirir nutrientes, trocar material genético e promover virulência no hospedeiro (Spencer et al., 2021).

Na literatura são descritos nove sistemas de secreção distintos (I ao IX) que apresentam diferentes mecanismos de ação e estrutura (Costa et al., 2015; Rapisarda et al., 2018). Dependendo da arquitetura do sistema de secreção, os substratos são transferidos em um processo de etapa única, diretamente do citosol bacteriano para seu alvo ou em um mecanismo de duas etapas, onde substratos são primeiro transferidos para o periplasma, seguidos por uma segunda etapa de transferência através da membrana externa, utilizando nanomáquinas especializadas (Rivera-Calzada et al., 2021).

Vários sistemas de secreção podem coexistir no mesmo microrganismo e sua presença muitas vezes se correlaciona com patogenicidade, o que os torna importantes candidatos para novas abordagens terapêuticas (Abby et al., 2016). Os sistemas de secreção podem ser organizados como clusters de genes ou operons em genomas ou plasmídeos. A organização genética muitas vezes revela a origem dessas nanomáquinas e como a natureza atribuiu novas funções para maquinarias ancestrais. Como exemplos temos o sistema de secreção tipo III que constitui o núcleo da maquinaria de motilidade flagelar e o sistema de secreção tipo VI que contém um aparelho de injeção tipo fago (Erhardt, Namba, Hughes, 2010; Ho, Dong, Mekalanos, 2014).

O primeiro sistema de secreção descrito foi o tipo VII (SST7), descoberto durante o estudo do patógeno *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente causador

da tuberculose (Paulson, 2013). A tuberculose é a doença infecciosa que mais mata pessoas ao longo da história e ainda é uma das principais dez causas de morte no mundo (Rivera-Calzada et al., 2021). O primeiro substrato tipo VII identificado foi o alvo antigênico secretado de 6 kDa denominado ESAT-6 (EsxA). Esta pequena proteína que não apresenta uma sequência de sinal N-terminal clássica, demonstrou atuar como um antígeno imunodominante de células-T (Sorensen et al. 1995).

*M. tuberculosis* possui cinco sistemas de secreção ESX/Tipo VII parálogos descritos até o momento (ESX, do inglês Early Secretory Antigen Target 6 System). Três desses sistemas, ESX-1, ESX-3 e ESX-5, medeiam a secreção de conjuntos específicos de proteínas efetoras que desempenham papéis definidos na tuberculose (Groschel et al., 2016; Famelis et al., 2019). O sistema de secreção de ESX-3 é expresso em resposta a condições limitantes de ferro e tem sido implicado na homeostase de metais, inibição da ativação de células T-helper (CD4+), maturação do fagossomo e reparo de danos fagossômicos induzidos pelo patógeno (Siegrist et al., 2009; Mehra et al., 2013; Tinaztepe et al., 2016). Os sistemas de secreção ESX apresentam um conjunto de cinco componentes conservados na membrana central (EccB, EccC, EccD, EccE, MycP; Ecc, componente conservado esx) que medeiam a secreção da família de fatores de virulência EsxA:EsxB, atuando como substratos clássicos do tipo VII (Abdallah et al., 2006; van Winden et al., 2016; Gray et al., 2016). Essa membrana é descrita como um polímero de três unidades de monômeros, onde cada dímero compreende uma cópia de MycP e dois protômeros, cada um com uma cópia de EccB, EccC, EccE e duas cópias de EccD.

Estudos bioquímicos e estruturais nos sistemas de secreção de ESX-5 demonstraram que quatro desses componentes (EccB, EccC, EccD, EccE) se agrupam em um poro de secreção hexamérico estável no envelope celular, enquanto MycP, uma protease ancorada na membrana, não está fortemente associada com o núcleo estável (Houben et al., 2016; Beckham et al., 2017). A proteína de acoplamento EccC reconhece proteínas efetoras no citoplasma e energiza seu transporte (Rosenberg et al., 2015).

O sistema de secreção T7 não é específico para micobactérias patogênicas. Eles também estão presentes em micobactérias não patogênicas em outros gêneros bacterianos que possuem sistemas homólogos como *Rhodococcus*, *Corynebacterium* e *Nocardia* (Figura 2) (Ates, Houben, Bitter, 2015).



## Figura 2 – Organização genética do sistema de secreção tipo 7 (SST7) em diferentes microrganismos

Legenda: Loci genético do sistema de secreção tipo VII em Mycobacterium tuberculosis (Mtb), demonstrando os clusters ESX-1 e ESX-4 em comparação com o loci tipo VII equivalente em *Streptomyces coelicolor, Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Fonte: Bottai et al., 2017.

A organização gênica mais simples, em comparação com o loci ESX micobacteriano, foi encontrada em *clusters* de genes que codificam sistemas de secreção tipo VII em *Firmicutes* (SST7b). O locus Ess de *S. aureus* consiste em 11 genes associados ao sistema VII (Burts et al., 2005; Anderson et al., 2013), que incluem os genes *esxA*, *esxB* e *essC*, responsáveis por codificar proteínas WXG-100 (as variantes de *S. aureus* EsxA e EsxB) e uma ATPase semelhante a FtsK/SpoIIIE ancorada na membrana (EssC).

O locus Ess também contém genes que codificam as proteínas EssA, EssB e EssD, necessárias para a secreção dos substratos Ess, bem como genes *esaC/esxC* e *esaD/esxD*, que codificam pequenas proteínas que foram recentemente identificadas como substratos Ess específicos de estafilococos (Burts et al. 2008;

Anderson et al. 2011, 2013, Chen et al. 2012). Finalmente, *esaB* codifica um regulador negativo da atividade de secreção de Ess (Burts et al. 2008).

Várias observações indicam que Ess desempenha um papel importante na virulência de *S. aureus*. Burts e colaboradores (2005) demonstraram que a secreção de *EsxA* e *EsxB* são necessários para a replicação de *S. aureus* em órgãos e tecidos de camundongos infectados. Além disso, a atividade de secreção de Ess também foi necessária para o estabelecimento de abscessos estafilocócicos, conferindo capacidade de persistir e evadir a resposta imune do hospedeiro (Burts et al. 2005, 2008; Anderson et al. 2011). A inativação da via Ess pela alteração de componentes-chave da maquinaria de secreção de Ess (EssC), bem como a deleção de *esxA* e *esxB*, promoveu uma redução significativa na capacidade de *S. aureus* de estabelecer abscessos renais ou hepáticos em modelo murino de disseminação hematogênica e formação de abscessos (Burts et al., 2008; Anderson et al., 2011).

Outros substratos de Ess, como a proteína EsaC, embora sejam dispensáveis para o estabelecimento de infecções agudas, demonstraram ser necessários para a formação de infecção persistente em modelos animais (Burts et al. 2008). Além disso, recentemente demonstrou-se que o sistema de secreção Ess foi necessário para colonização nasal e virulência em modelo murino de pneumonia pulmonar por *S. aureus* (Kneuper et al. 2014).

Apesar da variação na sequência de EssC e repertórios efetores putativos entre amostras e espécies bacterianas, análises genômicas indicam que o *loci* SST7b codifica componentes relativamente conservados (incluindo o terminal N de EssC), bem como homólogos da proteína EsxA WXG100 (Burts et al., 2005; Warne et al., 2016; Spencer et al., 2021). Um número crescente de publicações tem mostrado um papel para o SST7b e/ou EsxA na patogênese de várias bactérias Gram-positivas (Garufi, Butler, Missiakas, 2008; Chatterjee et al., 2021). No entanto, o SST7b ainda não foi caracterizado no importante patógeno *S. agalactiae*.

No geral, são escassos os trabalhos que apontem a presença desse sistema de secreção, ou de homólogos, no gênero *Streptococcus*. Até a presente data, somente cinco trabalhos foram publicados e estão disponíveis em plataformas de pesquisa como o PubMed. Por ser comprovadamente importante e presente em outras espécies bacterianas, incluindo recentemente outros Gram-positivos, torna-se importante identificar e caracterizar a presença desse sistema em *S. agalactiae*.

### Sepse e dispersão bacteriana em diferentes órgãos-alvo

O Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock define sepse como uma disfunção no órgão que traz risco de morte causada pela resposta desregulada do hospedeiro em decorrência de uma infecção (Singer et al., 2016), estando associada a >10% da mortalidade hospitalar. O choque séptico é definido como uma sepse associada a anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas (Frydrych et al., 2017).

Sepse é uma síndrome causada por infecções bacterianas e a resposta inflamatória sistêmica, podendo levar à injuria tecidual, choque séptico e óbito (Levy et al., 2003). Nos EUA, cerca de 750.000 pessoas são admitidas em hospitais apresentando sepse e dessas 200.000 vão à óbito. Os gastos com essa doença também são exorbitantes, cerca de 16,7 bilhões de dólares são utilizados anualmente (Angus et al., 2001; Wang et al., 2003; Coopersmith et al., 2012).

Considerando, nas últimas décadas, a rápida expansão da expectativa de vida associada a comorbidades, fragilidade fisiológica e senescência imune (Martin, Mannino, Moss, 2006), estima-se que a mortalidade causada por sepse pode aumentar exponencialmente (Kahn et al., 2015). Por mais que exista uma série de tratamentos propostos para a sepse, ainda não há uma terapia aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) que possibilite maior sobrevivência (Marshall, 2014).

Diversos estudos sugerem uma sinergia entre a idade dos pacientes, presença de comorbidades e uma injúria persistente que cria um *status* de disfunção imune, imunossupressão, catabolismo e inflamação (Boomer et al., 2011; Gentile et al., 2012; Elliot et al., 2014). Pacientes com diabetes mellitus são fisiologicamente mais frágeis e são amplamente presentes nos pacientes que apresentam complicações pós-sepse e, consequentemente elevada taxa de mortalidade (Frydrich et al., 2017).

O sistema cardiovascular é um dos sistemas mais importantes afetados pela sepse (Zoubi et al., 2018). A maioria dos pacientes que apresentam sepse, e todos os que tiveram choque séptico desenvolvem disfunções cardiovasculares (Merx, Weber, 2007), levando ao aumento da mortalidade (Blanco et al., 2008). A bacteremia causada por *S. agalactiae* pode levar à deposição de células bacterianas nas válvulas, e uma posterior endocardite. Biofilmes de *S. agalactiae* na endocardite podem tomar

grandes proporções, levando o paciente a um alto risco de embolização (Amico, Calvo, Corrao, 2017; Raabe and Shane, 2019).

Bactérias encapsuladas têm sido responsáveis pela maioria dos casos de bacteremia e meningite (Thigpen et al., 2011; Martin et al., 2014). Dentre eles, *S. agalactiae* é considerado o maior causador dessas doenças. Esses organismos compartilham uma característica em comum, serem circundados por uma cápsula polissacarídica que promove a evasão do sistema imune (Sadarangani, 2018).

A ativação de NF- $\kappa$ B desempenha um papel crucial na fisiopatologia de pacientes com sepse (Kapoor et al., 2010; Khan et al., 2013; Coldewey et al., 2013) e diabéticos com cardiopatias. Na sepse, a ativação de NF- $\kappa$ B é secundária a ativação de TLR 2 e 4 pelos fragmentos da parede de bactérias Gram-negativas (lipopolissacarídeos) e Gram-positivas (peptideoglicanos, PepG) e ou citocinas próinflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 (Zuckerman, Evans, Guthrie, 1991; Liu, Malik, 2006). Zoubi e colaboradores (2018) demonstraram que a inibição da ativação de NF- $\kappa$ B por um inibidor de IkB quinase (IKK-16) atenuou a disfunção cardíaca causada pela sepse em camundongos saudáveis (Coldewey et al., 2013) e com doenças crônicas renais (Chen et al., 2017).

A inflamação é um componente chave da resposta imune durante infecções com todos os estreptococos patogênicos (LaRock, Nizet, 2015). Durante o desenvolvimento da sepse, o recrutamento de células imunes, principalmente da imunidade inata, é crucial para combater o patógeno. Neutrófilos são críticos para a rápida erradicação de patógenos bacterianos, mas também contribuem para o desenvolvimento de falência múltipla de órgãos e dano tecidual na sepse (Deitch, 1992; Craciun, Schuller, Remick, 2010). Em um modelo de sepse murino proposto por Ness e colaboradores (2003), a redução do recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção aumentou a sobrevivência dos animais, contudo no trabalho publicado por Mercer-Jones e colaboradores (1997) essa diminuição foi extremamente prejudicial. Sendo assim, estudos mais profundos analisando o papel desse tipo celular durante a sepse de cada micro-organismo deve ser estudada mais profundamente, visando buscar respostas mais específicas.

Para desempenhar sua função, os neutrófilos devem migrar da corrente sanguínea para o local da infecção em resposta a fatores quimiotáticos, incluindo o peptídeo C5a, leucotrieno B4, e quimiocinas CXC, como CXCL8 (Luster, 1998). Camundongos não possuem CXCL8, mas dois homólogos funcionais já foram

descritos: CXCL1 (KC) e CXCL2 (MIP-2). KC é uma importante quimiocina capaz de atrair neutrófilos ao sítio de infecção, e se liga ao receptor CXCR2 em camundongos (Ritzman et al., 2010). Filippo e colaboradores (2008) demonstraram que os macrófagos residentes dos tecidos são a maior fonte produtora dessas quimiocinas, responsáveis por atrair os neutrófilos.

A inflamação mediada pelo inflamassoma e pela citocina IL-1 $\beta$  são alguns dos primeiros e mais importantes alarmes de infecção. Essas vias são responsivas aos fatores de virulência que os patógenos usam para subverter os processos imunológicos e, portanto, são tipicamente ativadas apenas por patógenos com potencial para causar doenças graves, como a sepse (LaRock, Nizet, 2015). IL-1 $\beta$  é uma citocina capaz de ativar monócitos, macrófagos, neutrófilos e também induzir a resposta de Th1 e Th17. Sua ativação acontece a partir de proteases, em especial a caspase-1, que é por sua vez ativada pelos inflamossomas (Netea et al., 2010).

Uma pesquisa recente realizada por Ali e colaboradores (2015) demonstrou que o tratamento com o antagonista do receptor de IL-1 agrava a artrite séptica estafilocócica e a sepse em camundongos. Além disso, de acordo com o autor, a IL-1β contribui para o recrutamento de macrófagos e eliminação de *Streptococcus pneumoniae* em modelo de sepse. Contudo, de acordo com Zhang e colaboradores (2014), o efeito de IL-1β pode ser antagonista, aumentando o risco de sepse para alguns patógenos. Estudos mais aprofundados envolvendo a expressão dessa citocina na infecção bacteriana generalizada precisam ser conduzidos para esclarecer melhor questões como essa.

O uso de diferentes modelos de infecção é importante em *S. agalactiae* para mimetizar as diferentes formas utilizadas pelo patógeno para causar diferentes doenças, através da sua dispersão pela corrente sanguínea e desenvolvimento de sepse (Andrade et al., 2018). Modelos experimentais de meningite bacteriana são usados para obter mais informações sobre os mecanismos pelos quais os leucócitos são atraídos para o sistema nervoso central, e quais os mecanismos de ação dos micro-organismos para ultrapassar a barreira hematoencefálica. Durante a meningite bacteriana experimental murina, concentrações aumentadas de KC e MIP-2 foram encontradas em camundongos com meningite pneumocócica ou meningocócica (Zwijnenburg et al., 2006).

A utilização de modelos de infecção que estudem a capacidade de S. agalactiae em aderir e invadir células do trato vaginal, além de ascender ao útero e ser capaz de ultrapassar a barreira placentária são de extrema relevância (Patras, Doran, 2016). Duas citocinas tem um papel importante protetivo em infecções com outros patógenos como *Candida albicans*, IL-17 e IL-23 (Wu et al., 2006; Pietrella et al., 2011).

IL-17 é produzida em resposta à ativação das células CD4 Th17 que conferem proteção contra infecções bacterianas e fúngicas extracelulares, particularmente em superfícies de células epiteliais (Curtis, Way, 2009). A IL-23 é uma interleucina heterodímera da família das IL-12 (Yannam et al., 2012). É produzida pela ativação das células dendríticas, macrófagos e monócitos, sendo assim considerada uma citocina ativada durante a atuação das células da imunidade inata (Oppman et al., 2000; Lee et al., 2004; Tchatalbachev et al., 2010). A IL-23 também pode ser ativada devido à presença de IL-17, o que é importante na indução de outras citocinas, recrutamento de neutrófilos e morte bacteriana.

O estudo do desenvolvimento da sepse causada por *S. agalactiae*, e suas possíveis consequências envolvendo o surgimento de outras doenças é muito importante, principalmente em grupos de pacientes imunocomprometidos. A preocupação eminente com a resistência aos antimicrobianos, a falta de uma vacina que possa ser utilizada por esses pacientes e sua imunidade alterada em decorrência de comorbidades associadas é preocupante, e trabalhos que busquem auxiliar na resolução desse problema são de extrema relevância.

#### Endocardite e doenças pulmonares

A endocardite bacteriana ou endocardite valvular é uma patologia produzida por uma infecção microbiana na superfície endotelial valvular (Calvert, 1982; Pompeu, 2003). As válvulas anormais ou lesadas são as mais susceptíveis a infecções. O acúmulo de bactérias e coágulos sanguíneos nas válvulas, denominadas vegetações, podem soltar-se e deslocar-se até órgãos vitais, que por sua vez podem obstruir o fluxo sanguíneo arterial (Barroso et al., 2005). Essas obstruções são graves e podem levar o paciente a ter um acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, infecção e lesão da área onde estiverem localizadas (Barroso et al., 2005). O lado esquerdo do coração é o mais afetado, sendo a válvula mitral mais atingida do que a aórtica. A válvula tricúspide é ocasionalmente atingida, enquanto a pulmonar é atingida raramente (Hawe, 1980).

Normalmente o endotélio valvular normal é resistente à colonização bacteriana (Durack, Beeson, Petersdorf, 1973). Para o desenvolvimento da endocardite é necessária a ocorrência simultânea de alguns eventos: alteração da superfície da válvula cardíaca que produz um sítio adequado para aderência e colonização bacteriana; bacteremia com organismo capaz de aderir e colonizar o tecido da válvula, e a criação de uma massa infecciosa ou "vegetação" a partir da proliferação do organismo com uma matriz (por exemplo a fibrina) e plaquetas (Holland et al., 2016).

A endocardite bacteriana é relativamente rara, porém pode ser fatal. A incidência mundial nos últimos anos aumentou de 1,5 para 11,6 casos a cada 100.000 pessoas. Mesmo com terapias avançadas, a taxa de mortalidade é de aproximadamente 25% (Holland et al., 2016).

Cerca de 80% dos casos de endocardite são causados pelos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus* (Holland et al., 2016). Hirai e colaboradores (2017) descreveram um estudo de caso, onde a paciente apresentou endocardite bacteriana causada por *S. agalactiae* (amostra do tipo capsular VI) e complicações subjacentes como pericardites, abcessos intraventriculares e aneurisma. Entre os anos 1930 e 1940, a endocardite causada por *S. agalactiae* era predominantemente associada a infecções agudas em mulheres grávidas ou pós-parto, primordialmente envolvendo a válvula mitral (Lerner et al., 1977). A epidemiologia da endocardite causada pelo *S. agalactiae* se desenvolveu com o tempo e casos descritos na década de 1960 apontavam agora homens e mulheres grávidas sendo acometidos com essa doença em válvulas aórticas e tricúspide (Raabe & Shane, 2019).

Apesar de anormalidades nas válvulas cardíacas serem consideradas um fator de risco para a endocardite causada por *S. agalactiae*, muitos casos vêm sendo descritos também em corações estruturalmente normais (Georgieva et al., 2010; Ariyoshi, Miyamoto, Bolger, 2016). Segundo um levantamento dos casos clínicos entre 1984 e 2004, cerca de 41% dos pacientes com endocardite causada pelo *S. agalactiae* foram à óbito (Georgieva et al., 2010). De acordo com Sambola e colaboradores (2002) 11 a cada 30 adultos com endocardite causada por *S. agalactiae* possuem menos de 65 anos. Vários deles apresentavam comorbidades adjacentes como doenças cardíacas, doenças reumáticas e prótese mecânica. Os sintomas dessa doença se apresentaram entre o primeiro e o trigésimo dia e os sinais clínicos mais comuns foram febre e falência cardíaca do lado esquerdo ou derrame. As válvulas mitral e aórtica foram as mais envolvidas (Sambola et al., 2002; Rajagopalan, 2005).

A endocardite causada por *S. agalactiae* é uma doença agressiva com taxas significantes de complicações locais e sistêmicas (Abdelghany, Schenfeld, 2014). Essas complicações podem incluir embolia, falha do coração e significante mortalidade (Abdelghany, Schenfeld, 2014). O tratamento da endocardite causada por *S. agalactiae* é desafiador. Esse microrganismo é geralmente susceptível a antibióticos beta lactâmicos, contudo a concentração mínima inibitória (MIC) em casos de endocardite tende a aumentar em relação às outras espécies de *Streptococcus* (Bayer et al., 1976). Esses pacientes são usualmente tratados com antibióticos beta-lactâmicos com gentamicina. O tratamento cirúrgico pode ser considerado, especialmente em pacientes que apresentam embolia, falha do coração ou falha nos tratamentos (Rollán et al., 2003).

São poucos os estudos que correlacionam a maior prevalência de endocardite em pacientes diabéticos. Moreno e colaboradores (2002) demonstraram que níveis elevados de glicose no sangue são comumente encontrados em pacientes com endocardite. Pacientes com diabetes mellitus e bacteremia causada por estafilococos foram mais susceptíveis a desenvolver endocardite do que os pacientes nãodiabéticos (Cooper, Platt, 1982).

#### Diabetes e inflamação

Diabetes é um grupo de doença metabólica caracterizada por hiperglicemia resultante de defasagem na secreção de insulina, problemas na ação da insulina ou ambos. A hiperglicemia crônica está associada com danos a longo-prazo, disfunção e falha de diferentes órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Uma série de processos patogênicos estão associados ao desenvolvimento da diabetes. Podem ir desde a destruição autoimune das células  $\beta$ -pancreáticas que levam à deficiência na insulina até a anormalidades que resultam na resistência à ação da insulina (*American Diabetes Association*, 2011).

A diabetes mellitus é uma doença comum e devastadora, frequentemente encontrada em pacientes críticos (Frydrich et al., 2017). A incidência mundial e prevalência da diabetes em locais como nos Estados Unidos duplicou de 11,9 milhões de pessoas nos anos 2000 para 21,9 milhões de pessoas em 2014 (CDC, 2016). Em 2014, a estimativa era de 422 milhões de adultos no mundo com diabetes mellitus, comparados a 108 milhões em 1980. O maior crescimento na prevalência da diabetes tem sido em países em desenvolvimento (CDC, 2016).

Infecções por *S. agalactiae* são comumente associadas com doenças adjacentes, principalmente diabetes mellitus e pessoas imunocomprometidas (Huang et al., 2006). A diabetes mellitus é a comorbidade mais comum, tipicamente presente em 20%-25% dos adultos não-grávidos colonizados por *S. agalactiae* (Frydrich et al., 2017). Navarro-Torné e colaboradores em 2021 demonstraram que a diabetes foi a comorbidade mais presente em relatados de doenças invasivas causadas por *S. agalactiae*. Em Atlanta, mais de 40% dos jovens e adultos (18-64 anos) com infecções invasivas por *S. agalactiae* possuíam diabetes (Farley, 2001). Outras condições incluindo obesidade, cirrose, histórico de derrame, câncer de mama, úlcera de decúbito e bexiga neurogênica também tem sido associadas com o risco aumentado de infecções invasivas pelo *S. agalactiae* (Jackson et al., 1995).

Pacientes com diabetes apresentam um maior risco de desenvolvimento de sepse, além do aumento da morbidade e mortalidade (Tiwari et al., 2011). A combinação da maior incidência, prevalência e aumento da expectativa de vida dos indivíduos com diabetes, combinados ao maior risco de infecções está resultando numa expansão rápida da população apresentando sepse e consumindo mais recursos médicos (Frydrich et al., 2017).

A diabetes está associada com o aumento da susceptibilidade às infecções bacterianas invasivas (Kenzel et al., 2012). A insulina por sua vez tem sido atribuída às propriedades regulatórias da resposta antimicrobiana e inflamatória nas infecções (Martins et al., 2009; Martins et al., 2010). Pacientes resistentes à insulina apresentam polimorfonucleares (PML) com funções alteradas, modificando a resposta de defesa do hospedeiro às infecções bacterianas (Kenzel et al., 2012). Alterações das vias de sinalização e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos fagócitos estão envolvidas no desenvolvimento de complicações da diabetes (Ferreira et al., 2015). Dentre as ROS produzidas pelas células fagocíticas, destaca-se o superóxido produzido no momento em que microrganismos são fagocitados pela célula. O

superóxido atua como precursor do peróxido de hidrogênio que, por não possuir carga, consegue permear a membrana livremente (Halliwell, 1990). Uma vez no citoplasma bacteriano, o superóxido de hidrogênio pode gerar radicais hidroxil que causam danos celulares (Halliwell, 1990). Sabe-se que *S. agalactiae* é capaz de sobreviver por longos períodos dentro de fagócitos, contribuindo para o progresso de doenças causadas por este patógeno (Teixeira et al., 2001; Thwaites, 2011). Contudo, o papel das ROS durante a infecção por *S. agalactiae* permanece pouco conhecido.

Adultos com diabetes mellitus podem desenvolver múltiplas anormalidades em relação à função dos fagócitos, além de alterações na aderência dos leucócitos e na quimiotaxia. O sistema antioxidante envolvido na atividade bactericida das células imune também pode ser afetado (Joshi et al., 1999; Rajagopalan, 2005). A ativação persistente de um pequeno número de neutrófilos em associação com a hiperglicemia ou a presença dos produtos finais da glicosilação podem modificar a resposta dos neutrófilos (Delamaire et al., 1997; Rajagopalan, 2005). Além disso, a diabetes está sendo associada com uma redução na resposta das células T e com desordens na imunidade humoral (Geerlings, Hoepelman, 1999; Casqueiro, Casqueiro, Alves, 2012). Consequentemente, a diabetes mellitus aumenta a susceptibilidade às infecções e complicações como hipoglicemia e cetoacidose.

A diabetes também pode predispor os pacientes aos danos musculares. Modificações microangiopatogênicas e aterosclerose estão associados com microinfartos (Nielsen et al., 2017). A subsequente diminuição do fornecimento sanguíneo e hipóxia local pode aumentar o risco de infecções e formação de abcessos. Membranas densamente espessadas nos capilares já foram notadas em diabéticos e são capazes de inibir a migração de neutrófilos (Panikkath et al., 2016).

Modelos animais diabéticos são capazes de demonstrar evidências de que a hiperglicemia está associada com o aumento de mortalidade entre os diabéticos, em experimentos de sepse (Koga et al., 2017). Estudos com modelos animais demonstraram que a maneira ideal para a indução à diabetes mellitus é utilizando a droga estreptozotocina. Essa droga é isolada de *Streptomyces achromogenes* var. *streptozoticus* e possui propriedades citotóxicas que causam danos irreversíveis às células beta-pancreáticas (Edwards, Fuselier, 1983).

Ainda são escassos os estudos que correlacionam a diabetes com infecções bacterianas por *S. agalactiae* e, posterior desenvolvimento da sepse. Apesar disso, grande parte dos adultos não grávidos que apresentam sepse são diabéticos. O
aumento da proporção da inflamação sem resolução, com altos níveis de produção de oxidantes e citocinas pró-inflamatórias parece estar relacionado com essa maior susceptibilidade às infecções. Dessa forma, são necessárias investigações mais aprofundadas sobre a resposta imune dos pacientes diabéticos a partir de modelos *in vivo* e *in vitro* em condições de cultivo estático com o intuito de contribuir para a diminuição da mortalidade a partir de infecções por *S. agalactiae* e doenças como a sepse, endocardite, pneumonia e meningite.

#### 1 OBJETIVOS

Nos últimos anos houve um aumento considerável e preocupante de infecções por *S. agalactiae* em adultos e idosos, principalmente portadores de doenças crônicas como diabetes mellitus. De acordo com levantamentos bibliográficos, pacientes diabéticos desenvolvem outras doeças como sepse, pneumonia, endocardite e meningite em resposta à infecção por *S. agalactiae*. Buscamos compreender, nesse trabalho, se o aumento de citocinas pró-inflamatatórias e expressão de espécies reativas de oxigênio, em decorrência da infecção por *S. agalactiae*, pode sinalizar um agravamento na condição inflamatória desses pacientes, e em contrapartida potencializar a capacidade do patógeno em evadir o sistema imune. Além disso, hipotetizamos se a presença de fatores de virulência e sistemas de secreção proteica tornam *S. agalactiae* mais apto a sobreviver em condições hiperglicêmicas, e causar, a partir de diferentes mecanismos, doenças graves e que podem levar diabéticos á óbito.

Objetivos Específicos:

- a) Verificar se a adição da glicose é capaz de alterar a formação de biofilme das amostras de *S. agalactiae*;
- b) Analisar se as amostras de S. agalactiae alteram o pH dos diferentes meios de cultura;
- c) Avaliar a capacidade de disseminação e persistência bacteriana em diferentes órgãos-alvo (cérebro, pulmão, fígado, coração) e sangue a partir de vias de infecção distintas, em animais diabéticos e não-diabéticos das linhagens CD-1 e C57BI/6;
- d) Avaliar a capacidade de S. agalactiae em persistir por diferentes períodos de tempo em animais diabéticos e não diabéticos;
- e) Verificar a importância do gene essC, pertencente ao operon do SST7, para a ascenção de S. agalactiae nos órgãos do trato vaginal e na ultrapassagem da barreira hematoencefálica;

- f) Verificar se S. agalactiae é capaz de se manter viável em macrófagos bronqueoalveolares obtidos de animais diabéticos e não-diabéticos;
- g) Analisar a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, KC, IL-17, IL-23) em diferentes órgãos-alvo dos animais diabéticos ou não diabéticos infectados por via vaginal e caudal;
- h) Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos obtidos de lavado brônquico de animais diabéticos infectados e animais controles;
- i) Caracterizar o perfil de células imunes utilizando marcadores para macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células T no coração e pulmão dos animais diabéticos ou não infectados com amostras de *S. agalactiae*;
- j) Identificar indícios histopatológicos de endocardite bacteriana e meningite.

# 2 METODOLOGIA

## 2.1 Amostras bacterianas

Foram utilizadas as amostras de *S. agalactiae* GBS90356, COH1, NCTC 10/84 e DO1 provenientes da coleção de cultura do Laboratório de Biologia Molecular e Fisiologia de Estreptococos (LBMFE/UERJ) e as amostras NCTC 10/84∆essC, CJBIII e CJBIII∆essC provenientes do Doran Lab – Universidade do Colorado - Anschutz Medical Campus/EUA. A identificação e tipagem por PCR dos microorganismos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Poyart e colaboradores (2007). Os tipos capsulares e origem das amostras estão demonstrados na tabela a seguir (Tabela 1).

Amostra	Tipo Capsular	Origem				
GBS90356		Isolada de líquor de paciente				
		recém-nascido levado à óbit				
		por meningite				
COH1		Isolado clínico obtido de				
		paciente recém-nascido com				
		sepse no <i>Children</i> 's				
		Orthopedic Hospital (EUA)				
D01	III	Isolada de paciente diabética				
		com infecção urinária				
NCTC 10/84	V	Isolado clinico humano				
CJBIII	V	Isolado clínico de sepse				
		neonatal				
NCTC 10/84∆essC	V	Mutação no gene essC,				
		presente na maquinaria do				
		sistema de secreção tipo 7				
		em bactérias Gram-positivas				
CJBIII∆essC	V	Mutação no gene essC,				
		presente na maquinaria do				
		sistema de secreção tipo 7				
		em bactérias Gram-positivas				

Tabela	1	-	Lista	das	amostras	de	S.	agalactiae	utilizadas	е	suas	respectivas
informações epidemiológicas								6				

A cultura bacteriana foi armazenada a -80°C em alíquotas de meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) contendo 20% de glicerol. As amostras foram crescidas em placas de agar sangue contendo 5% de hemácias de carneiro (Plast Labor LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para realização das interações *in vivo* por via intranasal, as culturas bacterianas foram padronizadas para uma densidade ótica de 0,2 unidades de densidade ótica (UDO) em  $\Lambda$ = 540nm (~1x10<sup>5</sup> unidades formadoras de colônia por mililitro [UFC/mL]) e 0,4 UDO em  $\Lambda$ = 540nm (~1x10<sup>7</sup> UFC/mL) para os demais experimentos.

## 2.2 Comitê de ética

Os estudos realizados com animais estiveram de acordo com a aprovação do Comitê de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes (CEUA – IBRAG), registrado pelo número 47/2016.

Os experimentos realizados durante o período sanduíche no laboratório da Profa. Kelly Doran foram realizados em acordo com o *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) pertencente à Universidade do Colorado Anschutz Medical Campus, sob o número de protocolo #00316.

# 2.3 Identificação do tipo capsular e detecção dos genes da sequência tipo 17 da amostra D01

As amostras GBS90356, COH1, NCTC 10/84 e CJBIII foram previamente caracterizadas (Tettelin et al., 2005; Hooven et al., 2014; Lannes-Costa et al., 2020; Spencer et al., 2021) e dessa forma já tínhamos o conhecimento dos genes de fatores de virulência do nosso interesse e do tipo capsular de cada amostra. A tipagem capsular da amostra de *S. agalactiae* D01 foi realizada através da técnica de PCR multiplex. O DNA bacteriano foi extraído através de lise térmica e 20µL do seu sobrenadante foram utilizados nas reações de amplificação. Foram utilizados primers específicos para os tipos capsulares la, lb, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX, baseados na

temperatura de anelamento e capacidade de gerar tamanhos de amplicons distinguíveis, medidos em pares de base (Poyart et al., 2007, Lannes-Costa et al., 2020).

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 1x (Tris 89mM, EDTA 2mM e ácido bórico 89mM), corados com SYBR Green e visualizados como bandas brancas sobre um fundo negro por transiluminação UV. O Plus DNA (Invitrogen; 1µg/µL) foi utilizado como padrão de tamanho molecular. Um controle negativo que consistiu na mesma mistura de reação, mas com água bidestilada em vez de DNA, foi incluído em cada ensaio. A corrida dos géis foi realizada em aparelho de eletroforese Biorad- Power Pac Basic. O sistema foi montado em cuba horizontal e colocado sob a voltagem de 100V por 70min a temperatura ambiente.

A amostra D01 foi submetida à verificação do gene de virulência *hvga* por PCR para confirmação da ST-17. No termociclador (VERITI 96 WELL THERMAL CYCLER, AppliedBio), 25µL de reação final (200µM cada dNTP, 5u/µL de GoTaq polimerase, tampão GoTaq 5x e 50ng DNA) foram utilizados, seguindo os padrões utilizados anteriormente na tipagem. As temperaturas e tempos utilizados para desnaturação, anelamento e amplificação foram: 96°C por 1min, 45°C por 1min e 72°C por 45s, por 35 ciclos. Um total de 20µL de cada produto de PCR foi separado por eletroforese num gel de agarose para confirmar a amplificação bem sucedida.

#### 2.4 Ensaios de biofilme

Para os experimentos de produção de biofilme foram selecionadas as amostras COH1, GBS90356 e D01, disponíveis no LBMFE/UERJ.

Suspensões bacterianas (10<sup>8</sup> UFC/mL) em meio Tryptic Soy Broth (TSB) e Brain Heart Infusion (BHI) foram distribuídas em microplacas de poliestireno com 96 poços (200µL/poço) (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) e incubadas por 24h a 37°C. As placas foram divididas em quatro condições distintas: meio BHI, meio BHI acrescido com 1% de glicose, meio TSB e meio TSB acrescido com 1% de glicose. Após 24h, o sobrenadante foi retirado para verificar possíveis alterações de pH do meio utilizando fitas indicadoras de pH (MQuant, Supelco, Sigma-Aldrich). O biofilme foi fixado com metanol 99%, corado com cristal violeta a 0,2% e solubilizado com ácido acético a 15%. A quantificação foi realizada em leitor de microplacas a  $\lambda$ =595nm (Thermo Scientific Multiskan Spectrum). O biofilme foi classificado em: não produtor de biofilme: DO<sub>492</sub> ≤ DOc (valor de corte da DO); fraco produtor de biofilme: DO<sub>492</sub> ≤ 0,2 ≥ DOc; moderado produtor de biofilme: 0,2 < DO<sub>492</sub> ≤ 0,4; forte produtor de biofilme: DO<sub>492</sub> > 0,4 (Swedan et al., 2019).

#### 2.5 Animais

Nos experimentos realizados no LBMFE/UERJ foram utilizados 100 animais, entre machos e fêmeas, pertencentes à linhagem CD-1 IGS (*Charles River Laboratories*, USA). Os animais foram cedidos pelo Dr. Alexandre Dias do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Imunologia, Laboratório de Vacinas Bacterianas (LVB) – Fundação Oswaldo Cruz/RJ, com peso variando entre 30-40 gramas. Durante os experimentos realizados no exterior foram utilizados cerca de 200 animais, entre machos e fêmeas, pertencentes à duas linhagens distintas: CD-1 IGS e C57BI/6 (*The Jackson Laboratory*, EUA).

Os animais CD-1 são classificados como animais *outbred*. Esse grupo de animais é derivado de colônias heterogênicas, não consanguíneas, exocriadas ou exogâmicas, provenientes de cruzamentos ao acaso ou aleatoriamente e, por este motivo, seus descendentes apresentam constituição genética variada (CEDEME, 2022). Os animais C57BI/6, também conhecidos como B6, são camundongos *inbred*. São linhagens isogênicas, consanguíneas, endocriadas ou endogâmicas, obtidas a partir de cruzamentos entre irmãos por pelo menos 20 gerações consecutivas a partir de casais monogâmicos permanentes, denominados de fundadores ou casais de fundação. Esta estrutura de cruzamentos resulta em indivíduos geneticamente idênticos com grau de consanguinidade ou endogamia de 98,6% (CEDEME, 2022).

Todos os animais foram submetidos à dieta padrão, possuindo acesso livre à água e ração. Os dados de consumo e massa corporal foram aferidos a partir de uma escala realizada a cada quatro dias e, posteriormente analisados estatisticamente utilizando o *one-way* ANOVA e o pós teste Newman-Keuls no GraphPad Prisma 5.

#### 2.6 Grupos de estudo

# 2.6.1 <u>Grupos de estudo para a realização dos experimentos em modelo murino de</u> diabetes induzida

Para a realização do estudo os camundongos foram divididos em quatro grupos:

Grupo 1 – Não-diabético não-infectado (NDNI): 15 animais (7 machos e 8 fêmeas), que não foram submetidos à indução da diabetes por estreptozocina ou à infecção por *S. agalactiae*;

Grupo 2 – Diabético não-infectado (DNI): 15 animais (7 machos e 8 fêmeas) submetidos à indução da diabetes por estreptozocina e livres de infecção por *S. agalactiae*;

Grupo 3 – Não-diabético infectado com a amostra GBS90356 ou COH1 (NDI): 76 animais (38 machos e 38 fêmeas) que não foram submetidos à indução da diabetes por estreptozotocina e nem infectados com as amostras de *S. agalactiae* GBS90356 ou COH1.

Grupo 4 – Diabético infectado com a amostra GBS90356 ou COH1 (DI): 76 animais (38 machos e 38 fêmeas) submetidos à indução da diabetes por estreptozotocina e infectados com a amostra de *S. agalactiae* GBS90356 ou COH1.

Foram dois os tempos de infecção: cinco dias e cinco semanas. Os experimentos no período de cinco dias, realizados no EUA, enquanto os experimentos de cinco semanas foram realizados no Brasil. Por limitação de tempo no período de doutorado sanduíche, parte dos experimentos descritos nos próximos tópicos foram realizados apenas no modelo de infecção de cinco dias.

Os animais resistentes à droga não foram utilizados no estudo, assim como os animais que morreram em decorrência da diabetes.

# 2.6.2 <u>Grupos de estudo para a realização dos experimentos visando a caracterização</u> <u>do SST7 em S. agalactiae</u>

Para a realização dos ensaios de infecção em modelo vaginal os camundongos foram divididos em dois grupos:

Grupo 1: Camundongos CD1 submetidos à coinfecção com as amostras NCTC 10/84 e NCTC 10/84ΔessC: 20 camundongos fêmeas submetidos à infecção vaginal com uma suspensão contendo as duas amostras NCTC 10/84 WT e NCTC 10/84ΔessC;

Grupo 2: Camundongos C57BI/6 submetidos à coinfecção com as amostras CJB III e CJBIII∆essC: 20 camundongos fêmeas submetidos à infecção vaginal com uma suspensão contendo as duas amostras CJB III WT e CJBIII∆essC.

Para a realização dos ensaios de infecção em modelo caudal os camundongos foram divididos em dois outros grupos:

Grupo 1: Camundongos CD-1 infectados com a amostra CJB III: 20 camundongos machos submetidos à infecção caudal com uma suspensão contendo a amostra de *S. agalactiae* CJB III;

Grupo 2: Camundongos CD-1 infectados com a amostra CJB IIIΔessC: 20 camundongos machos submetidos à infecção caudal com uma suspensão contendo a amostra de *S. agalactiae* CJB IIIΔessC.

## 2.7 Indução da diabetes mellitus

A indução da diabetes nos camundongos da linhagem CD-1 IGS foi realizada utilizando 180mg/kg da droga estreptozotocina (Sigma-Aldrich) diluída em tampão citrato por via intraperitoneal (SILVA et al., 2010). A aferição de peso de todos os animais foi feita 2h antes da indução. Os animais controle foram tratados com tampão

citrato puro. Após a indução, os animais receberam durante um dia água com adição de açúcar, além da ração já utilizada, com o intuito de evitar hipoglicemia.

#### 2.8 Aferição da glicemia

A glicemia foi aferida 2h antes da indução da diabetes com a estreptozotocina e 48h após a indução da diabetes com o auxílio de um monitor de glicemia AccuCheck Active e fitas glicêmicas. Os animais foram previamente pesados e marcados com uma caneta permanente para identificação. Para a dosagem glicêmica, os animais foram momentaneamente imobilizados e submetidos a um pequeno corte na ponta da cauda, e o sangue foi retirado e colocado nas fitas glicêmicas para leitura pelo aparelho. Foi considerado diabético o animal com a glicemia acima de 200mg/dL, seguindo o parâmetro de Kasap e colaboradores (2017). A confirmação da glicemia foi realizada novamente ao final dos experimentos.

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 5, teste *one-way* ANOVA e pós teste Newman-Keuls.

#### 2.9 Modelo de infecção intranasal com a amostra de S. agalactiae GBS90356

Para a realização da infecção intranasal, os camundongos foram inicialmente tratados com uma combinação anestésica (0,17mL xylazina, 2,83mL solução salina, 0,33mL ketamina) por via intraperitoneal. Cada animal recebeu entre 0,10mL e 0,15mL do anestésico. Posteriormente, os animais foram infectados com  $30\mu$ L da suspensão bacteriana crescida em meio BHI (0,2 UDO; ~  $1x10^7$  UFC/mL) por via intranasal, como demonstra a Figura 3. Os grupos infectados foram mantidos em caixas separadas, cerca de 3 a 4 animais por caixa, até o momento da eutanásia. O período de infecção utilizado foi de cinco semanas (infecção crônica).



# Figura 3 – Modelo de infecção murina intranasal com amostra de S. agalactiae

Legenda: Infecção murina realizada via intranasal em camundongos CD1 com cerca de 6 a 8 semanas, utilizando a amostra de *S. agalactiae* GBS90356.

A partir desse modelo foram realizadas análises histológicas cardíacas, contagem de UFC/mL nos diferentes órgãos-alvo, obtenção do lavado bronqueoalveolar para obtenção de macrófagos pulmonares e dosagem de espécies reativas de oxigênio.

# 2.10 Modelo de infecção intraperitoneal (IP) com as amostras de *S. agalactiae* GBS90356 e COH1

Nos experimentos em que utilizamos o modelo de infecção intraperitoneal, a suspensão bacteriana crescida em meio BHI (0,4 UDO; ~ 1x10<sup>7</sup>UFC/mL) foi administrada diretamente via injeção IP com agulhas de insulina (12,7mm, BD Ultra Fine), num volume de 100µL, como demonstrado na Figura 4. Os animais controle foram tratados com tampão PBS puro. Os grupos foram mantidos em caixas separadas até o momento da eutanásia, e os animais que foram infectados com a amostra GBS90356 não tiveram contato com os animais infectados com a amostra COH1. Para esse modelo foi utilizado apenas o tempo de cinco dias (infecção aguda).



## Figura 4 - Modelo de infecção murina intraperitoneal com amostras de S. agalactiae

Legenda: Infecção murina realizada via intraperitoneal em camundongos CD1 com cerca de 6 a 8 semanas, utilizando as amostras de *S. agalactiae* GBS90356 e COH1.

Utilizamos esse modelo para realizar análises histológicas cardíacas, contagem de UFC/mL nos diferentes órgãos-alvo, obtenção do lavado bronqueoalveolar, ensaios de ELISA para quantificação dos níveis de citocinas próinflamatórias, extração de RNA para qPCR e citometria de fluxo para identificar marcadores de células imunes.

# 2.11 Modelo de infecção vaginal com as amostras de *S. agalactiae* NCTC 10/84, NCTC 10/84∆essC, CJBIII e CJBIII∆essC

Para a realização dos experimentos em modelo vaginal de infecção foram utilizadas apenas camundongos fêmeas, das duas linhagens distintas CD1 e C57BI/6. As amostras NCTC 10/84, NCTC 10/84 $\Delta$ essC, CJBIII e CJBIII $\Delta$ essC foram crescidas em meio THB (Todd Hewitt broth) e preparadas para inoculação (0,4 UDO, ~ 2x10<sup>8</sup> UFC/mL). No dia anterior à infecção, os animais foram tratados com  $\beta$ -estradiol diluído em óleo sesame (0,5mg em 500µL) via IP (100µL por animal) visando regular o ciclo das fêmeas. A administração foi realizada com o auxílio de uma ponteira de 20µL, onde 10µL da suspensão bacteriana foi inserida no trato vaginal do animal. A inoculação dos animais foi feita em modelo de competição. Nos animais CD1 foram inseridas concomitantemente as amostras NCTC 10/84 e NCTC 10/84 $\Delta$ essC; e nos

animais C57BI/6 foram inoculadas as amostras CJBIII e CJBIII∆essC. O modelo de infecção está representado na Figura 5.

Inicialmente a cada dois dias após a inoculação, *swabs* estéreis de algodão embebidos em tampão PBS foram introduzidos na região vaginal de cada animal. Após esse procedimento, os *swabs* foram inseridos em tubos *eppendorfs* contendo 10µL de PBS. Os mesmos foram homogeneizados, diluídos e plaqueados em meio THA (Todd Hewitt agar) para contagem de UFC/mL vaginal. Esse monitoramento foi realizado para verificar por quantos dias as amostras de *S. agalactiae* são capazes de se manter viáveis no trato vaginal, e qual amostra (WT ou mutante) persistia por maiores períodos de tempo. Após algumas semanas, o período de coleta foi aumentado, chegando a ser realizado apenas 1 vez por semana.

Os grupos foram mantidos em caixas separadas até o momento da eutanásia. Para esse modelo, o tempo para eutanásia não foi pré-estabelecido. De acordo com a contagem de UFC/mL obtida dos *swabs*, cada experimento apresentou um tempo de encerramento distinto. O critério para decisão foi ter metade do grupo de animais sem nenhum crescimento bacteriano. Por exemplo, em um grupo de dez animais, cinco não deveriam mais apresentar UFC/mL após a coleta.

Figura 5 - Modelo de infecção murina vaginal com amostras de S. agalactiae



Legenda: Infecção murina realizada via vaginal em camundongos fêmeas CD1 ou C57BI/6 com cerca de 6 semanas, utilizando as amostras de *S. agalactiae* CJB III, CJB III∆essC, NCTC 10/84 e NCTC 10/84∆essC.

O modelo vaginal é importante para compreender melhor a capacidade de ascensão de *S. agalactiae* no trato vaginal. Para visualizar a ascensão bacteriana,

vagina, cólo do útero e útero foram macerados para contagem de UFC/mL e quantificação de citocinas pró-inflamatórias.

# 2.12 Modelo de infecção caudal com as amostras de *S. agalactia*e CJBIII e CJBIII∆essC

Para a realização dos experimentos visando induzir meningite nos camundongos, foi utilizada a via de infecção caudal. Camundongos CD1 machos, com cerca de 8 semanas foram imobilizados utilizando um retentor de camundongos (Sigma-Aldrich), onde a cauda do animal foi exposta numa superfície aquecida para dilatação do vaso sanguíneo. Com auxílio de uma seringa, a suspensão bacteriana das amostras CJBIII e CJBIII∆essC (0,4 UDO; ~ 1x10<sup>8</sup> UFC/mL) foram introduzidas em cada animal de seu respectivo grupo, como observamos na Figura 6.

Por ser uma via direta e com doses capazes de causar lesão mais rápida, os camundongos foram acompanhados durante todo o período. Durante as 72h de infecção, os animais foram monitorados para verificar óbito e sinais de desenvolvimento de meningite, tais como hemorragia ocular e cegueira, perda de coordenação motora, pelos arrepiados e confusão mental. Os animais que apresentaram esses sinais foram eutanasiados de acordo com o protocolo de saúde e bem estar animal. Uma curva de sobrevivência foi elaborada e os animais que sobreviveram por 72h foram eutanasiados para experimentos posteriores. Os animais controle foram tratados com tampão PBS puro. Os grupos foram mantidos em caixas separadas até o momento da eutanásia.

Figura 6 - Modelo de infecção murina caudal com amostras de S. agalactiae

Camundongos CD1 com 8 semanas (Ç)		Dias	-	KAR
	1 × 10 <sup>8</sup> UFC via injeção caudal		72h Homogeinização tecidual; Histologia	

Legenda: Infecção murina realizada via vaginal caudal em camundongos machos CD1 com cerca de 8 semanas, utilizando as amostras de *S. agalactiae* NCTC 10/84 e NCTC 10/84∆essC.

No modelo caudal temos, em rápida velocidade, a presença do *S. agalactiae* na corrente sanguínea e a ultrapassagem da barreira hemato-encefálica, causando meningite nos animais em cerca de 24h. Nesse modelo utilizamos os órgãos-alvo para homogeneização e contagem de UFC/mL, histologia do cérebro para avaliar a meninge e dosagem de citocinas pró-inflamatórias.

## 2.13 Eutanásia dos animais

#### 2.13.1 Eutanásia dos animais submetidos ao modelo de infecção intranasal

Após o tempo de infecção de cinco semanas, os animais foram novamente anestesiados, imobilizados e cerca de 200 µL de sangue foram retirados de cada animal com o auxílio de pipetas Pasteur de vidro.

Os animais foram eutanasiados utilizando altas doses de anestésico (ketamina e xylazina), de acordo com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (BRASIL, 2013). Os animais foram necropsiados para a retirada dos órgãos alvo: coração, baço, fígado, cérebro e pulmão. Os órgãos reservados para análises histológicas foram mantidos a 4°C em tubos cônicos (50mL) contendo paraformaldeído 4%. Os demais órgãos foram pesados e colocados separadamente em tubos de plástico contendo solução PBS e macerados com o auxílio do equipamento Beadbeater (Biospec Products). Foi realizada uma diluição seriada em placas de 96 poços contendo 225µL de PBS e 25µL do tecido homogeneizado que foi depositado em diferentes diluições em placas de meio ágar acrescido 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram mantidas em estufa de crescimento por 24h para realização da contagem bacteriana em UFC/mL.

As placas de ágar contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro foram retiradas da estufa para contagem bacteriana (UFC/mL), de forma que só foram realizadas as contagens das placas na diluição contendo até no máximo 250 colônias. As placas com um número de colônias superior a 250 foram descartadas para evitar erros de contagens, conforme recomendação do CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* (2016). Foram contadas as colônias características de *S. agalactiae* 

com aspectos descritos pela Anvisa (2008): colônias lisas, pequenas, brilhantes, côncavas e em meio acrescido com 5% de sangue desfibrinado de carneiro, as colônias são circundadas por um halo de  $\beta$ - hemólise. As placas que apresentaram contaminação por outro microrganismo foram descartadas. Os grupos sem inóculo foram igualmente plaqueados para verificar uma possível contaminação.

# 2.13.2 <u>Eutanásia dos animais submetidos ao modelo de infecção intraperitoneal,</u> vaginal e caudal

No modelo de infecção intraperitoneal, os animais foram mantidos infectados por cinco dias. Como mencionado anteriormente, o modelo vaginal apresentou tempos distintos para eutanásia e o modelo caudal teve o tempo máximo de 72h, e após esse período os animais foram eutanasiados em câmaras de CO<sub>2</sub>, de acordo com os protocolos indicados pela universidade no Colorado/EUA. Essa metodologia foi aplicada a todos os modelos de infecção realizados durante o período de doutorado sanduíche. A divergência da metodologia de eutanásia está relacionada às práticas exigidas pelos diferentes órgãos competentes e comitês de ética do Brasil e dos Estados Unidos (Institutional Animal Care and Use Committee, 2022).

Após a eutanásia, cerca de 500µL de sangue foram retirados de cada animal com o auxílio de seringas por punção cardíaca. O sangue foi mantido nos *eppendorfs* em gelo até serem feitas as diluições e plaquamento do mesmo. Os animais foram necropsiados para a retirada dos órgãos alvo, de acordo com o modelo de infecção. Nos animais infectados via intraperitoneal foram retirados o coração, baço, fígado, cérebro e pulmão. Nos animais infectados via trato vaginal foram retirados a vagina, o cólo do útero e o útero. Por fim, nos animais infectados via caudal foram retirados o cérebro e o pulmão. Parte dos órgãos reservados para análises histológicas foram armazenados a -80°C em solução OCT para posterior produção de lâminas histológicas.

Os demais órgãos foram pesados e colocados separadamente em tubos de plástico contendo solução PBS e macerados com o auxílio do equipamento Beadbeater (Biospec Products). A diluição realizada foi a mesma descrita no tópico anterior, sendo igualmente depositada em diferentes diluições nas placas de meio ágar acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram mantidas em estufa de crescimento por 24h para realização da contagem bacteriana em UFC/mL.

Nos modelos de infecção vaginal e caudal, os macerados diluídos foram plaquados em meio seletivo cromoágar (CHROMagar StrepB, BD, Germany) sem antibiótico ou contendo antibiótico estreptomicina 100mg/mL para selecionar as amostras mutantes para gene *essC*. A contagem de UFC/mL foi realizada utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente, assim como a confirmação das colônias de *S. agalactiae*. Na coinfecção do modelo vaginal foi feito o seguinte cálculo para definir o número de amostras WT e mutantes:

Número de colônias Δ*essC* crescidas em meio com antibiótico – número de colônias em meio sem antibiótico = número de colônias WT.

#### 2.14 Obtenção do lavado bronqueoalveolar

Após a eutanásia dos animais, a traqueia de cada camundongo foi exposta, e a partir de uma seringa de insulina com agulha 8G, a solução de PBS + EDTA 10mM (cerca de 1,5mL) foi inserida no pulmão. Essa lavagem foi realizada por duas vezes e o líquido retirado foi colocado imediatamente em tubos de 1,5mL identificados no gelo. Parte do lavado bronqueoalveolar foi separado para dosagem de ROS. Após contagem de células aproximadas em câmara de Newbauer, o lavado foi colocado em placas de 24 poços ou garrafas de 25 cm<sup>2</sup> por 40min, numa estufa com 5% CO<sub>2</sub>. Os macrófagos aderiram à placa sem nenhum tratamento prévio. O lavado foi retirado e o meio DMEM completo foi adicionado. As células foram incubadas na estufa de CO<sub>2</sub> por 24h a 37°C até a sua utilização.

## 2.15 Ensaio de interação com macrófagos obtidos do lavado bronqueoalveolar de animais infectados com amostra GBS90356 e controle

O lavado bronqueoaveolar dos animais não diabéticos infectados e dos animais diabéticos infectados foi retirado e colocado em placas de 24 poços (500µL/poço, 4 poços/grupo). Foram adicionados nos poços gentamicina (100µg) e penicilina (50µg)

para que somente as bactérias que invadiram os macrófagos durante a interação *in vitro* fossem contadas ao final do experimento. Após 2h na câmara de CO<sub>2</sub>, para adesão dos macrófagos à placa, os poços foram lavados com salina e os macrófagos foram lisados com adição de 100µL de tripsina + 0,02% de EDTA e 400µL de igepal. Após diluição seriada em salina, foi realizado o plaqueamento em ágar contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro para visualizar o número de bactérias viáveis (UFC/mL).

Nos animais controle, o lavado bronqueoalveolar foi retirado para realizar interações *in vitro* com a amostra GBS90356. Os macrófagos foram contados na câmara de Neubauer e colocados em placas de 24 poços ( $\sim$ 1x10<sup>5</sup>/ poço). As placas foram mantidas na câmara de CO<sub>2</sub> por 24h até a realização dos experimentos.

Após a ativação da amostra GBS90356 em caldo BHI, a densidade óptica foi monitorada até 0,4 UDO (~10<sup>8</sup> UFC/mL). Posteriormente, a amostra foi lavada 2x com salina a 2500rpm por 10min e suspensa em 5mL de meio DMEM puro. Foi realizada a diluição da bactéria, visando deixar a MOI 1:10. 500µL da amostra foram colocados na placa de 24 poços contendo os macrófagos. A interação foi realizada em quatro tempos (0', 30min, 1h e 2h) com e sem antibiótico. Nos tempos sem antibiótico, a cada respectivo tempo os poços foram lavados 2x com salina e adicionados 100µL de tripsina com EDTA + 400µL de igepal. Foi feita a diluição seriada (1:100) e 100µL foram plaqueados em meio ágar base para posterior contagem. Nos tempos com antibiótico, foram colocados gentamicina e penicilina nos poços, que foram tratados com 2h de antibiótico, acrescido o tempo da interação. Os demais procedimentos foram realizados de forma idêntica ao tempo sem antibiótico.

## 2.16 Análise do perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias por ELISA

Os órgãos macerados foram submetidos à análise do perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias (proteína KC, IL-1β, IL-17 IL-23) utilizando diferentes kits de preparação para ELISA (R&D Systems) e o protocolo geral proposto pelo fabricante. As citocinas analisadas foram quantificadas em experimentos onde cada amostra bacteriana (WT ou mutante) foi inoculada em um grupo de animais distinto e não em competição. Placas de 96 poços específicas para ELISA (Corning), foram previamente tratadas com seu respectivo anticorpo (100µL) de captura diluído em

tampão PBS. Após o período de 12h em temperatura ambiente, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (0.05% Tween 20 diluído em PBS, pH 7.2-7.4) e realizado o bloqueio do anticorpo com 300µL de reagente diluente (1% BSA em PBS, pH 7.2-7.4) por 1h. Após uma segunda etapa de lavagem, as amostras dos órgãos homogeneizados foram diluídas em tampão reagente e adicionadas em duplicata por 2h. Em seguida, uma nova etapa de lavagem foi realizada e as placas foram tratadas com anticorpo de detecção mais 2h.

Após mais uma etapa de lavagem, 100µL de estreptavidina-HRP foram depositados nos poços por 20min, ainda em temperatura ambiente. Nessa etapa as placas foram reservadas em local escuro. Posteriormente, os poços foram tratados por 20min em solução substrato (1:1 do Color Reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ColorReagent B (Tetrametilbenzidina)). A reação foi paralizada com solução de stop (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e as placas submetidas à leitura em leitor de microplacas para ELISA (Tecan) em dois comprimentos de onda distintos (450nm e 540nm). A subtração entre as duas leituras correspondeu aos valores inseridos na tabela. A curva padrão gerada em todos os experimentos foi considerada apta para utilização, tendo o valor de R<sup>2</sup> superior à 0,9800 (Benthien et al., 2022; Famà et al., 2020).

## 2.17 Dosagem de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A dosagem das EROs intracelulares foi feita a partir das células do lavado bronqueoalveolar, utilizando a sonda 2'7' diacetato de diclorodi-hidrofluoresceína (H2DCFDA), de acordo com as instruções do fabricante (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). O lavado foi incubado com a sonda por 1h em placa escura de 96 poços (Corning, NY, USA).

Após três lavagens com PBS a leitura da fluorescência foi realizada a partir do leitor de placas Envision Multilabel (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). A fluorescência foi monitorada por 90min de incubação a partir da excitação e emissão nos comprimentos de onda de 495nm e 530nm, comprimento de onda de excitação da sonda e comprimento de onda de emissão da sonda, respectivamente (El-Hassani, Dupuy, 2013). Foram dosados os tempos 0, 30min e 60min (Oliveira et al., 2018).

#### 2.18 Obtenção de células imunes pulmonares por dissociação enzimática

Após a retirada dos pulmões, o tecido foi adicionado em tubos Falcon contendo 3mL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) e tratado com a enzima MTDK1 como recomendado pelo fabricante do dissociador enzimático de tecido gentleMACS (Miltenyi Biotec). Os tubos foram colocados em uma placa de agitação por 30min a 125rpm (37°C) e, posteriormente posicionados no equipamento de dissociação num programa de 15min de rotação. Esse processo foi repetido por 2 vezes e os tubos foram centrifugados rapidamente para separar o líquido do sedimento (300 x g).

A suspensão foi filtrada para novos tubos Falcon visando remover qualquer debris. Os tubos foram novamente centrifugados a 300 x g para separar as células. O sobrenadante foi reservado. A presença de sangue no sedimento foi removida pelo tratamento com tampão de lise ACK por 1min para romper e degradar as hemácias. A reação foi interrompida com adição de 5mL de RPMI e após centrifugação o sedimento foi suspenso em 200uL de tampão MACS. O mesmo foi mantido em 4°C até a próxima etapa de leitura por citometria de fluxo (Spencer et al., 2019).

#### 2.19 Análise do perfil de células imunes pulmonares por citometria de fluxo

Após o processo de dissociação, as células foram colocadas em placas de 96 poços com fundo cônico e centrifugadas a 300 x g por 5min. Os poços foram tratados com um corante de viabilidade celular (diluição de 1:800 em PBS), 50µL/poço por 30min a temperatura ambiente e centrifugados por 5min a 300 x g. Logo após, as placas foram tratadas com um coquetel de anticorpos, contendo os marcadores das seguintes células: neutrófilos (CD11b, Ly6C, Ly6G), macrófagos (CD11b, F4/80), células dendríticas (CD11c, MHC Class II) e células T (CD3). Esse tratamento foi realizado durante 30min em temperatura ambiente e, posteriormente as placas foram lavadas com tampão MACS.

As placas foram fixadas por 15min em temperatura ambiente, centrifugadas a 1100 x g, lavadas novamente 1x com tampão MACS e reservadas em bancada até o dia seguinte. No dia em que as amostras foram submetidas à citometria, as placas

foram lavadas em tampão 2x, centrifugadas a 1100 x g e acrescidas de tampão MACS. As células foram então colocadas em tubos de vidro específicos para o citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences) e analisadas utilizando o software FlowJo (v10).

#### 2.20 Obtenção das células imunes cardíacas e extração de RNA

A extração de RNA do coração murino foi realizada utilizando o kit de extração NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) e o protocolo seguido conforme manual do fabricante. O tecido homogeneizado foi tratado com  $350\mu$ L de tampão RA1 e  $3,5\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol e submetido à agitação vigorosa em vortex. O lisado foi filtrado com filtros fornecidos pelo kit a partir da centrifugação a 11000 x g por 1min. Após etapas de filtração, tratamento com etanol e tampão MDB, a suspensão foi centrifugada novamente.

Para a digestão do DNA foi preparada uma mistura de 10µL de rDNAse e 90µL de tampão de reação para rDNAse. Após aplicado, a suspensão foi incubada por 15min a temperatura ambiente. Os tubos contendo o RNA foram submetidos a lavagens com diferentes tampões (RAW2 e RA3) fornecidos no kit, e, por fim, o RNA foi suspenso em 60µL de H<sub>2</sub>O livre de RNase para posterior utilização. O RNA foi quantificado utilizando o Nanodrop.

# 2.21 Síntese de cDNA

O processo foi realizado utilizando o kit Quant qScript cDNA Synthesis (Quantabio), de acordo com as instruções do fabricante. Uma reação contendo 1µL de transcriptase reversa, 4µL de tampão 5x, água e RNA (quantificado no nanodrop) foi preparada, totalizando 20µL por amostra. Para a síntese de cDNA foi utilizado o seguinte programa pré-estabelecido no termociclador: (1 ciclo: 22°C, 5min 1 ciclo: 42°C, 30min 1 ciclo: 85°C, 5min 4°C final). O cDNA foi reservado à -20°C.

## 2.22 Análise do perfil de células imunes cardíacas por qPCR

O cDNA foi diluído na proporção 1:2 em H<sub>2</sub>O livre de RNase, sendo  $3\mu$ L do cDNA utilizado por reação. Cada reação de qPCR conteve, além do cDNA, 8,5 $\mu$ L de água, 12,5 $\mu$ L de Sybr e 0,5 $\mu$ L de cada primer *forward* ou *reverse*. Os primers murinos utilizados foram os mesmos marcadores da citometria de fluxo, como descritos na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2 – Lista de primers utilizados para a reação de qPCR

Marcador	Primer FWD	Primer VER
Mouse CD11b	ATGGACGCTGATGGCAATACC	TCCCCATTCACGTCTCCCA
Mouse CD11c	CTGGATAGCCTTTCTTCTGCTG	GCACACTGTGTCCGAACTCA
Mouse MHCII	AGCCCCATCACTGTGGAGT	GATGCCGCTCAACATCTTGC
Mouse CD3	ATGCGGTGGAACACTTTCTGG	GCACGTCAACTCTACACTGGT
Mouse F4/80	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
Mouse Ly6g (Gr-1)	CTTCTCTGATGGATTTTGCGTTG	AGTAGTGGGGCAGATGGGAAG

A placa de 96 poços (Bio-Rad) contendo as reações foi vedada com um filme adesivo do mesmo fabricante e lida no termociclador Bio-Rad CFX96 para posterior obtenção das quantificações.

## 2.23 Histologia do coração

Após a eutanásia dos animais, os corações foram retirados com o auxílio de pinças e tesouras estéreis. Cada coração foi colocado separadamente em tubos cônicos (15mL) previamente identificados contendo 10mL de paraformaldeído 4%. Em

todos os tubos foi adicionada gaze estéril para que o órgão ficasse em contato direto com o paraformaldeído e armazenados a 4ºC até o processamento.

Para o processamento e microscopia, os corações foram cortados verticalmente e inseridos dentro de um cassete nomeado, lavados em água corrente por 10min, seguida de lavagens em álcool 80% por 5min, álcool 95% por 15min e álcool 100% por 15min. Em seguida, os cassetes foram submetidos a lavagem com xilol e álcool etílico absoluto (1:1) por 15min. Foram realizadas mais duas lavagens com xilol durante 15min/cada e dois banhos em parafina, igualmente por 15 min. Por último, foi realizada a inclusão definitiva em parafina e os cortes realizados com o auxílio de um micrótomo. Os cortes foram feitos com a espessura de 5µm e em seguida fixados em lâminas de vidro.

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e Giemsa, visualizadas em microscópio óptico e analisadas utilizando o programa Image-ProPlus.

#### 2.24 Histologia do cérebro

Nos experimentos realizados nos EUA, os cérebros retirados foram seccionados no plano sagital, onde o lado direito foi homogeneizado para contagem de células viáveis e o lado esquerdo foi embebido em solução Tissue Tek OCT (Optimal Cutting Temperature, Sakura Finetek, USA) e armazenado à -80°C até a utilização.

Os blocos de OCT com o tecido cerebral foram submetidos a cortes de 7mm no criostato Leica CM1860 e aderidos à laminas de vidro alcalinas. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), visualizadas em microscópio óptico e analisadas utilizando o programa próprio do microscópio.

#### 2.25 Coloração de Hematoxilina e Eosina no coração

Para realizar a coloração hematoxilina e eosina, utilizamos as lâminas previamente preparadas do coração. As lâminas foram inicialmente colocadas na estufa de 58°C durante 20min. A etapa seguinte foi de desparafinização e hidratação,

passando por etapas de lavagem com diferentes concentrações de xilol, álcool e água. As lâminas foram então coradas com hematoxilina (40min) e eosina (2min) e lavadas novamente com água e diferentes concentrações de álcool. A fixação da lamínula na lâmina foi feita com entellan.

Nas imagens obtidas pelo microscópio os núcleos celulares apresentaram tons de azul ou roxo enquanto o tecido conjuntivo, citoplasma e fibras extracelulares em tons de vermelho ou rosa. No cérebro, poderão ser observadas regiões em tons de roxo que corresponderão às meninges, bem como áreas com infiltração de células imunes.

## 2.26 Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) no cérebro

A coloração de HE padronizada no laboratório da Dra. Doran é similar, contudo não idêntica ao protocolo do LBMFE. Lâminas foram coradas com hematoxilina (1min) e eosina (4min) em diferentes concentrações de álcool e água. A fixação da lamínula na lâmina foi feita com entellan para observação do espessamento da meninge (camada mais externa das imagens) e a presença de infiltrados de células inflamatórias.

## 2.27 Coloração de Giemsa

Para a coloração de Giemsa, as lâminas do coração foram colocadas na estufa a 58°C durante 20min para desparafinização. Após essa etapa, foram realizados banhos com xilol, álcool etílico 100%, água e corante Giemsa por 30min. Em seguida, as lâminas foram lavadas com ácido ácetico, álcool isopropílico e, por fim, a lâmina permanente foi fixada com entellan para visualização em microscópio onde, *S. agalactiae* ficou corado de azul escuro, o tecido em tons de lilás e as hemácias em vermelho.

#### 2.28 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States). Foram realizados testes t para análises entre dois grupos e one-way ANOVA para os demais experimentos, com pósteste Newman-Keuls. A significância foi definida a partir de \*p  $\leq$  0,05. Nos gráficos de UFC/mL dos experimentos realizados durante o doutorado sanduíche, os resultados são apresentados em log10, de acordo com o modelo proposto pela Dra. Doran, com o número de colônias normalizado com o peso do órgão analisado.

## 3 **RESULTADOS**

# 3.1 Identificação do tipo capsular e detecção dos genes da sequência tipo 17 da amostra D01

A identificação do tipo capsular da amostra D01 através da técnica de PCR multiplex demonstrou que a mesma pertence ao tipo III, de acordo com seu polissacarídeo capsular.

O resultado da análise do gene de virulência de *S. agalactiae* através da técnica de PCR convencional demonstrou que a amostra D01 apresenta o gene *hvga* que corresponde à sequência tipo 17 (ST-17), pertencendo ao clone CC17 das amostras hipervirulentas do tipo capsular III.

# 3.2 Ensaios de biofilme das amostras de *S. agalactiae* em meios BHI ou TSB acrescidos ou não com 1% de glicose

As diferentes condições visaram avaliar se há variação na produção de biofilme de acordo com o tipo de meio utilizado e com o acréscimo de 1% de glicose que mimetiza (de acordo com a literatura) um ambiente hiperglicêmico. Os ensaios foram realizados apenas no tempo de 24h.



Figura 7 – Biofilme das amostras de *S. agalactiae* COH1, GBS90356 e D01 em 24h e diferentes condições do meio

Legenda: Formação de biofilme de *S. agalactiae* em quatro condições de meio distintas durante 24h. (A) formação de biofilme em meio BHI; (B) formação de biofilme em meio BHI acrescido com 1% de glicose; (C) formação de biofilme em meio TSB; (D) formação de biofilme em meio TSB acrescido com 1% de glicose. Experimentos realizados em triplicata. \*p≤0,05, \*\*p≤0,005, \*\*\*p≤0,001.

Dentre as condições utilizadas, a única na qual não houve diferença na produção de biofilme entre as amostras e o controle foi em BH1 + 1% de glicose (Figura 7B). Em BHI, a amostra D01 demonstrou ser a maior produtora de biofilme entre as demais (Figura 7A;  $p \le 0,001$ ) e em TSB + 1% de glicose esse padrão se repetiu (Figura 7D;  $p \le 0,001$ ), sendo D01 a maior formadora, seguida da amostra COH1 e GBS90356. Em meio TSB o padrão foi distinto, tendo a amostra COH1 como maior produtora de biofilme entre as demais (Figura 7C;  $p \le 0,001$ ), seguida das amostras D01 e GBS90356 ( $p \le 0,001$ ).

Dados prévios do laboratório já haviam demonstrado que a amostra GBS90356 é fraca produtora de biofilme de acordo com os parâmetros descritos na metodologia. Contudo, a amostra COH1 apresentou fraca produção de biofilme apenas nos meios BHI (DO<sub>492</sub> = 0,15825) e BHI + 1% de glicose (DO<sub>492</sub> = 0,173129), sendo considerada moderada produtora de biofilme em TSB ( $DO_{492} = 0,284113$ ) e TSB + 1% de glicose ( $DO_{492} = 0,206825$ ). Exceto em TSB, a amostra D01 foi considerada moderada produtora de biofilme em todas as condições BHI ( $DO_{492} = 0,271113$ ), BHI + 1% glicose ( $DO_{492} = 0,208317$ ) e TSB + 1% glicose ( $DO_{492} = 0,235463$ ).

Foi realizada também a avaliação do pH antes e depois da produção de biofilme no sobrenadante do biofilme, como demonstrado na Tabela 3.

			pH do	pH do			nH anáo	pH após
Amostra	pH do meio puro TSB	pH do	meio	meio	pH após	pH após	24h de biofilme BHI + 1% glicose	24h de
		meio	puro	puro	24h de	24h de		biofilme
		puro	TSB +	BHI +	biofilme	biofilme		TSB +
		BHI	1%	1%	TSB	BHI		1%
			glicose	glicose				glicose
GBS90356	6	7	6	7	5	5	5	5
COH1	6	7	6	7	5	5	5	5
D01	6	7	6	7	5	5	5	5

Tabela 3 – Alteração do pH dos meios após 24h em placas de biofilme

Legenda: Alteração do pH do meio (em diferentes condições) demonstrando a capacidade de *S. agalactiae*, independente da amostra, alterar condições químicas no biofilme.

# 3.3 Glicemia, peso corporal e taxa de sobrevivência dos animais diabéticos ou não diabéticos infectados com as amostras de *S. agalactiae*

A glicemia de todos os animais do estudo em ambos os modelos intranasal e intraperitoneal foi aferida: (i) antes dos experimentos; (ii) após a indução da diabetes e, (iii) no dia da eutanásia. Todas as aferições foram realizadas após 6h de jejum. A totalidade de animais (machos e fêmeas) utilizada no experimento foi considerada diabética, apresentando dosagem glicêmica acima de 200 mg/dL. Os animais resistentes à insulina foram descartados.



Figura 8 – Glicemia dos animais induzidos à diabetes por estreptozotocina

Legenda: Animais da linhagem CD-1 induzidos à diabetes por estreptozotocina. (A) animais em modelo de infecção intranasal de cinco semanas com a amostra GBS90356; (B) animais em modelo de infecção intraperitoneal de cinco dias com a amostra COH1; (C) animais em modelo de infecção intraperitoneal de cinco dias com a amostra GBS90356. PN = pós natal.

A aferição do peso dos animais utilizados no experimento demonstrou diferenças entre os diferentes modelos. Para os animais inoculados via intranasal, no modelo de cinco semanas, houve uma redução no peso corporal significativa nos grupos infectados, diabéticos ou não (Figura 9A). Nos animais inoculados via intraperitoneal, no modelo de cinco dias, não houve diferença estatística entre os grupos, como demonstrado na figura 9B e 9C.



Figura 9 – Peso corporal dos animais ao final do experimento

Legenda: Peso corporal dos animais utilizados ao final do experimento. (A) modelo de infecção intranasal, apresentando uma diferença significativa entre os animais infectados, diabéticos ou não, com a amostra GBS90356 em comparação aos animais não infectados, diabéticos ou não; (B) modelo de infecção intraperitoneal com a amostra GBS90356, onde não houve alteração no peso corporal estatisticamente relevante; (C) modelo de infecção intraperitoneal com a amostra GBS90356 no peso corporal estatisticamente relevante; intraperitoneal com a amostra COH1, onde não houve alteração no peso corporal estatisticamente relevante; estatisticamente relevante; estatisticamente relevante. \*p≤0,05, \*\*p≤0,01

Os dados relacionados à taxa de sobrevivência correspondem apenas ao modelo de infecção intraperitoneal, pois na via intranasal não houveram perdas em decorrência da infecção.

Figura 10 – Percentual de sobrevivência dos animais inoculados com amostras hipervirulentas GBS90356 e COH1



Legenda: Percentual de sobrevivência dos animais diabéticos ou não diabéticos com amostras hipervirulentas de *S. agalactiae.* (A) animais infectados com a amostra GBS90356; (B) animais infectados com a amostra COH1.

# 3.4 Contagem de unidades formadoras de colônia nos órgãos alvo dos animais infectados por 5 semanas via intranasal

A inoculação da amostra GBS90356 realizada por via intranasal obteve sucesso e em todos os animais infectados houve crescimento bacteriano em diferentes órgãos. As contagens de UFC/mL provenientes dos macerados do coração, cérebro, fígado, pulmão e sangue foram realizadas para determinar a efetividade da infecção intranasal e a capacidade de disseminação através da corrente sanguínea (Figura 11).

Não houve crescimento bacteriano nos grupos controle e diabético não infectado. No cérebro (Figura 11A) não houve diferença significativa entre os dois grupos, não diabético infectado e diabético infectado. Contudo, no pulmão (Figura 11B) foi observado um número de colônias significativamente maior em animais diabéticos (~9x104 UFC/mL, p≤0,05) quando comparamos com os animais não diabéticos infectados (~1x103 UFC/mL). Podemos observar o mesmo no sangue coletado (Figura 11C) com o grupo diabético infectado (~5x10<sup>3</sup> UFC/mL, p≤0,05) apresentando crescimento superior ao grupo não diabético infectado (~1x10<sup>3</sup> UFC/mL).

O mesmo ainda ocorreu no coração (Figura 11D), onde houve maior crescimento bacteriano no grupo diabético infectado (~1,5x10<sup>3</sup> UFC/mL) quando

comparado ao grupo não diabético infectado (~5x10<sup>2</sup> UFC/mL) e no fígado (Figura 11E) onde o grupo diabético infectado (~1,5x10<sup>3</sup> UFC/mL) apresentou crescimento superior quando comparado ao grupo não diabético infectado (~1x10<sup>3</sup> UFC/mL). Os dados confirmam que em cinco semanas de infecção os animais já apresentam disseminação em vários órgãos. Os experimentos descritos foram realizados em triplicata.





Legenda: Unidades formadoras de colônia (UFC/mL) em animais diabéticos e não diabéticos infectados com amostra hipervirulenta de *S. agalactiae* GBS90356 por 5 semanas via intranasal. (A) contagem de UFC/mL no cérebro de camundongos CD-1, sem diferença estatística entre diabéticos e não-diabéticos; (B) contagem de UFC/mL no pulmão de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (C) contagem de UFC/mL no sangue de camundongos CD-1, apresentando maior número de UFC/mL no coração de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (D) contagem de UFC/mL no coração de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (P) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (P) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em animais diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando

# 3.5 Contagem de unidades formadoras de colônia nos órgãos alvo dos animais infectados por 5 dias via intraperitoneal

A via de inoculação escolhida, intraperitoneal, apresentou o mesmo sucesso na infecção. Contudo, o tempo de infecção, a letalidade e o curso das doenças ocasionadas por *S. agalactiae* foi mais rápido, tornando o modelo mais próximo de uma infecção aguda.

As contagens de UFC/mL provenientes da infecção realizada com ambas as amostras COH1 e GBS90356 em órgãos-alvo (coração, cérebro, fígado, pulmão e sangue) foram realizadas para determinar a efetividade da infecção e a capacidade de disseminação através da corrente sanguínea (Figura 12). Não houve crescimento bacteriano nos grupos controle e diabético não infectado.

Figura 12 – Contagem de unidades formadoras de colônias nos órgãos-alvo em animais diabéticos ou não diabéticos infectados com a amostra GBS90356



Legenda: Unidades formadoras de colônia (UFC/mL) em animais diabéticos e não diabéticos infectados com amostra hipervirulenta de *S. agalactiae* GBS90356 por 5 dias via intraperitoneal. (A) contagem de UFC/mL no cérebro de camundongos CD-1 (B) contagem de UFC/mL no pulmão de camundongos CD-1; (C) contagem de UFC/mL no sangue de camundongos CD-1; (D) contagem de UFC/mL no coração de camundongos CD-1; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1. Resultados apresentados em log10, de acordo com o modelo proposto pela Dra. Doran, com o número de colônias normalizado com o peso do órgão analisado.

Apesar de uma tendência em órgãos como coração (Figura 12D) e no sangue (Figura 12C) de um número maior de colônias nos animais diabéticos, não houve diferença significativa (p≤0,05) quando comparados entre animais não diabéticos e animais diabéticos. Contudo, podemos comprovar a habilidade da amostra GBS90356 em disseminar e ultrapassar a barreira hematoencefálica após cinco dias de infecção.



Figura 13 - Contagem de unidades formadoras de colônias nos órgãos-alvo em animais diabéticos ou não diabéticos infectados com a amostra COH1

Legenda: Unidades formadoras de colônia (UFC/mL) em animais diabéticos e não diabéticos infectados com amostra hipervirulenta de *S. agalactiae* COH1 por 5 dias via intraperitoneal. (A) contagem de UFC/mL no cérebro de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em diabéticos quando comparados aos não-diabéticos; (B) contagem de UFC/mL no pulmão de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em diabéticos quando comparados; (C) contagem de UFC/mL no sangue de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em diabéticos; (D) contagem de UFC/mL no sangue de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em diabéticos; (D) contagem de UFC/mL no coração de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em diabéticos quando comparados aos não-diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em diabéticos quando comparados aos não-diabéticos; (E) contagem de UFC/mL no fígado de camundongos CD-1, apresentando maior número de colônias em diabéticos quando comparados aos não-diabéticos. Resultados apresentados em log10, de acordo com o modelo proposto pela Dra. Doran, com o número de colônias normalizado com o peso do órgão analisado. \*\*\*p≤0,001, \*p≤0,05.

Em relação à infecção intraperitoneal com a amostra de *S. agalactiae* COH1, houve uma diferença estatística considerável em todos os órgãos analisados e no sangue dos animais diabéticos quando comparados aos animais não-diabéticos. Isso demonstra a maior susceptibilidade desse grupo a infecções agudas, desencadeando possíveis doenças associadas à condição crônica da diabetes e tornando o grupo ainda mais debilitado. Essa amostra foi, assim como a GBS90356, capaz de disseminar em todos os órgãos analisados após cinco dias de infecção.

# 3.6 Percentual de sobrevivência bacteriana e contagem de unidades formadoras de colônia nos swabs e em órgãos-alvo dos animais infectados em competição via vaginal

No modelo de infecção vaginal, a inoculação foi realizada em modelo de competição, como mencionado na metodologia. Esse modelo visa demonstrar se em condições de competição entre a amostra WT e a amostra mutante existem diferenças na persistência bacteriana na vagina, além da capacidade de ascensão aos demais órgãos do trato vaginal.

Na primeira interação realizada com as amostras NCTC 10/84 e NCTC 10/84 $\Delta$ essC em animais CD1 o padrão esperado foi obtido, demonstrando que o gene *essC* é necessário para melhor persistência da amostra na vagina (Figura 14 A e B), além de estar correlacionado com a capacidade de ascensão aos demais órgãos do trato vaginal (cólo do útero e útero), sendo superior na amostra que possui o gene *essC* (Figura 14 C, D e E).





Legenda: Persistência bacteriana e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) em animais infectados via vaginal com as amostras NCTC 10/84 e NCTC 10/84∆essC em modelo de competição. (A) contagem de UFC/mL obtidos de swabs vaginais durante o período da infecção; (B) percentual de sobrevivência bacteriana durante o experimento, demonstrando que a amostra NCTC 10/84∆essC teve menor capacidade de se manter viável na vagina dos animais; (C) contagem de UFC/mL na vagina de animais CD-1; (D) contagem de UFC/mL no útero de animais CD-1, apresentando diferença significativa entre a amostra mutante e a amostra WT; (E) contagem de UFC/mL no útero de animais CD-1, apresentando diferença significativa entre a amostra mutante e a amostra WT; (E) contagem de UFC/mL no útero de animais CD-1, apresentando diferença significativa entre a amostra mutante e a amostra WT; (E) contagem de UFC/mL no útero de animais CD-1, apresentando diferença significativa entre a amostra mutante e a amostra WT; (E) contagem de UFC/mL no útero de animais CD-1, apresentando diferença significativa entre a amostra mutante e a amostra WT; \*p≤0,05.

Ao realizar a interação utilizando o mesmo modelo com a amostra CJBIII/CJBIIIΔessC em animais C57BL/6 fomos surpreendidos com uma colonização que persistiu por mais de 138 dias (Figura 15 A e B). Essa foi a primeira amostra em modelo de colonização vaginal apresentando esses resultados. Os intervalos não foram fielmente apresentados nos gráficos para facilitar a leitura dos mesmos. Dessa forma, esses animais continuaram sendo submetidos aos *swabs* vaginais para contagem de colônias viáveis pelo grupo da Dra. Doran. Mesmo após mais de 200 dias de infecção, houveram células bacterianas viáveis nos órgãos do trato vaginal (dados não apresentados).

Figura 15 - Persistência bacteriana e contagem de unidades formadoras de colônia em animais infectados com as amostras CJB III e CJB III∆essC



Legenda: Persistência bacteriana e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) em animais infectados via vaginal com as amostras CJBIII e CJBIII∆essC em modelo de competição. (A) contagem de UFC/mL obtidos de *swabs* vaginais durante o período da infecção; (B) percentual de sobrevivência bacteriana durante o experimento, que não foi finalizado no meu período de doutorado sanduíche.

# 3.7 Contagem de unidades formadoras de colônia em órgãos alvo dos animais infectados por 72h via caudal

Em paralelo aos experimentos realizados com a via de infecção vaginal, foram realizados experimentos visando estudar o desenvolvimento de meningite causada por *S. agalactiae* em camundongos machos CD1. Contudo, apenas parte dos dados

serão apresentados em minha tese, porém estão disponíveis de forma mais completa no paper publicado em colaboração com o nosso laboratório (Spencer et al., 2021). Nos tecidos coletados, não houve diferença significativa entre CJBIII e CJBIII∆essC no pulmão, sugerindo que a via utilizada causou unicamente meningite nos animais e não infecções generalizadas.

A amostra CJBIII foi capaz de causar doença após 72h de infecção e apresentou elevado número de colônias viáveis no cérebro, indicando o desenvolvimento de meningite causado por *S. agalactiae*. A terceira confirmação a partir desses dados foi um número reduzido da bactéria no sangue dos animais infectados com CJBIII quando comparados aos infectados com a mutante, comprovando a necessidade da presença do gene *essC* para que a bactéria atravesse a barreira hematoencefálica.





Legenda: Camundongos CD-1 machos infectados com as amostras CJBIII ou CJBIII∆essC via caudal por até 72h. (A) contagem de UFC/mL no pulmão; (B) contagem de UFC/mL no cérebro, apresentando maior número de células bacterianas viáveis nos animais infectados com a amostra WT; (C) contagem de UFC/mL no sangue, apresentando maior número de células bacterianas viáveis nos animais infectados com a amostra mutante. \*\*\*p≤0,001.
# 3.8 Ensaios de interação com macrófagos obtidos do lavado bronqueoalveolar de animais diabéticos ou não diabéticos, infectados ou não com amostra de S. agalactiae

O ensaio experimental de interação da amostra de *S. agalactiae* GBS90356 foi realizado em modelo murino, visando quantificar a capacidade de invasão e viabilidade da bactéria em macrófagos pulmonares após cinco semanas de infecção. Macrófagos obtidos do lavado bronqueoalveolar dos animais diabéticos infectados apresentaram um número estatisticamente maior de bactérias (~1,5x10<sup>5</sup> UFC/mL) quando comparados ao grupo não diabético infectado (~3x10<sup>4</sup> UFC/mL) (Figura 17).





Legenda: Ensaio de viabilidade de *S. agalactiae* em macrófagos bronqueoalveolares após cinco semanas de infecção em modelo murino diabético. \*P<0,05.

Foi realizado também ensaio de interação com os macrófagos obtidos dos animais controle (Figura 18). Os dados mostraram a capacidade do patógeno de se manter viável dentro dos macrófagos, mesmo após 1h e 2h de interação.

Figura 18 - Ensaio de interação da amostra GBS90356 com macrófagos obtidos do lavado bronqueoalveolar de animais controle



Legenda: Ensaio de interação *in vitro* de macrófagos obtidos do lavado bronqueoalveolar de camundongos CD1 com a amostra de *S. agalactiae* GBS90356. Nos tempos 0 e 30 min não houve crescimento bacteriano.

## 3.9 Perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias pulmonares e cardíacas de animais diabéticos ou não diabéticos, infectados ou não com amostras de *S. agalactiae*

Para avaliar o perfil imunológico dos animais diabéticos ou não infectados com as amostras de *S. agalactiae* COH1 e GBS90356 durante cinco dias de infecção, foram realizados ensaios de ELISA para citocinas pró inflamatórias KC/CXCL-1 e IL-1β. Ambas as citocinas foram escolhidas por serem importantes marcadores do desenvolvimento de doenças invasivas causadas por *S. agalactiae* como a meningite, por estarem relacionadas com o recrutamento e presença de células imunes importantes na inflamação, como neutrófilos e macrófagos.

Com a dose escolhida para inoculação desses animais, podemos observar nos gráficos a seguir que tanto nos pulmões quanto no coração de animais diabéticos infectados por COH1, os níveis da proteína KC foram superiores aos animais nãodiabéticos. Em relação a IL-1β, a diferença foi vista apenas no pulmão dos animais diabéticos (Figura 19 A, B, C e D).





Legenda: Níveis de citocinas pró-inflamatórias KC/CXCL-1 e IL-1β nos animais diabéticos e não diabéticos infectados via IP ou não com a amostra de *S.agalactiae* COH1 por 5 dias. (A) Expressão da citocina KC/CXCL-1 no coração de animais CD-1 em quatro diferentes grupos experimentais, onde o grupo diabético infectado apresentou maior expressão quando comparado aos demais; (B) Expressão da citocina KC/CXCL-1 no pulmão de animais CD-1 em quatro diferentes grupos experimentais, onde o grupo sexperimentais, onde o grupo diabético infectado apresentou maior expressão quando comparado aos demais; (C) Expressão da citocina IL-1β no coração de animais CD-1 em quatro diferentes grupos experimentais, onde o grupo diabético infectado apresentou maior expressão quando comparado aos demais; (C) Expressão da citocina IL-1β no coração de animais CD-1 em quatro diferentes grupos experimentais, onde o grupo diabético infectado apresentou maior expressão quando comparado aos demais; (D) Expressão da citocina IL-1β no coração de animais CD-1 em quatro diferentes grupos experimentais, onde o grupo diabético infectado apresentou maior expressão quando comparado aos demais; (D) Expressão da citocina IL-1β no pulmão de animais CD-1 em quatro diferentes grupos experimentais, onde não houve diferença significativa entre eles. \*p≤0,05, \*\*\*p≤0,001.

Contudo, para a amostra GBS90356 não houve diferença na expressão da proteína KC/CXCL-1 nos pulmões e também nos corações entre animais diabéticos e não diabéticos infectados com a bactéria. Os níveis foram maiores apenas quando comparados aos grupos não infectados. Da mesma forma, não foi significativa a diferença da citocina IL-1β entre os grupos infectados. Apesar de não ser significativa, houve uma tendência de expressão que, com um número maior de amostras (n), poderia tornar o grupo diabético significativo estatisticamente. Novos experimentos serão realizados a partir do recebimento de mais animais, visando aumentar o n experimental e verificar se a partir disso, os resultados serão mais expressivos.

Figura 20 - Perfil de expressão das citocinas pró-inflamatórias KC/CXCL-1 e IL-1β no coração e pulmão dos animais diabéticos e não diabéticos infectados com a amostra GBS90356



Legenda: Níveis de citocinas pró-inflamatórias KC/CXCL-1 e IL-1β nos animais diabéticos e não diabéticos infectados via IP ou não com a amostra de *S.agalactiae* GBS90356 por 5 dias. (A) Expressão da citocina KC/CXCL-1 no coração de animais CD-1 em quatro diferentes grupos experimentais, onde os grupos infectados apresentaram maior expressão quando comparado aos não-infectados; (B) Expressão da citocina KC/CXCL-1 no pulmão de animais CD-1 em quatro diferentes grupos experimentais, onde os grupos infectados; (C) Expressão da citocina IL-1β no coração de animais CD-1 em quatro diferentes grupos experimentais, onde os grupos experimentais, não houve diferença significativa entre os grupos; (D) Expressão da citocina IL-1β no pulmão de animais CD-1 em quatro diferentes grupos experimentais, onde não houve diferença significativa entre eles. \*\*\*p≤0,001.

## 3.10 Perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-17 e IL-23 no trato vaginal de animais CD-1 infectados com as amostras CJB III e CJB III∆essC

Para analisar o perfil inflamatório foram escolhidas duas citocinas próinflamatórias que possuem relevância em infecções bacterianas: IL-17 e IL-23. Ambas as citocinas foram quantificadas através de ensaios com kits de ELISA específicos para cada uma como descritos na metodologia. Não foram observadas diferenças significativas entre IL-17 ou IL-23 na amostra CJBIII ou CJBIII∆*essC* em nenhum dos tecidos analisados (Figura 23).





Legenda: Expressão da citocina IL-17 nos tecidos do trato vaginal de animais CD-1 infectados com a amostra de *S. agalactiae* CJBIII e CJBIII∆essC. (A) quantificação de IL-17 na vagina; (B) quantificação de IL-17 no cólo do útero; (C) quantificação de IL-17 no útero. p<0,0805





Legenda: Expressão da citocina IL-23 nos tecidos do trato vaginal de animais CD-1 infectados com a amostra de *S. agalactiae* CJBIII e CJBIII∆essC. (A) quantificação de IL-23 na vagina; (B) quantificação de IL-23 no cólo do útero; (C) quantificação de IL-23 no útero. \*p≤0,05

Em animais CD-1 infectados com as amostras de NCTC 10/84 e NCTC 10/84∆essC a dosagem de citocinas foi realizada somente para IL-17 por falta de tecido reservado para realizar as demais (Figura 24). Contudo, as análises para as demais citocinas encontram-se em andamento.

Figura 23 - Perfil de expressão da citocina pró-inflamatória IL-17 em animais CD-1 infectados com as amostras NCTC 10/84 e NCTC 10/84∆essC



Legenda: Expressão da citocina IL-17 nos tecidos do trato vaginal de animais CD-1 infectados com a amostra de *S. agalactiae* NCTC 10/84 e NCTC 10/84∆essC. (A) quantificação de IL-17 na vagina; (B) quantificação de IL-17 no cólo do útero. p<0,1850.

# 3.11 Perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1β e KC/CXCL-1 no cérebro de animais CD-1 infectados com as amostras CJB III e CJB III∆essC

A proteína KC, em humanos conhecida como CXCL-1, é uma quimiocina responsável por atrair neutrófilos para o sítio de infecção. Também atua na regulação imune e nas respostas inflamatórias. A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-infamatória que modula tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa.

Após a quantificação por ELISA, a proteína KC foi detectada em maior concentração nos animais infectados com a amostra WT em comparação à mutante  $\Delta essC$  (p≤0,05). Contudo, não houve diferença significativa nos níveis de IL-1 $\beta$  entre os grupos.





Legenda: Expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido cerebral de animais CD-1 infectados com a amostra de *S. agalactiae* CJBIII e CJBIII $\Delta$ essC. (A) quantificação de proteína KC/CXCL-1 no cérebro, apresentando um aumento significativo na amostra WT comparado com a amostra mutante para gene *essC*; (B) quantificação de IL-1 $\beta$  no cérebro, sem diferença significativa entre os grupos. \*p≤0,05.

## 3.12 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) expressas no lavado bronqueoalveolar

Após a eutanásia e obtenção do lavado bronqueoalveolar dos animais, foi realizada a quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio em três diferentes tempos (0, 30 e 60min). Os grupos apresentaram maior produção de EROs comparados ao controle (não diabético não infectado), sendo o grupo diabético infectado com maior produção de EROs em relação aos demais grupos (Figura 25).



Figura 25 – Produção de espécies reativas de oxigênio nos animais diabéticos e não diabéticos infectados com amostra hipervirulenta de *S. agalactiae* 

Legenda: Dosagem de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células pulmonares dos animais controle, infectados, diabéticos e diabéticos infectados com a amostra de *S. agalactiae* GBS90356. A EROs intracelular foi mensurada a partir de amostras obtidas do lavado bronqueoalveolar de camundongos CD1, utilizando a sonda fluorescente H2DCFDA. (a) Detecção do EROs intracelular no tempo 0; (b) Detecção do ROS intracelular após 30 min; (c) Detecção do ROS intracelular após 1h. \* indica aumento de EROs quando comparado ao grupo controle; # indica aumento de ROS quando comparado ao grupo diabético. \*p vs controle ≤0,05; # p vs DI ≤0,05.

#### 3.13 Perfil de células imunes pulmonares por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para análise de células imunes pulmonares e o RT-qPCR para análise das células imunes cardíacas, pois não foi encontrado um kit de dissociação química compatível com esse tecido. Como mencionado na metodologia, o painel de marcadores das células imunes utilizado foi o mesmo para ambas as técnicas.

Numa análise geral, englobando todos os grupos celulares analisados, não houveram diferenças significativas entre as populações de células T, células dendríticas e neutrófilos. Contudo, houveram algumas diferenças na população de macrófagos entre os grupos. Observando os números absolutos de macrófagos no pulmão foi verificado que os grupos diabéticos apresentaram um maior número de células do que os grupos não diabéticos em geral ( $p \le 0,0171$ ). Numa segunda análise, os grupos apresentando o maior número de macrófagos foram os diabéticos infectados com a amostra COH1 e com a amostra GBS90356 geral ( $p \le 0,0394$ ).

Figura 26 – Presença de macrófagos no pulmão de animais diabéticos ou não diabéticos infectados com as amostras de S. agalactiae GBS90356 e COH1



Legenda: Número de macrófagos viáveis encontrados no pulmão de animais diabéticos ou não diabéticos infectados com as amostras de *S. agalactiae* GBS90356 e COH1 no modelo de cinco dias. Cada ponto no gráfico representa um animal. \*p≤0,05

#### 3.14 Perfil de células imunes cardíacas por RT-qPCR

Como mencionado anteriormente, as populações de células imunes no coração foram analisadas utilizando marcadores para macrófagos, neutrófilos, células T e células dendríticas a partir da técnica de RT-qPCR.

Nos animais infectados com a amostra GBS90356, os genes marcadores de células T (CD3, p≤0,05), macrófagos (CD11b, p≤0,001; F4/80, p≤0,001) e neutrófilos (CD11b, p≤0,001; Ly6G, p≤0,001) foram altamente expressos nos animais diabéticos. Apesar de não infectado, o grupo diabético não-infectado (DNI) também apresentou níveis considerados dos marcadores, porém em níveis abaixo dos animais DI (Figura 27).



Figura 27 – Marcadores de células imunes encontrados nos animais diabéticos ou não diabéticos infectados com a amostra de *S. agalactiae* GBS90356

Legenda: Quantificação dos genes marcadores de células imunes caracterizando a população de células encontrada no coração de animais diabéticos ou não diabéticos infectados com a amostra GBS90356 durante 5 dias. Neutrófilos (CD11b, Ly6G), macrófagos (CD11b, F4/80), células dendríticas (CD11c, MHC Class II) e células T (CD3). \*p≤0,05; \*\*p≤0,01; \*\*\*p≤0,001.

Nos animais infectados com a amostra COH1 o padrão foi similar com a presença mais evidente de marcadores para macrófagos (CD11b, p≤0,001; F4/80, p≤0,001) e neutrófilos (CD11b, p≤0,001; Ly6G, p≤0,001) em animais diabéticos infectados. Os animais não diabéticos infectados (NDI) apresentaram elevado número de marcadores de células dendríticas (CD11c, p≤0,01; MHC Class II, p≤0,01) e células T (CD3, p≤0,01) quando comparados aos animais diabéticos infectados (Figura 28).





Legenda: Quantificação dos genes marcadores de células imunes caracterizando a população de células encontrada no coração de animais diabéticos ou não diabéticos infectados com a amostra COH1 durante 5 dias. Neutrófilos (CD11b, Ly6G), macrófagos (CD11b, F4/80), células dendríticas (CD11c, MHC Class II) e células T (CD3). \*p≤0,05; \*\*p≤0,001; \*\*\*p≤0,001.

## 3.15 Imagens histológicas cardíacas coradas com hematoxolina e eosina e Giemsa

A coloração por hematoxilina e eosina (HE) permite a obtenção de uma visão geral do órgão estudado, ressaltando estruturas como a disposição das fibras musculares cardíacas (miocárdio), organização da serosa (pericárdio), revestimento interno das câmaras (endocárdio), ventrículos, veias, artérias e válvulas.

Nas imagens obtidas após coloração por HE, a válvula cardíaca do grupo controle (não diabético e não infectado) não apresentou nenhum tipo de obstrução, havendo apenas um baixo número de hemácias junto às extremidades. No grupo diabético infectado foi verificado um grande extravasamento de hemácias com a presença de infiltrados de células imunes, indicando uma região de alta inflamação. As imagens dos grupos diabético não infectado (DNI) e diabético infectado (NDI) apresentaram problemas, e por isso não foram inseridas.

Figura 29 – Lâminas histológicas cardíacas e lesões teciduais causadas por amostra de *S. agalactiae* GBS90356 coradas com hematoxilina e eosina



Legenda: (A) Válvula do ventrículo direito do grupo controle, sem obstrução e com baixa quantidade de células sanguíneas próximas às suas extremidades (seta); (B) Válvula do ventrículo direito do grupo diabético infectado com número elevado de hemácias extravasadas (marcação vermelho escura com asteristico) e infiltrados de células inflamatórias ao redor (seta). Aumento de 10x; (C) Aumento de uma das regiões de infiltração de células inflamatórias do grupo diabético infectado (círculo). Aumento de 100x.

Na busca de indícios de endocardite nos animais estudados, nosso foco foi analisar a presença de infecção bacteriana na superfície endotelial valvular, além de extravasamento de hemácias e infiltrado de células imunes. A coloração de Giemsa é altamente utilizada para diagnóstico histopatológico de parasitas e bactérias, como *S. agalactiae*.

Nas imagens histológicas coradas com Giemsa, foi possível observar novamente a válvula do animal não-diabético não-infectado (NDNI) completamente desobstruída. Contudo, sinais inflamatórios moderados foram verificados nos animais não diabéticos infectados (NDI, Figura 30B) e um leve extravasamento de hemácias nos animais diabéticos não infectados (DNI, Figura 30C). Os animais diabéticos infectados (DI) com a amostra GBS90356 houve um infiltrado de células imunes, além de extravasamento de hemácias causando obstrução valvular (Figura 30D e E).

Figura 30 - Lâminas histológicas cardíacas e lesões teciduais causadas por amostra de *S. agalactiae* GBS90356 coradas com Giemsa



Legenda: (A) Válvula do ventrículo direito do grupo controle (NDNI), sem apresentar obstrução; (B) Válvula do ventrículo direito do grupo não diabético infectado (NDI) com a amostra GBS90356, apresentando leve obstrução por hemácias e sem danos teciduais aparentes; (C) Válvula do ventrículo direito do grupo diabético não infectado (DNI), apresentando baixo número de hemácias; (D) Válvula do ventrículo direito do grupo diabético infectado, com número elevado de hemácias extravasadas e infiltrados de células inflamatórias ao redor (seta), além de células disformes. Figuras A, B e D: 50µm, Figura C: 20µm.

#### 3.16 Imagens histológicas cerebrais coradas com Hematoxolina e Eosina

Com a segunda parte do cérebro dos animais, foram realizadas colorações histológicas com hematoxilina e eosina (HE) visando quantificar a espessura da meninge. Infiltrados inflamatórios em resposta a infecções na meninge aumentam a espessura dessa região.

Como podemos observar na imagem, houve diferença significativa (quantificação realizada utilizando o software Image J) entre os dois grupos. Os animais infectados com a amostra CJBIII apresentaram aumento na espessura da meninge e pontos claros de infiltrados de células imunes quando comparados às amostras infectadas com a mutante CJBIII∆*essC* (Figura 26).

Figura 31 – Lâminas histológicas cerebrais e espessamento da meninge causada pela amostra de *S. agalactiae* CJBIII coradas com HE



Legenda: Imagens histológicas obtidas do cérebro de animais CD-1 submetidos à infecção caudal com as amostras CJBIII ou CJBIII*ΔessC* e quantificação do espessamento da meninge.

#### 4 DISCUSSÃO

Doenças invasivas causadas por *S. agalactiae* são responsáveis por levar não só neonatos e mulheres grávidas ao desenvolvimento de doenças graves e a óbito, como também elevar a taxa de morbidade e mortalidade em adultos imunocomprometidos (Schrag et al., 2000; Skoff et al., 2009). A necessidade de uma maior compreensão dos mecanismos de virulência, principalmente em grupos mais susceptíveis como pacientes diabéticos, vem sendo cada vez mais discutida (Batista, Ferreira, 2015; Vasikasin, Changpradu, 2021; Nguyen et al., 2021). São escassos os estudos que correlacionem a infecção por *S. agalactiae* em pacientes diabéticos, apesar de ser a doença mais comum associada à presença desse patógeno (Arias et al., 2022). Por isso, esse estudo buscou caracterizar um sistema de secreção até então inédito em *S. agalactiae*, e utilizar amostras hipervirulentas do patógeno para compreender o desenvolvimento de doenças infecciosas como endocardite e pneumonia em condições hiperglicêmicas *in vivo* e *in vitro*, mimetizando a diabetes.

Amostras de *S. agalactiae* pertencentes a diferentes tipos capsulares previamente caracterizadas e estabelecidas em estudos prévios e uma amostra obtida de um paciente diabético com infecção no trato urinário (ITU) causada por esse microrganismo, a D01, foram utilizadas neste trabalho. A amostra D01 levou a paciente a um quadro de ITU grave, necessitando de longo período de internação. Ao realizar a tipagem capsular, a amostra D01 foi identificada como pertencente ao tipo III e apresentando o gene *hvgA*, indicando o potencial hipervirulento da amostra bacteriana.

A amostra GBS90356, de uso padrão em nosso laboratório, foi utilizada como um dos comparativos para a caracterização da D01. Estudos publicados pelo nosso grupo foram responsáveis pelo sequenciamento genômico dessa amostra, sendo a primeira descrita no Brasil como pertencente ao tipo capsular III e ST-17 (Lannes-Costa, 2020). De acordo com Hsu e colaboradores (2021), a ST-17 caracteriza amostras mais virulentas da espécie, associadas a elevados quadros de meningite neonatal com alta morbidade e mortalidade, além de ser reconhecida como ST de rápida disseminação mundial.

Como mencionado anteriormente, a formação de comunidades de biofilmes facilita a sobrevivência e proliferação microbiana, aumentando a resistência às

defesas do hospedeiro e à privação de nutrientes. A colonização e infecção de *S. agalactiae* em tecidos-alvo requer a capacidade dessas bactérias de aderir e persistir na mucosa e em superfícies epiteliais (Rosini e Margarit, 2015). Os resultados dos ensaios de biofilme no presente trabalho, demonstrou que as três amostras de tipo capsular III (ST-17) apresentaram capacidade de produção de biofilme de forma heterogênea. Dentre todas as condições testadas, a amostra D01 foi a única média produtora de biofilme nos meios de cultura BHI, BHI +1% de glicose e TSB +1% de glicose. A amostra COH1 foi considerada média produtora apenas nos meios TSB e TSB + 1% de glicose e a amostra GBS90356, baixa formadora de biofilme em todas as condições como verificado anteriormente pelos estudos do nosso grupo (Sanches, 2018).

Estudos publicados anteriormente com a amostra COH1, o acréscimo de 1% de glicose ao meio tornou a produção de biofilme 2 a 4 vezes maior do que em meio TSB puro (Rinaldo et al., 2010; D'Urzo et al., 2014). Em nosso estudo, o acréscimo de glicose não foi capaz de aumentar a produção de biofilme quando comparado ao meio puro para as amostras GBS90356 e COH1 em nenhum dos meios de cultivo testados. Para a amostra D01, houve diferença no crescimento entre o meio TSB e TSB acrescido de glicose, sendo esse mais favorável para a formação do biofilme.

O aumento de pH pode beneficiar ou ser deletério para os microrganismos durante a produção de biofilme. De acordo com Ratzke e Gore (2018), bactérias testadas em meios com 1% de glicose promoveram maior redução do pH do meio. As espécies *Lactobacillus plantarum* e *Pseudomonas veronii* tornaram o pH mais ácido, aumentando o crescimento bacteriano. Em todas as condições testadas, no presente trabalho, as amostras COH1, GBS90356 e D01 reduziram o pH do meio e isso pode contribuído, em parte, para a produção do biofilme como mencionado em outros trabalhos (Borges et al., 2012; Yang et al., 2012; D'Urzo et al., 2014; Dilrukshi et al., 2021). Trabalhos utilizando amostras de *Streptococcus pyogenes* mostraram o efeito do aumento do biofilme com acréscimo de glicose, promovenso resultado direto da acidificação devido à produção metabólica de ácidos orgânicos (Manetti et al., 2010). Contudo, a alteração no pH e a relação com a maior formação de biofilme pode variar de acordo com o meio de cultivo testado. Ho et al. (2013) demonstraram que o baixo pH induziu a produção de biofilme em meio quimicamente definido limitado por nutrientes (M9YE), porém não em meios ricos como THB.

Diabetes mellitus (DM) é provavelmente uma das doenças mais antigas conhecidas pelo ser humano (Olokoba, Olusegun, Olokoba, 2012). Estima-se que 366 milhões de pessoas tiveram DM em 2011; e que até 2030 esse número pode evoluir para 552 milhões (International Diabetes Federation, 2011). Dados preocupantes apontam que 80% dos pacientes com DM vivem em países de baixa e média renda (Olokoba, Olusegun, Olokoba, 2012). A resistência à insulina, uma das características principais em condições de diabetes, está associada com o aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas invasivas (Lin et al., 2011; Mook et al., 2011; Thomsen et al., 2011, Kenzel et al., 2012). Contudo, poucos são os trabalhos de interações entre S. agalactiae e modelos diabéticos. Além disso, boa parte das publicações utiliza exclusivamente o modelo de úlcera na epiderme, o que restringe os estudos a apenas uma via de infecção. Edwards e Fusilier, em 1982, publicaram o primeiro trabalho utilizando animais induzidos à diabetes utilizando a droga estreptozotocina (STZ) e infecção por S. agalactiae, levando os animais a uma infecção generalizada. Os experimentos iniciais realizados por eles demonstraram que amostras do tipo capsular II tiveram a virulência aumentada em animais diabéticos, o que também já havia sido visualizado no mesmo modelo com Pseudomonas aeruginosa (Itahara et al., 1980).

Trabalhos mais recentes, como o levantamento epidemiológico e de susceptibilidade aos antimicrobianos realizado com pacientes diabéticos infectados com *S. agalactiae* no Egito (Abd-ElAleem et al., 2021), ou como o estudo de caso em paciente com meningite e associação com de otite causada pelo patógeno (Villareal, Goslin, Bajracharya, 2021) trazem dados importantes para a melhor compreensão da associação entre diabetes e infecções bacterianas. Contudo, essas publicações não explicam o desenvolvimento das doenças associadas como pneumonia, sepse, endocardite, entre outras. Além disso, não caracterizaram as condições inflamatórias exacerbadas pela presença do microrganismo e quais os reflexos clínicos em um modelo murino de diabetes.

Os animais utilizados em nosso modelo de diabetes induzido por STZ foram submetidos a pesagem corporal e dosagem glicêmica durante os experimentos, visando confirmar o fenótipo esperado em condições hiperglicêmicas. A diabetes foi confirmada em todos os modelos, mesmo em diferentes tempos de infecção. Uma perda dramática de peso pode ser indício e sinalizar o surgimento da diabetes (Diabetes & Endocrinology, 2022). Em diabéticos a perda de massa corporal é bem

estabelecida, decorrente da insuficiência de insulina. As células do corpo tornam-se incapazes de obter glicose e utilizam outros substratos como proteínas e gordura como fontes de energia (American Diabetes Association, 2011). Os rins passam a trabalhar em excesso visando eliminar o açúcar no sangue, podendo danificar esse órgão tão importante. A associação entre infecções bacterianas e diabetes é capaz de exacerbar essa perda de peso através da alteração do equilíbrio metabólico-endócrino do hospedeiro (Rayfield et al., 1982).

Nossos resultados apresentaram algumas divergências em relação a esses parâmetros. No modelo de cinco semanas de infecção, o fenótipo de redução no peso corporal dos animais diabéticos que era esperado foi atingido. Por outro lado, não houve diferença em períodos mais curtos de infecção, com cinco dias, para ambos os grupos infectados com a amostra GBS90356 ou COH1. Esse resultado pode ser explicado devido a um menor tempo para a ação da droga (STZ) nesses animais. De acordo com Furman (2015) e Deeds et al. (2011), por mais que a deleção das ilhotas β-pancreáticas seja mais imediata em modelos de indução à diabetes com uma alta dose única de STZ, o estado de hiperglicemia grave, com níveis de glicose no sangue atingindo de 300 a 600mg/dL se desenvolve apenas após 3 semanas de indução. Em modelos utilizando múltiplas doses da droga, o tempo para alcançar esse estado grave pode ser de até 7 semanas.

A partir das taxas de sobrevivência dos animais infectados durante cinco dias, podemos observar a elevada letalidade das amostras bacterianas, principalmente em animais diabéticos, como já descrito por Phoompoung e colaboradores (2021). Eles demonstraram que em 30 dias de infecção a taxa de mortalidade dos pacientes diabéticos com pneumonia causada por *S. agalactiae* na Tailândia foi de 24,96% e de 11% em casos de ITU, problemas renais e sepse causada pelo patógeno. Kessel e colaboradores (2021) também afirmam que amostras pertencentes ao CC-17 levaram a óbito 8% dos pacientes recém-nascidos com meningite e 21% dos pacientes com mais de 3 meses de idade.

A infecção intranasal, com o tempo de cinco semanas, não levou nenhum animal a óbito. Apesar disso, o aparecimento de abcessos na pele dos animais foi descrito anteriormente pelo nosso grupo, durante minha dissertação de mestrado. Os tempos distintos indicaram as fases aguda (5 dias) e crônica (5 semanas) de infecção, de acordo com Veridiano (2017). A diferença na mortalidade entre as duas vias de infecção pode ser explicada, entre outras razões, pela dose mais baixa utilizada nos animais infectados via intranasal (1x10<sup>5</sup>UFC/mL) e também por ser uma via de inoculação mais lenta.

O modelo de infecção intranasal é utilizado para mimetizar uma via muito importante para *S. agalactiae*. Esse patógeno é capaz de ascender o trato vaginal e ultrapassar a barreira placentária, entrando em contato com o bebê ainda no útero, contudo a via até então mais compreendida e estudada é a infecção a partir da inalação do líquido amniótico pelo recém-nascido durante o parto normal (Berner, 2004; Six et al., 2014). Apesar de ser obrigatório em países como os Estados Unidos (American Society for Microbiology, 2020), o teste do cotonete (como é conhecido no Brasil), não é uma prática obrigatória na rotina de exames ao final da gravidez (do Nascimento et al., 2019).

Nossos resultados demonstraram que a infecção intranasal foi bem-sucedida, onde o S. agalactiae foi capaz de disseminar por diversos órgãos, caracterizando infecção generalizada, podendo causar disfunção ou falência de múltiplos órgãos. A diferença no número de colônias entre os órgãos após cinco semanas de infecção foi variável. No cérebro, não houve diferença significativa entre diabéticos e nãodiabéticos. O processo de penetração na barreira hemato-encefálica (BHE) realizado por S. agalactiae ainda vem sendo estudado para melhor compreensão. Dados publicados demonstram que a presença de uma proteína de superfície denominada bspC é importante no rompimento da BHE (Deng et al., 2019). Ambas as amostras utilizadas neste estudo em modelo animal apresentam a proteína bspC, de acordo com o trabalho da mesma autora. Desta forma, podemos sugerir que a hiperglicemia desses animais não interferiu na ação dessa proteína, pois ambos os grupos foram capazes de ultrapassar e atingir a meninge na mesma proporção. Além disso, em períodos mais longos de infecção, como em cinco semanas, o S. agalactiae foi capaz de ultrapassar a BHE tanto em animais saudáveis quanto em condições de diabetes. Assim, estudos com tempos de infecção menores estão em andamento no LBMFE/UERJ para avaliar se S. agalactiae é capaz de ultrapassar a BHE nos animais diabéticos. É importante continuar esses ensaios em tempos menores e em backgrounds murinos distintos, o que infelizmente não pôde ser realizado durante esse trabalho devido a algumas limitações como acesso a esses animais no Brasil, e o tempo curto pós retorno ao laboratório nos Estados Unidos.

Nos demais órgãos analisados (pulmão, coração, fígado) e no sangue, a diferença no número de UFC/mL foi significativa, demonstrando que mesmo após

cinco semanas, o *S. agalactiae* persistiu de maneira mais efetiva nos animais diabéticos. De acordo com Hodgson et al. (2015) e Berbudi et al. (2020), são diversos os problemas acarretados pela presença da diabetes que podem auxiliar na evasão imune de patógenos como *S. agalactiae*: aumento do estresse oxidativo exacerbando os processos inflamatórios crônicos; redução na atividade fagocítica e antibacteriana de neutrófilos e macrófagos, acarretados pelo metabolismo alterado da glicose e estresse oxidativo; ativação prejudicada de células natural killer, contribuindo para a diminuição dos níveis de interferon- $\gamma$ , necessário para promover mecanismos antibacterianos de macrófagos e, função de células dendríticas prejudicada.

No modelo de infecção aguda, onde utilizamos a via intraperitoneal, obtivemos resultados expressivos mais rapidamente. Esse modelo é bem estabelecido para induzir a infecção aguda com diversos patógenos, tais como Acinetobacter baumannii (Harris et al., 2019) e Klebsiella pneumoniae (Franklin et al., 2003). Apesar de comprovarmos a dispersão bacteriana em todos os órgãos analisados, os resultados foram distintos, de maneira amostra-dependente. Para amostra GBS90356, todos os animais, diabéticos ou não, apresentaram colônias viáveis, porém sem diferença significativa entre os grupos. Nesses experimentos foi possível verificar uma tendência, onde a contagem de S. agalactiae (UFC/mL) foi maior nos órgãos de animais diabéticos, contudo sem significância estatística. De maneira contrária, observamos o mesmo padrão do modelo de cinco semanas com a amostra COH1, onde a contagem de UFC/mL uma diferença significativa em todos os órgãos analisados, incluindo o cérebro de animais diabéticos. Nossos resultados demonstram que amostras pertencentes ao mesmo tipo capsular e ST-17 (Lannes-Costa, 2020), podem apresentar comportamentos diferentes relacionados a expressão de fatores de virulência, vias de transdução de sinais e sistemas regulatórios dois componentes (Lannes-Costa, de Oliveira, da Silva Santos, Nagao, 2021). A amostra GBS90356 pode ser mais eficiente, levando menos tempo para se dispersar e invadir os órgãos e, desta forma, não houve diferença significativa entre os animais diabéticos e não diabéticos. Experimentos com menores tempos (a partir de 24h) encontram-se em andamento para verificar uma possível diferença em animais diabéticos e nãodiabéticos.

Modelos de infecção vaginal são importantes, principalmente quando falamos de *S. agalactiae*, por ser um microrganismo presente no trato urovaginal de cerca de 20-30% das mulheres saudáveis (Russell et al., 2017; Shabayek, Spellerberg, 2018;

Baldan et al., 2021). Patras e Doran (2016) propuseram um modelo de colonização vaginal murina, onde é avaliar a persistência de *S. agalactiae* no trato vaginal, além da capacidade de ascensão bacteriana até o útero. Ao verificar a existência e os mecanismos de ação de um sistema de secreção nunca descrito na literatura para *S. agalactiae*, dois alvos iniciais foram pré-estabelecidos: compreender a importância do SST7 no trato vaginal, onde é iniciada a infecção de neonatos e mulheres grávidas; e no cérebro que ao ser atingido por *S. agalactiae* pode desenvolver casos severos e até fatais de meningite em neonatos, adultos e idosos imunocomprometidos.

No modelo vaginal, foi realizada a coinfecção com amostras de S. agalactiae WT e que sofreram mutação no gene essC, importante na maquinaria do operon responsável pela ativação do SST7 nesse patógeno. Os experimentos foram realizados em backgrounds de camundongos distintos, pois diferenças poderiam ser encontradas em cada espécie murina inbred (C57BI/6) ou outbred (CD-1). Nos animais CD-1, utilizamos as amostras NCTC 10/84 e NCTC 10/84∆essC que após 14 dias foram eutanasiados. Os resultados do presente trabalho indicaram a persistência das amostras bacterianas, verificada a cada dois dias, comprovando a importância da presença do gene essC e consequente ativação do SST7 para a sobrevivência do microrganismo no ambiente vaginal. Até a presente data, existe apenas um trabalho publicado, por Alhajjar e colaboradores (2020), identificando fatores para explicar a aderência e persistência de *E. faecalis* no trato vaginal. De acordo com os autores, a presença do SST7 foi necessária para a ascensão do patógeno no trato reprodutivo feminino. Nossos resultados demonstraram que a amostra NCTC 10/84 WT persistiu por mais tempo quando comparada à mutante, corroborando que para S. agalactiae a presença de essC influencia na ascensão aos órgãos do trato vaginal como o cólo do útero e o útero.

Ao utilizar o mesmo modelo de interação com as amostras CJBIII e CJBIII∆essC em animais C57BI/6 observamos um fenótipo curioso, onde por mais de 150 dias os animais continuaram apresentando colônias de ambas as amostras, não havendo diferença significativa entre elas e sendo capazes de se manterem viáveis por um tempo de infecção vaginal nunca visto antes em nossos experimentos. O grupo americano deu prosseguimento ao experimento, onde os animais permaneceram viáveis por mais de 250 dias de infecção. Os dados serão publicados demonstrando a capacidade inédita dessa amostra se manter viável nos órgãos mesmo depois de tanto tempo de inoculação.

De acordo com estudos utilizando diferentes amostras de *S. aureus*, a presença do SST7 promoveu modularidade e heterogeneidade na expressão específica para cada amostra (Warne et al., 2016; Tchoupa et al., 2020). Sendo assim, o mecanismo de ação e até mesmo a presença ou ausência do SST7 pode variar entre amostras da mesma espécie. Ainda não se sabe se há um padrão dependente do tipo capsular em *S. agalactiae* ou algum outro fator que possa influenciar na expressão.

Para o desenvolvimento de meningite em camundongos CD-1, foi escolhido o modelo hematogênico de injeção via caudal com as amostras de S. agalactiae CJBIII e CJBIIIAessC. O mesmo modelo havia sido proposto anteriormente para esse patógeno em trabalhos publicados recentemente (Deng et al., 2019; Zhu et al., 2021). Os resultados apresentados a seguir foram inseridos no trabalho publicado ano passado, em colaboração com o nosso grupo de pesquisa (Spencer et al., 2021) e que está em anexo ao final desse trabalho (Anexo 1). Durante as 72h de monitoramento dos animais e a partir dos sinais previamente descritos na metodologia, podemos confirmar que o modelo de meningite foi estabelecido. A amostra WT CJBIII obteve sucesso em ultrapassar com maior rapidez a BHE quando comparado a mutante CJBIII $\Delta$ essC. Trabalhos realizados previamente com M. tuberculosis destacaram a capacidade de amostras que possuem o SST7 ativado em desenvolver doenças como a meningite tubercular (Trunz, Fine, Dye, 2006; Kaufmann, Evans, Hanekom, 2015). Visamos no futuro a construção da mesma mutante ΔessC na amostra GBS90356. A amostra COH1ΔessC já foi construída pelo laboratório da Dra. Doran, contudo ainda não realizamos experimentos com a mesma. É importante ressaltar que deleções na proteína expressa pelo SST7 denominada EsxA, homóloga de outras espécies como S. aureus, já foram realizadas com a construção de mutantes em ambas as amostras CJBIII e NCTC 10/84, e experimentos iniciais foram realizados visando determinar se a atividade de EsxA é citotóxica em modelos in vitro/in vivo. Alguns desses resultados também são apresentados na publicação em anexo ao final desse trabalho.

A capacidade de *S. agalactiae* sobreviver e se manter viável em macrófagos já havia sido estudada por nosso grupo (Monteiro et al., 2004). Ensaios de aderência e viabilidade intracelular mostraram que a amostra GBS90356 é capaz de sobreviver 24h dentro de macrófagos murinos. Em macrófagos obtidos de animais controle, após os ensaios de invasão, observamos uma contagem de UFC/mL de forma expressiva

a partir de 60min de infecção, confirmando a capacidade do patógeno em sobreviver dentro desses fagócitos.

Para verificar se colônias de *S. agalactiae* ainda eram encontradas em macrófagos obtidos do lavado bronqueoalveolar de camundongos após cinco semanas de infecção, a viabilidade intracelular foi analisada em ambos os grupos infectados, diabéticos ou não para avaliar se as condições hiperglicêmicas poderiam interferir/alterar o potencial de sobrevivência. Nossos resultados demonstraram que após cinco semanas ainda foram encontradas colônias viáveis dentro dos macrófagos e que as células obtidas dos animais diabéticos apresentaram um número significativamente superior de UFC/mL. Outros trabalhos abordaram a capacidade de *S. agalactiae* ou outras espécies do gênero *Streptococcus* em se manterem viáveis em macrófagos humanos em até 6h (O'Neill, Thurston, Holden, 2016) e murinos durante 3h (Rogers et al., 2018). Contudo, não foram encontrados trabalhos que demonstrassem essa viabilidade em tempos tão longos e em macrófagos obtidos de animais diabéticos, tornando nossos dados inéditos.

Macrófagos derivados de animais diabéticos apresentam uma série de modificações quando comparados a macrófagos obtidos de animais não diabéticos, tais como aumento das proteínas quinase B (PKB/Akt) (Ser-473 e Thr-308), quinases reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2) e proteína quinase ativada por estresse (SAPK/JNK), secreção de níveis desregulados de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, óxido nítrico, NLRP3 e iNOS (Tessaro et al., 2020, Davanso et al., 2021).

Pneumonia e endocardite são manifestações clínicas cada vez mais comuns em pacientes diabéticos infectados com *S. agalactiae* (Rajagopal, 2009). Ambas as doenças derivam de um estado de septicemia, onde a bactéria alcança diferentes órgãos a partir da corrente sanguínea. A presença de citocinas inflamatórias específicas pode caracterizar melhor o microambiente e a resposta imune desencadeada pelas células do hospedeiro, principalmente durante uma inflamação crônica devido às condições hiperglicêmicas. A proteína CXCL-1 (KC em camundongos) é um importante marcador do recrutamento de neutrófilos no sítio de infecção (Sawant et al., 2016; Deng et al., 2019). Em infecções agudas, incluindo as causadas por *S. agalactiae*, os neutrófilos fazem parte da primeira linha de células de defesa do hospedeiro (Kothary et al., 2017). Huang e colaboradores (2016) mostraram que os pacientes com diabetes tipo 1 apresentaram números de neutrófilos mais elevados do que os controles e o aumento da contagem de neutrófilos foi correlacionado com um risco aumentado de doença vascular. No modelo de infecção IP com a amostra de *S. agalactiae* COH1, verificamos por ensaios de ELISA uma maior expressão da proteína KC nos animais diabéticos quando comparados com os demais grupos, em ambos os órgãos analisados.

Neutrófilos são importantes moduladores das respostas imunes inatas e adaptativas, principalmente através da liberação de citocinas e recrutamento de mais neutrófilos para as vias aéreas. Embora tipicamente essencial para combater a pneumonia grave, o influxo de neutrófilos nas vias aéreas pode trazer malefícios para o pulmão como a ativação excessiva de neutrófilos causando danos graves nos tecidos através da liberação de agentes tóxicos, incluindo proteases, polipeptídeos catiônicos, citocinas e espécies reativas de oxigênio. Em casos extremos, os danos causados por neutrófilos e outros mediadores imunes inatos se tornam a principal fonte de morbidade e mortalidade (Pechous et al., 2017). O mesmo acontece em casos de endocardite infecciosa (Bozbay et al., 2014).

IL-1β é uma citocina com potencial altamente inflamatório, comumente associado à imunidade protetora do hospedeiro (LaRock and Nizet, 2015). IL-1β é crítico na defesa contra *S. agalactiae* e *S. pneumoniae* (Hsu et al., 2011; Costa et al., 2012; Lemon et al., 2015). IL-1β é um dos principais quimioatrativos de neutrófilos (Chen et al., 2007) e o recrutamento de neutrófilos é amplamente mediado por IL-1β durante infecções por Estreptococos do Grupo A (Hsu et al., 2011) e *S. agalactiae* (Biondo et al., 2014). A IL-1β também induz a expressão de fibrinogênio e coagulação localizada que ajudam a limitar a disseminação de *S. pneumoniae* no pulmão (Yang et al., 2013). Ainda não está claro se essa expressão ocorre durante outras infecções estreptocócicas, cujos efeitos nem sempre beneficiam o hospedeiro, pois fatores de virulência expressos na superfície bacteriana podem se ligar ao fibrinogênio e interferir na ativação do complemento e na fagocitose (Nizet, Doran, 2013; Walker et al., 2014).

Nossos resultados demonstraram que os níveis de IL-1 $\beta$  foram superiores em animais diabéticos infectados com a amostra COH1 somente no pulmão. Contudo, há uma clara tendência na maior expressão de IL-1 $\beta$  no coração dos animais diabéticos. Nos animais infectados com a amostra GBS90356, tanto os animais diabéticos quanto os animais não diabéticos infectados com a amostra apresentaram elevados níveis de ambas as citocinas KC e IL-1 $\beta$ , sendo relevantes quando comparado aos demais grupos controle. Não houve diferença significativa no coração quando dosamos IL-1 $\beta$ . Isso está de acordo com os resultados da UFC/mL encontrada em ambos os órgãos. Da mesma forma, o perfil de citocinas no modelo vaginal foi analisado. Num modelo de infecção do trato genital murino com *Neisseria gonorrhoeae* realizado por Feinen and Russell (2012), a indução de IL-17 foi descrita, citocina essa que é importante tanto no recrutamento de neutrófilos quanto na eliminação imediata da infecção. A produção de IL-22 também foi observada pelos autores, em resposta à estimulação com *N. gonorrhoeae* nos explantes de tecido vaginal cultivados *ex vivo*. Ao construir camundongos *knockouts* deficientes de IL-22, os animais se tornaram resistentes às infecções no trato genital desses animais, porém não houveram diferenças no influxo de neutrófilos no sítio de infecção.

Em nossos modelos infectados com as amostras CJBIII, CJBIII $\Delta essC$ , NCTC 10/84 e NCTC 10/84 $\Delta essC$  os resultados diferem da literatura, não havendo diferenças nos níveis de ambas as citocinas em nenhum dos órgãos analisados. Chen et al. (2021) demonstraram que a diferenciação das células CD4<sup>+</sup> em células Th17 aumenta a expressão dos níveis de IL-17. Outro trabalho publicado por Yu et al. (2018) mostrou que numa coinfecção entre S. *agalactiae* e *Candida albicans*, os níveis de IL-17 no lavado cervico-vaginal decaíram significativamente. A deficiência em IL-23 tornou infecções cardíacas mais frequentes e animais mais susceptíves ao *S. pneumoniae*, influenciando também nas respostas de Th1 e Th17 (Kim et al., 2014).

A expressão das CXCL-1 (KC) e IL-1 $\beta$ , também foi quantificada no cérebro dos animais CD-1 infectados com as amostras CJBIII e CJBIII $\Delta$ essC através da via de inoculação caudal. Em um modelo de meninigite causada por *Streptococcus pneumoniae*, os níveis de KC, IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-2 e MCP-1 foram elevados nos animais infectados (Klein et al., 2006). Manzer, Villarreal e Doran (2022) também observaram altos níveis da proteína KC em amostras cerebrais de *S. agalactiae*.

Além da expressão de citocinas inflamatórias, outro indicador importante da inflamação é a expressão de espécies reativas de oxigênio (EROs). Um trabalho prévio publicado pelo nosso grupo, utilizando modelo de células endoteliais humanas (HUVEC) e a amostra de *S. agalactiae* GBS90356, demonstrou que a geração de EROs ocorreu através da via NADPH oxidase acompanhada da reorganização do citoesqueleto através da via PI3K/Akt (Oliveira et al., 2018). A produção de EROs possui um papel importante em complicações da diabetes, gerando além do estresse oxidativo a morte celular (Volpe et al., 2018). Apesar de ser uma estratégia para combater a presença de microrganismos, sua produção descontrolada tende ao efeito contrário, podendo ser tóxico ao tecido infectado. O excesso de neutrófilos e

macrófagos pode ser responsável pelos níveis excessivos de EROs (Nouvong et al., 2016). A dosagem de EROs obtida do lavado bronqueoalveolar foi superior nos animais diabéticos infectados com a amostra GBS90356 quando comparados aos demais grupos, principalmente após 1h com a sonda fluorescente. Nossos dados demonstram mais um fator capaz de tornar o microambiente celular mais inflamado, levando ao dano das células e a possível morte celular.

Apesar de muito relevante, ainda é necessário realizar uma caracterização mais específica de quais espécies reativas de oxigênio estão sendo expressas nesse modelo de infecção com técnicas de espectrofotometria ou Ressonância de Spin Eletrônico (RSE) (Zhang, Dai, Yuan, 2018).

Para a caracterização mais completa da inflamação pulmonar e cardíaca, tornase importante visualizar quais os tipos celulares imunes recrutados durante a infecção. O recrutamento de neutrófilos é bem conhecido em infecções agudas por *S. agalactiae* (Kothary et al., 2017). Além desse grupo de células, Faherty e colaboradores (2019) demonstraram a importância dos macrófagos no contexto dos recém-nascidos, cujo sistema imunológico adaptativo ainda é imaturo, dependendo quase que unicamente do sistema imune inato para combater infecções bacterianas. Os macrófagos também estão presentes na interface materno-fetal, onde auxiliam na manutenção da tolerância materna ao feto em desenvolvimento e combatem patógenos que cruzam as membranas extra placentárias (Anders et al., 2017).

Neste trabalho foram utilizados marcadores celulares para identificar macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células T através das técnicas de citometria de fluxo para o pulmão e qPCR para o coração. A diferença nas técnicas se deu pela falta de um kit de dissociação enzimática que fosse compatível com os corações murinos, contudo os marcadores foram os mesmo para ambos os procedimentos. Os resultados da citometria de fluxo mostraram não haver diferenças estatísticas entre os grupos e o recrutamento de células imunes no pulmão. Contudo, em relação ao número absoluto de macrófagos, a presença dos mesmos foi maior nos animais diabéticos infectados com ambas as amostras de *S. agalactiae* GBS90356 e COH1 quando comparado aos animais diabéticos não infectados ou aos animais controle.

Diferenças na população de neutrófilos eram igualmente esperadas, levando em consideração os altos níveis da proteína KC encontrados nos ensaios de ELISA. Além disso, de acordo com a literatura, os neutrófilos são recrutados em grande escala no sítio de infecção causadas por *S. agalactiae*. Contudo, nos dados obtidos pela citometria de fluxo, não houve diferença significativa entre os grupos diabéticos ou não infectados com ambas as amostras, assim como nos grupos não infectados. Por ser uma técnica mais complexa e pouco disponível, não foi realizada em duplicata. Desta forma, ensaios visando a repetição esses experimentos estão em andamento e serão realizados em colaboração. Além disso, uma explicação para os níveis de expressão de IL-1 $\beta$  observados pode ser a associação com os macrófagos, ao invés de neutrófilos, como previamente descrito em infecções por *M. tuberculosis* (Krishnan, Robertson, Thwaites, 2013).

O perfil de células imunes cardíacas por RT-qPCR foi similar, com elevada marcação para células T, macrófagos e neutrófilos na infecção com a amostra GBS90356. Em relação à infecção com a amostra COH1, o recrutamento mais expressivo foi de células imunes inatas, como macrófagos e neutrófilos, exibindo um padrão mais esperado. De acordo com Rubio et al. (2019), em infecções causadas por *S. aureus*, o recrutamento de leucócitos para as áreas de infecção e a expressão de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 é esperado em situações de endocardite. É importante descrever que apesar de não ter sido possível até a conclusão desse trabalho identificar e quantificar marcadores do modelo intrasanal, esse é um passo importante que visamos realizar para verificar se o recrutamento celular é distinto a partir de outras vias de infecção, e se o perfil de células é alterado em tempos maiores pós infecção por *S. agalactiae*.

Análises histológicas são extremamente relevantes para obter uma apreciação geral de diversos órgãos após infecções bacterianas, inclusive daqueles que não apresentam alterações macroscópicas. A partir do estudo histopatológico cardíaco é possível obter o detalhamento das modificações causadas por um patógeno dentro de determinado órgão, sendo capaz de diagnosticar doenças e auxiliar no tratamento com maior precisão. A fisiopatologia da endocardite infecciosa compreende pelo menos três elementos críticos: adaptação bacteriana para aderência na válvula cardíaca, a capacidade do patógeno em se manter aderido e a sobrevivência de bactérias circulantes na superfície valvar com propagação venosa (Sullam, Drake, Sande, 1985). Adicionalmente, as análises histológicas também são importantes na caracterização da meningite através do espessamento da meninge e infiltrado de leucócitos (Deng et al., 2019). As imagens histológicas foram analisadas segundo os critérios descritos por Dylan Ely et al. (2016), buscando infiltrados de células imunes, extravasamento de hemácias, obstrução das válvulas cardíacas, células gigantes, depósito de fibrina e a presença de microrganismos.

As imagens com a coloração de Giemsa e HE demonstraram válvulas cardíacas obstruídas em camundongos diabéticos infectados com a amostra GBS90356 quando comparados aos animais controle. Dano tecidual ao redor da válvula com elevado número de hemácias, presença de leucócitos e de células bacterianas também foram observadas através da coloração de Giemsa.

Em relação às imagens histológicas cerebrais com HE observamos o espessamento da meninge em decorrência dos infiltrados de células imunes nos animais infectados com a amostra WT CJBIII. Além disso, a mutação do gene *essC* foi capaz de inibir o recrutamento de células imunes, demonstrando que as proteínas secretadas pelo SST7 podem estar relacionadas com a capacidade do *S. agalactiae* em ultrapassar a barreira hematoencefálica, exacerbar a inflamação e promover a meningite bacteriana.

Apesar das limitações e da pausa em decorrência da COVID-19 nos anos de 2020 durante o doutorado sanduíche, e 2021 após o retorno ao Brasil, foi possível realizar uma série de ensaios que corroboram a necessidade de se aprofundar cada vez mais nos estudos de *S. agalactiae* em adultos imunocomprometidos. Algumas publicações, realizadas em colaboração durante o meu período de doutorado, estão presentes nos anexos 1, 2 e 3 ao final desse trabalho. Além disso, parte dos resultados foram apresentados em congressos nacionais e internacionais.

Desta forma, os resultados em conjunto contribuem para a melhor compreensão dos fatores utilizados por *S. agalactiae* para evadir a resposta imune, aumentar o potencial de virulência e utilizar estratégias de defesa a partir dos mecanismos imunes do próprio hospedeiro. Nesse trabalho, estudamos de forma mais profunda as vias de infecção, o desenvolvimento da sepse, a capacidade de dispersão em diferentes tecidos, a resposta do hospedeiro na tentativa de combater o patógeno e a capacidade do *S. agalactiae* em utilizar células imunes e estresse oxidativo em seu próprio favor. Além disso, comprovarmos a existência de um sistema secretor de proteínas nunca antes descrito em *S. agalactiae* como um potencializador da infecção no trato vaginal e nas meninges. Cabe ressaltar que este estudo foi o primeiro a contribuir com dados utilizando amostras hipervirulentas do tipo capsular III e ST-17 de *S. agalactiae* em modelo de diabetes induzida, sendo de grande importância para

compreender o desenvolvimento de doenças como pneumonia, sepse e endocardite em pacientes diabéticos causadas pelo *S. agalactiae*.

#### CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que:

- a) Foi identificada uma nova amostra de S. agalactiae tipo capsular III e pertencente à ST-17, proveniente de uma paciente adulta diabética internada por infecção urinária causada por essa amostra;
- b) O acréscimo de glicose no meio de cultura BHI não influenciou na produção de biofilme das amostras de *S. agalactiae* quando comparado ao meio sem glicose; contudo no meio TSB a adição da glicose aumentou a produção de biofilme da amostra D01 após 24h quando comparado ao meio TSB comum;
- c) As amostras de *S. agalactiae* D01, GBS90356 e COH1 tornaram os meios de cultura mais ácidos após 24h, independentemente da adição ou não de glicose;
- d) Após cinco dias de infecção intraperitoneal, cerca de 55% dos animais diabéticos infectados com a amostra COH1 vieram a óbito, enquanto nenhum animal não-diabético morreu após infecção com a mesma amostra; após a infecção com a amostra GBS90356 cerca de 40% dos animais diabéticos infectados vieram a óbito no mesmo período, enquanto 60% dos animais não diabéticos infectados também morreram;
- e) Todas as amostras de S. agalactiae foram capazes de se dispersar em diferentes órgãos após infecção com todas as vias de inoculação testadas nesse trabalho;
- f) Após infecção intranasal com a amostra GBS90356, o número de UFC/mL no pulmão, coração, fígado e no sangue foi superior em animais diabéticos;
- g) Na via de infecção intraperitoneal com a amostra COH1 todos os grupos diabéticos apresentaram maior número de UFC/mL quando comparados aos não-diabéticos; enquanto após a infecção com a amosra GBS90356 não houve diferença significativa entre os órgãos em ambos os grupos diabéticos ou não diabéticos;
- h) A presença do gene essC foi importante para a amostra NCTC 10/84 se manter viável no trato vaginal por mais tempo, e ascender aos órgãos que compõem o trato vaginal (cólo do útero e útero);

- i) As amostras CJBIII e CJBIII∆essC foram detectadas viáveis na vagina por mais de 150 dias consecutivos, e com isso não foi possível determinar se a presença do gene essC nessa amostra foi relevante até a conclusão desse estudo;
- j) S. agalactiae foi capaz de disseminar através da infecção via caudal, alcançando a corrente sanguínea e ultrapassando a barreira hematoencefálica;
- k) O gene essC demonstrou ser importante para S. agalactiae atravessar a barreira hematoencefálica e causar meningite em 72h de infecção;
- S. agalactiae demonstrou se manter viável dentro de macrófagos a partir de 1h de infecção; e em macrófagos obtidos dos animais diabéticos demonstrou estar viável por mais de cinco semanas;
- m) A expressão de citocinas pró-inflamatórias no pulmão, cérebro e coração foi superior nos animais diabéticos infectados com as amostras de *S. agalactiae* (especialmente a proteína KC), o que corrobora com o recrutamento de neutrófilos e macrófagos identificados no coração;
- n) O perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias pareceu ser dependente da amostra;
- o) No pulmão, as únicas células imunes que apresentaram aumento da população pós infecção por *S. agalactiae* em cinco dias foram os macrófagos, especialmente em animais diabéticos;
- p) No trato vaginal, apenas uma citocina analisada, IL-23, demonstrou ser relevante para a amostra CJBIII∆essC;
- q) A expressão de espécies reativas de oxigênio foi superior em animais diabéticos após 1h, e mesmo após isso as amostras de *S. agalactiae* conseguem combater esse mecanismo de defesa e se manter viáveis em macrófagos;
- r) Os marcadores de células imunes identificaram uma população diversificada em ambos os órgãos, apontando um maior número de células T, macrófagos e neutrófilos no coração; macrófagos e neutrófilos no pulmão;
- s) Indícios de endocardite foram identificados nos animais diabéticos infectados, além da presença de colônias de *S. agalactiae* na válvula cardíaca;
- t) Da mesma maneira, sinais de meningite foram identificados nos animais infectados com a amostra de *S. agalactiae* wild-type, corroborando a importância do SST7 no processo de meningite bacteriana causada por esse patógeno.

## REFERÊNCIAS

Abat, C.; Chaudet, H.;, Raoult, D.; Colson, P. Increasing trend of invasive group B streptococcal infections, Marseille, France. Clin Infect Dis, v. 8, n. 5, p. 750–751, 2014.

Abby, S. S. et al. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Sci. Rep.*, v.6, n.23080, 2016.

Abd-Elaleem, R.; Bakr, W. M. K.; Hazzah, W. A.; Nasreldin, O. Assessment of the personal hygiene and the bacteriological quality of butchers' hands in some abattoirs in Alexandria, Egypt. *Food Control*, v. 41, p. 147-150, 2014.

Abdallah, A. M., Verboom, T., Hannes, F., Safi, M., Strong, M., Eisenberg, D., Musters, R. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Appelmelk, B. J., Luirink, J., and Bitter, W. A specific secretion system mediates PPE41 transport in pathogenic mycobacteria. Mol. Microbiol., v.62, p.667-679, 2006.

Abdelghany, Mahmoud; Schenfeld, Louis. Group B streptococcal infective endocarditis. *Journal of infection and public health*, v. 7, n. 3, p. 237-239, 2014.

Abee, T., Kovács, A.T., Kuipers, O.P., van der Veen, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bactéria. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.22, p.172-179, 2011.

Aitmhand, R.; Moustaoui, N.; Belabbes, H.; Elmdaghri, N.; Benbachir, M. Serotypes and antimicrobial susceptibility of group B streptococcus isolated from neonates in Casablanca. Scand J Infect Dis, v. 32, n. 3, p. 339–340, 2000.

Alhajjar, N.; Chatterjee, A.; Spencer, B. L.; Burcham, L. R.; Willett, J. L.; Dunny, G. M.; Doran, K. S. Genome-wide mutagenesis identifies factors involved in Enterococcus faecalis vaginal adherence and persistence. *Infection and immunity*, v. 88(10), p. e00270-20, 2020.

Ali, A., Na, M., Svensson, M.N., Magnusson, M., Welin, A., Schwarze, J.C., Mohammad, M., Josefsson, E., Pullerits, R., Jin, T. IL-1 receptor antagonist treatment aggravates staphylococcal septic arthritis and sepsis in mice. PLoS One, v.10, e0131645, 2015.

Alhhazmi, A., Hurteau, D., Tyrrell, G.J. Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Disease in Alberta, Canada, from 2003 to 2013. *J. Clin. Microbiol.*, v.54, p.1774–1781, 2016.

American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2011. *Diabetes Care*, v. 34, p. S11-S61, 2011.

Amico, S., Calvo, L., Corrao, S. An "aubergine" in the heart: huge native mitral valve endocarditis caused by *Streptococcus agalactiae*. *Intern. Emerg. Med.*, 2017.

Andrade, E.A., Magalhães, A., Puga, A., Costa, M., Bravo, J., Portugal, C.C., Ribeiro, A., Correia-Neves, M., Faustino, A., Firon, A., Trieu-Cuot, P., Summavielle, T.,

Ferreira, P. A mouse model reproducing the pathophysiology of neonatal group B streptococcal infection. Nat. Commun., v. 9, p.1-13, 2018.

Anderson, M., Aly, K.A., Chen, Y-H., Missiakas, D. Secretion of atypical protein subtrates by the ESAT-6 secretion system of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*, v.90, p.734–743, 2013.

Angus, D.C.; Linde-Zwirble, W.T.; Lidicker, J.; Clermont, G.; Carcillo, J.; Pinsky, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med., v. 29, p. 1303 – 1310, 2001.

Arias, B.; Kovacec, V.; Vigliarolo, L.; Suárez, M.; Tersigni, C.; Lopardo, H.; Bonofiglio, L.; et al. Epidemiology of Invasive Infections Caused by Streptococcus agalactiae in Argentina. *Microbial Drug Resistance*. 2022.

Ariyoshi, N.; Miyamoto, K.; Bolger, J., Dennis, T. *Streptococcus agalactiae* mural infective endocarditis in a structurally normal heart. Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives, v. 6, n. 2, p. 31113, 2016.

Ates LS, Houben ENG, Bitter W. Type VII secretion: a highly versatile secretion system. *Microbiol. Spectrum.*, v.4, n.1, VMBF0011-2015, 2016.

Baker, C. J., Paoletti, L.C., Rench, M.A., Guttormsen, H.K., Edwards, M.S., Kasper, D.L. Immune response of healthy women to 2 different group B streptococcal type V capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. *J. Infect. Dis.*, v.189, p.1103–1112, 2004.

Baldan, R.; Droz, S.; Casanova, C.; Knabben, L.; Huang, D. J.; Brülisauer, C.; Sendi, P. Group B streptococcal colonization in elderly women. *BMC infectious diseases*, v. 21(1), p. 1-8, 2021.

Banks, D. J., Porcella, S.F., Barbian, K.D., Martin, J.M., Musser, J.M. Structure and distribution of an unusual chimeric genetic element encoding macrolide resistance in phylogenetically diverse clones of group A Streptococcus. *J. Infect. Dis.*, v.188, p.1898–1908, 2003.

Barroso, V.; de Paula, R.M.; Melo, T.; Raul, A.J. Endocardite bacteriana. REDVET, v. VI, n.3, p. 1-14, 2005.

Batista, R. P.; Ferreira, C. R. Streptococcus agalactiae septicemia in a patient with diabetes and hepatic cirrhosis. *Autopsy & case reports.*, v. 5, p. 35, 2015.

Bayer, A. S.. Theofilopoulos, A. N.; Dixon, F. J.; Guze, L. B. Circulating immune complexes in infective endocarditis. Clin. Res., v. 24, p. A451–A451, 1976.

Beckham, K. S., Ciccarelli, L., Bunduc, C. M., Mertens, H. D., Ummels, R., Lugmayr, W., Mayr, J., Rettel, M., Savitski, M. M., Svergun, D. I., Bitter, W., Wilmanns, M., Marlovits, T. C., Parret, A. H., and Houben, E. N. Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system membrane complex by single-particle analysis. *Nat. Microbiol.*, v.2, 17047, 2017.

Bellais, S., Six, A., Fouet, A., Longo, M., Dmytruk, N., Glaser, P., et al. Capsular switching in group B Streptococcus CC17 hypervirulent clone: a future challenge for polysaccharide vaccine development. *J. Infect. Dis.*, v.206, p.1745–1752, 2012.

Bergal, A.; Loucif, L.; Benouareth, D. E.; Bentorki, A. A.; Abat, C.; Rolain, J-M. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, genotypes, and antibiotic resistance genes of Streptococcus agalactiae clinical isolates from Guelma, Algeria and Marseille, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, p. 1-10, 2015.

Berbudi, A.; Rahmadika, N.; Tjahjadi, A. I.; Ruslami, R. Type 2 diabetes and its impact on the immune system. *Current diabetes reviews*, v. 16(5), p. 442, 2020.

Bisharat, N., Crook, D.W., Leigh, J., Harding, R.M., Ward, P.N., Coffey, T.J., Maiden, M.C., Peto, T., Jones, N. Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, p.2161–2167, 2004.

Bjarnsholt, T., Buhlin, K., Dufrêne, Y.F., Gomelsky, M., Moroni, A., Ramstedt, M., Rumbaugh, K.P., Schulte, T., Sun, L., Åkerlund, B., Römling, U. Biofilm formation – what we can learn from recent developments. J. Intern. Med., v.284, n.4, p.332-345, 2018.

Blanco, J.; Muriel-Bombín, A.; Sagredo, V.; Taboada, F.; Gandía, F.; Tamayo, L.; et al. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. Crit Care, v. 12, p. 1-14, 2008.

Boomer, J.S.; To, K.; Chang, K.C.; Takasu, O.; Osborne, D.F.; Walton, A.H.; et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. JAMA, v. 306, p. 2594-2605, 2011.

Borges, S.; Silva, J.; Teixeira, P. Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 101, p. 677-682, 2012.

Boswihi, S.S.; Udo, E.E.; Al-Sweih, N. Serotypes and antibiotic resistance in Group B streptococcus isolated from patients at the Maternity Hospital, Kuwait. *J Med Microbiol.*, v. 61, p.126–131, 2012.

Burts, M.L., Williams, W.A., DeBord, K., Missiakas, D.M. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.102, p.1169–1174, 2005.

Calvert, A. C. Endocarditis and Bacteremia. In: FOX, P.R. Canine and Feline Cardiology. 3 ed. Nova lorque: Churchill Livingstone, 1988. p. 419-434.

Casqueiro, J.; Casqueiro, J., Alves, C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, v. 16, n. Suppl1, p. S27, 2012.

Centers for Disease Control and Prevention. Group B Strep Infection in Adults. 2016. Disponível em: <a href="https://www.cdc.gov/groupbstrep/about/adults.html">https://www.cdc.gov/groupbstrep/about/adults.html</a>. Acesso em: 11 jan. 2022.

Chang, Y. C., Olson, J., Louie, A., Crocker, P. R., Varki, A., Nizet, V. Role of macrophage sialoadhesin in host defense against the sialylated pathogen group B Streptococcus. *J. Mol. Med.*, v.92, p.951–959, 2014.

Chatterjee, A., Willett, J.L.E., Dunny, G.M., Duerkop, B.A. Phage infection and sublethal antibiotic exposure mediate *Enterococcus faecalis* type VII secretion system dependent inhibition of bystander bacteria. *PLoS Genet.*, v.17, n.1, e1009204, 2021.

Chen, Y.H., Anderson, M., Hendrickx, A.P., Missiakas, D. Characterization of EssB, a protein required for secretion of ESAT-6 like proteins in *Staphylococcus aureus. BMC Microbiol.*, v.12:219, 2012.

Chen, G., Deng, H., Song, X., Lu, M., Zhao, L., Xia, S., et al. Reactive oxygen species-responsive polymeric nanoparticles for alleviating sepsis-induced acute liver injury in mice. *Biomaterials*, v. 144, p. 30-41, 2017.

Chiu, N-C. Prevention of group B Streptococcus infection. *Pediatr Neonatol.*, v. 60, n. 3, p.233–234, 2019.

Coldewey, S.M.; Rogazzo, M.; Collino, M.; Patel, N.S.A.; Thiemermann, C. Inhibition of I B kinase reduces the multiple organ dysfunction caused by sepsis in the mouse. Dis Model Mech., v. 6, p. 1031-1042, 2013.

Colicchia, L.C., Lauderdale, D.S., Du, H., Adams, M., Hirsch, E. Recurrence of group B streptococcus colonization in successive pregnancies. *J. Perinatol.*, v. 35, p.173–176, 2015.

Cooper, G.; Platt, R. *Staphylococcus aureus* bacteremia in diabetic patients: endocarditis and mortality. The American Journal of Medicine, v. 73, n. 5, p. 658-662, 1982.

Coopersmith, C.M.; Wunsch, H.; Fink, M.P.; Linde-Zwirble, W.T.; Olsen, K.M.; Sommers, M.S.; et al. A comparison of critical care research funding and the financial burden of critical illness in the United States. Crit Care Med., v. 40, p. 1072-1079, 2012.

Costa, T. R. et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.13, p.343–359, 2015.

Craciun, F.L., Schuller, E.R., Remick, D.G. Early Enhanced Local Neutrophil Recruitment in Peritonitis-Induced Sepsis Improves Bacterial Clearance and Survival. *J. Immunol.*, v.185, p. 6930-6938, 2010.

Curtis, Meredith M.; Way, Sing Sing. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. Immunology, v. 126, n. 2, p. 177-185, 2009.

Da Cunha, V. et al. *Streptococcus agalactiae* clones infecting humans were selected and fixed through the extensive use of tetracycline. *Nat. Commun.*, v.5, n.4544, p.1-12, 2014.
Dahesh, S.; Hensler, M.E.; Van Sorge, N.M.; Gertz, R.E. Jr.; Schrag, S.; Nizet, V.; Beall, B.W. Point mutation in the group B streptococcal pbp2x gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, p. 2915-2918, 2008.

Deeds, M. C.; Anderson, J. M.; Armstrong, A. S.; Gastineau, D. A.; Hiddinga, H. J.; Jahangir, A.; Kudva, Y. C. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Laboratory animals*, v. 45(3), p. 131-140, 2011

Deitch, E. A. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann. Surg.*, v.216, p.117–134, 1992.

Deng, L; Spencer, B. L.; Holmes, J. A.; Mu, R.; Rego, S.; Weston, T. A.; Doran, K. S. The Group B Streptococcal surface antigen I/II protein, BspC, interacts with host vimentin to promote adherence to brain endothelium and inflammation during the pathogenesis of meningitis. *PLoS pathogens*, v.15(6), p. e1007848, 2019.

Dilrukshi, G. N.; Kottahachchi, J.; Dissanayake, T.; Weerasekera, M.; Peiris, M., Medis, S.; Fernando, N. In-vitro Biofilm Formation of Vaginal Isolates of Streptococcus agalactiae; Effect of pH and Culture Media. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, p. 64. 2021

Doran, K. S., Liu, G.Y, Nizet, V. Group B streptococcal β-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *J. Clin. Investig.*, v.112, p.736-744, 2003.

Dutra et al. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *BMC Infectious Diseases*. v. 14, p. 323, 2014.

Durack, D. T.; Beeson, P. B.; Petersdorf, R. G. Experimental bacterial endocarditis. 3. Production and progress of the disease in rabbits. Br. J. Exp. Pathol., v. 54, p. 142–151, 1973.

D'Urzo, N.; Martinelli, M.; Pezzicoli, A.; De Cesare, V.; Pinto, V.; Margarit, I.; Maione, D.; et al. Acidic pH strongly enhances in vitro biofilm formation by a subset of hypervirulent ST-17 Streptococcus agalactiae strains. *Applied and environmental microbiology*, v. *80*, p. 2176-2185, 2014.

Edmond, K.M., Kortsalioudaki, C., Scott, S., Schrag, S.J., Zaidi, A.K.M., Cousens, S., Heath, P.T. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet*, v. 379, n. 9815, p.547–556, 2012.

Edwards, M. S., Baker, C. J. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis.* v. 41, p. 839-847, 2005.

Erhardt, M., Namba, K., Hughes, K. T. Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, v.2, a000299, 2010.

Famelis, N., Rivera-Calzada, A., Degliesposti, G., Wingender, M., Mietrach, N., Skehel, J. M., Fernandez-Leiro, R., Bottcher, B., Schlosser, A., Llorca, O., and Geibel, S. Architecture of the mycobacterial type VII secretion system. *Nature*, v. 576, p.321-325, 2019.

Farley, M. M., Harvey, R. C., Stull, T., Smith, J. D., Schuchat, A., Wenger, J. D., Stephens, D. S. A population-based assessment of invasive disease due to group B Streptococcus in nonpregnant adults. *N Engl J Med*. v.24, p. 1807-1811, 1993.

Farley, M. M. Group B Streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin. Infect. Dis.* v. 33, p. 556-561, 2001.

Ferreira, C.S.; Pennacchi, P.C.; Araújo, T.H.; Taniwaki, N.N.; Araújo, F.B.P.; Silveira, S.M.D.; Rodrigues, M.R. Aminoguanidine treatment increased NOX2 response in diabetic rats: Improved phagocytosis and killing of Candida albicans by neutrophils. Eur J Pharmacol. 2015.

Filippo, K.D., Henderson, R.B., Laschinger, M., Hogg, N. Neutrophil Chemokines KC and Macrophage-Inflammatory Protein-2 Are Newly Synthesized by Tissue Macrophages Using Distinct TLR Signaling Pathways. J. Immunol., v.180, n.6, p.4308-4315, 2008.

Florindo, C., Damiao, V., Silvestre, I., Farinha, C., Rodrigues, F., Nogueira, F., et al. Epidemiological surveillance of colonising group B Streptococcus epidemiology in the Lisbon and Tagus Valley regions, Portugal (2005 to 2012): emergence of a new epidemic type IV/clonal complex 17 clone. *Euro. Surveill.*, v.19:20825, 2014.

Franklin, G. A.; Scott, M. J.; Patel, M.; Hoth, J. J.; Peyton, J. C.; Cheadle, W. G. A novel model of pneumonia from intraperitoneal injection of bacteria. *The American journal of surgery*, v. 186(5), p. 493-499, 2003.

Froeliger, E. H., Fives-Taylor, P. *Streptococcus parasanguis* fimbria-associated adhesin fap1 is required for biofilm formation. *Infect. Immun.*, v.69, p.2512–2519, 2001.

Fry, R.M. Fatal Infections by Haemolytic Streptococcus Group B. The *Lancet*, v. 1, p. 199-201, 1938.

Frydrych, L. M.; Fattahi, F.; He, K.; Ward, P. A.; Delano, M. J. Diabetes and Sepsis: Risk, Recurrence, and Ruination. *Frontiers*, v. 8, p.1 – 22, 2017.

Furman, B. L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology*, v. 70(1), p. 5-47, 2015.

Garufi, G., Butler, E., Missiakas, D. ESAT-6-like protein secretion in *Bacillus anthracis. J. Bacteriol.*, v.190, n.21, p.7004–7011, 2008.

Geerlings, S. E.; Hoepelman, A.I.M. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 26, n. 3-4, p. 259-265, 1999.

Gentile, L.F.; Cuenca, A.G.; Efron, P.A.; Ang, D.; Bihorac, A.; McKinley, B.A.; et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. J Trauma Acute Care Surg, v. 72, p. 1491-1501, 2012.

Georgieva, R. I., López, M. G., Ruiz-Morales, J., Martínez-Marcos, F. J., Lomas, J. M., Plata, A., Alarcón, A, et al.. *Streptococcus agalactiae* left-sided infective endocarditis. Analysis of 27 cases from a multicentric cohort. Journal of infection, v.61. n.1, p.54-59, 2010.

Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, F., Chevalier, L., Frangeul, T., Msadek, M., Zouine, E., Couvé, L., Lalioui, C., Poyart, P., Trieu-Cuot, F., Kunst, F. Genome sequence of Streptococcus agalactiae, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Molecular Microbiology*. v. 45, p. 1499-1513, 2002.

Gherardi, G., Imperi, M., Baldassarri, L., Pataracchia, M., Alfarone, G., Recchia, S., et al. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. J. Clin. Microbiol., v.45, p.2909–2916, 2007.

Gray, T. A., Clark, R. R., Boucher, N., Lapierre, P., Smith, C., Derbyshire, K. M. Intercellular communication and conjugation are mediated by ESX secretion systems in mycobacteria. *Science*, v.354, p.347-350, 2016.

Groschel, M.I, Sayes, F., Simeone, R., Majlessi, L., Brosch, R. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. Nat Rev Microbiol., v.14, n.11, p.677–691, 2016.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol. v. 186, p.1–85, 1990.

Harris, G.; KuoLee, R.; Xu, H. H.; Chen, W. Acute intraperitoneal infection with a hypervirulent Acinetobacter baumannii isolate in mice. *Scientific reports*, v. 9(1), p. 1-12, 2019

Hawe, R.S. Bacterial endocarditis – a review. Veterinary Medicine of Small Animal Clinician, p. 1569-1579, 1980

Hensler, M.E., et al. CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B Streptococcus. *Microb. Pathog.*, v. 44, n.1, p.84–88, 2008.

Hirai, N.; Kasahara, K.; Uno, K.; Ogawa, Y.; Ogawa, T.; Yonekawa, S.; Nakano, R.; et al. Infective endocarditis complicated by intraventricular abscesses, pericarditis and mycotic aneurysm due to and emerging strain of serotype VI Streptococcus agalactiae. Jpn. J. Infect. Dis., v. 70, p. 685-686, 2017.

Ho, Y. R.; Li, C. M.; Yu, C. H.; Lin, Y. J.; Wu, C. M.; Harn, I. C.; Wu, J. J. The enhancement of biofilm formation in Group B streptococcal isolates at vaginal pH. *Medical microbiology and immunology*, v. 202, p. 105-115, 2013.

Ho, B. T., Dong, T. G., Mekalanos, J. J. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe*, v.15, p.9–21, 2014.

Hodgson, K.; Morris, J.; Bridson, T.; Govan, B.; Rush, C.; Ketheesan, N. Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. *Immunology*, v. 144(2), p. 171-185, 2015.

Holland, T. L.; Baddour, L.M.; Bayer, A.S.; Hoen, B.; Miro, J.M.; Fowler Jr, V.G. Infective endocarditis. Nature Reviews, v. 2, p. 1-22, 2016.

Houben, E. N., Bestebroer, J., Ummels, R., Wilson, L., Piersma, S. R., Jimenez, C. R., Ottenhoff, T. H., Luirink, J., and Bitter, W. Composition of the type VII secretion system membrane complex. *Mol. Microbiol.*, v.86, p.472-484, 2012.

Hsu, J. F.; Tsai, M. H.; Lin, L. C.; Chu, S. M.; Lai, M. Y.; Huang, H. R.; Lu, J. J.; et al. Genomic characterization of serotype III/ST-17 Group B Streptococcus strains with antimicrobial resistance using whole genome sequencing. *Biomedicines.*, v. *9*, p. 1477, 2021.

Huang, T.T.; Tseng, F.Y.; Yeh, T.H.; Hsum C.J.; Chen, Y.S. Factors affecting the bacteriology of deep neck infection: a retrospective study of 128 patients. Acta Oto-Laryngologica, v. 126, p. 396-401, 2006.

Ippolito, D.L.; James, W.A.; Tinnemore, D.; Huang, R.R.; Dehart, M.J.; Williams, J.; Wingerd, M.A.; Demons, S.T. Group B streptococcus serotype prevalence in reproductive-age women at a tertiary care military medical center relative to global serotype distribution. BMC Infect Dis., v. 10, p. 336, 2010.

Jackson, L. A., Hilsdon, R., Farley, M. M., Harrison, L. H., Reingold, A. L., Plikaytis, B. D., Wenger, J. D., Schuchat, A. Risk Factors for Group B Streptococcal Disease in Adults. *Ann Intern Med.* v. 123, p. 415-420, 1995.

Johri, A.K., Paoletti, L.C., Glaser, P., Dua, M., Sharma, P.K., Grandi, G., et al. Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. Nat. Rev. Microbiol., v.4, n.12, p.932–942, 2006.

Jones, N. et al. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, p.2530–2536,2003.

Kahn, J.M.; Le, T.; Angus, D.C.; Cox, C.E.; Hough, C.L.; White, D.B.; et al. The epidemiology of chronic critical illness in the United States<sup>\*</sup>. Crit Care Med., v. 43, p. 282-287, 2015.

Kapoor, A.; Shintani, Y.; Collino, M.; Osuchowski, M.F.; Busch, D.; Patel N.S.; et al. Protective role of peroxisome proliferator-activated receptor- b/d in septic shock. Am J Respir Crit Care Med., v. 182, p. 1506-1515, 2010.

Kengmo Tchoupa, A.; Watkins, K. E.; Jones, R. A.; Kuroki, A.; Alam, M. T.; Perrier, S.; Unnikrishnan, M. The type VII secretion system protects Staphylococcus aureus against antimicrobial host fatty acids. *Scientific reports*, v. 10(1), p. 1-16, 2020.

Kenzel, S., Mergen, M., von Süßkind-Schwendi, J., Wennekamp, J., Deshmukh, S. D., Haeffner, M., Triantafyllopoulou, A., Fuchs, S., Farmand, S., et al. Insulin modulates the inflammatory granulocyte response to streptococci via phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* v. 189, p. 4442-4444, 2012.

Kimura, K. et al. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, p. 2890-2897, 2008.

Kneuper, H., Cao, Z.P., Twomey, K.B., Zoltner, M., Jager, F., Cargill, J.S., Chalmers, J., van der Kooi-Pol, M.M., van Dijl, J.M., Ryan, R.P., Hunter, W.N., Palmer, T. Heterogeneity in ess transcriptional organization and variable contribution of the Ess/Type VII protein secretion system to virulence across closely related *Staphylocccus aureus* strains. *Mol. Microbiol.*, v.93, p.928–943, 2014.

Kogan, G.; Uhrín, D.; Brisson, J.R.; Paoletti, L.C.; Blodgett, A.E.; Kasper, D.L.; Jennings, H.J. Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *J Biol Chem.*, v. 271, p. 8786-8790, 1996.

Konto-Ghiorghi, Y., Mairey, E., Mallet, A., Dume'nil, G., Caliot, E., et al. Dual Role for Pilus in Adherence to Epithelial Cells and Biofilm Formation in *Streptococcus agalactiae*. PLoS Pathog., v. 5, n.5, p.1-13, 2009.

Kothari, N.J., Morin, C.A., Glennen, A., Jackson, D., Harper, J., Schrag, S.J., Lynfield, R. Invasive group B streptococcal disease in the elderly, Minnesota, USA, 2003–2007. Emerg Infect Dis 15:1279–1281, 2009.

Lamagni, T.L.; Keshishian, C.; Efstratiou, A.; Guy, R.; Henderson, K.L.; Broughton, K.; et al. Emerging trends in the epidemiology of invasive group B streptococcal disease in England and Wales, 1991-2010. *Clin Infect Dis.*, v.57, p. 682-688, 2013.

Lamy, M. C., Dramsi, S., Billoet, A., Reglier-Poupet, H., Tazi, A., Raymond, J., et al. Rapid detection of the "highly virulent" group B Streptococcus ST-17clone. *Microbes Infect.*, v.8, p.1714–1722, 2006.

Lancefield, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, v. 57, n. 4, p. 571-595, 1933.

Lancefield, R.C., Hare, R. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic Streptococci from parturient women. *J. Exp. Med.*, v. 61, p. 335-349, 1935.

Lang, S., Palmer, M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. *J. Biol. Chem.*, v.278, n.40, p.38167–38173, 2003.

Lannes-Costa, P. S.; Baraúna, R. A.; Ramos, J. N.; Veras, J. F. C.; Conceição, M. V. R.; Vieira, V. V.; Nagao, P. E.; et al. Comparative genomic analysis and identification of pathogenicity islands of hypervirulent ST-17 Streptococcus agalactiae Brazilian strain. *Infection, Genetics and Evolution.*, v. 80, p. 104195, 2020.

Lannes-Costa, P. S.; de Oliveira, J. S. S.; da Silva Santos, G.; Nagao, P. E. A current review of pathogenicity determinants of Streptococcus sp. *Journal of Applied Microbiology*, v. 131(4), p. 1600-1620, 2021.

LaRock, C.N., Nizet, V. Inflammasome/IL-1β responses to streptococcal pathogens. *Front. Immunol.*, v. 6, p.1-11, 2015.

Lee, Bang-Ning et al. A cytokine-based neuroimmunologic mechanism of cancerrelated symptoms. *Neuroimmunomodulation*, v. 11, n. 5, p. 279-292, 2004.

Levent, F., Baker, C.J., Rench, M.A, Edwards, M.S. Early outcomes of group B streptococcal meningitis in the 21st century. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v. 29, n.11, p.1009-1012, 2010.

Levy, M.M.; Fink, M.P.; Marshall, J.C.; Abraham, E.; Angus, D.; et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.*, v. 29, p. 530–538, 2003.

Lin, J. N.; Chang, L. L.; Lai, C. H.; Lin, H. H.; Chen, Y. H. Clinical and molecular characteristics of invasive and noninvasive skin and soft tissue infections caused by group A Streptococcus. *Journal of clinical microbiology*, v. 49(10), p. 3632-3637, 2011.

Liu, S. F., Malik, A. B. NF-KB activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, v. 290, n. 4, p. L622-L645, 2006.

Lopardo, H. A., Vidal, P., Jeric, C., Centron, D., Paganini, H., Facklan, R. R., Elliot, J. Argentinian *Streptococcus* Study group. Six-month multicenter study on invasive infections due to group B streptococci in Argentina. *J Clinic Microb.* v. 41, p. 4688-4695, 2003.

Luster, A. D. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* v.338, p.436-445, 1998.

Manetti, A. G., Zingaretti, C., Falugi, F., Capo, S., Bombaci, M., Bagnoli, F., et al. *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol. Microbiol.*, v.64, p.968–983, 2007.

Manning, S. D., Springman, A. C., Lehotzky, E., Lewis, M. A., Whittam, T. S., Davies, H. D. Multilocus sequence types associated with neonatal group B streptococcal sepsis and meningitis in Canada. *J. Clin. Microbiol.*, v.47, p.1143–1148, 2009.

Maunders, E., Welch, M. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.364, n.13, p.1-10, 2017.

Martin, G.S.; Mannino, D.M.; Eaton, S.; Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med. v. 348, p. 1546-1554, 2003.

Martins, J.O.; Campos, C.A.L.; Cruz, J.W.M.C.; Manzolli, S.; Alves, V.A.F.; Vianna, E.O.; et al. Insulin modulates cytokine release and selectin expression in the early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats. BMC Pulm Med, v. 10, n. 39, 2010.

Martins, E.R.; Andreu, A.; Correia, P.; Juncosa, T.; Bosch, J.; Ramirez, M.; Melo-Cristino, J. Group B streptococci causing neonatal infections in barcelona are a stable clonal population: 18-year surveillance. *J Clin Microbiol*, v. 49, n. 8, p. 2911– 2918, 2011.

Marshall, J.C. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med*, v. 20, p. 195-203, 2014.

Mehra, A., Zahra, A., Thompson, V., Sirisaengtaksin, N., Wells, A., Porto, M., Koster, S., Penberthy, K., Kubota, Y., Dricot, A., Rogan, D., Vidal, M., Hill, D.E., Bean, A.J., Philips, J.A. *Mycobacterium tuberculosis* type VII secreted effector EsxH targets host ESCRT to impair trafficking. *PLoS Pathog.*, v.9:e1003734, 2013.

Mercer-Jones, M. A., Heinzelmann, M., Peyton, J.C., Wickel, D., Cook, M., Cheadle, W.G. Inhibition of neutrophil migration at the site of infection increases remote organ neutrophil sequestration and injury. *Shock*, v. 8, p.193–199, 1997.

Merx, M.W.; Weber, C.D. Sepsis and the heart. Circulation, v. 116, p. 793–802, 2007.

Miranda, P.S.D., Lannes-Costa, P.S., Pimentel, B.A.S., Silva, L.G., Ferreira-Carvalho, B.T., Menezes, G.C., Mattos-Guaraldi, A.L., Hirata, R.J., Mota, R.A., Nagao, P.E. Biofilm formation on different pH condition by Streptococcus agalactiae isolated from bovine mastitic milk. Lett. Appl. Microbiol., v.67, n.3, p.235-243, 2018.

Moltó-García, B., del Carmen, L-M.M., Cuadros-Moronta, E., Rodríguez-Granger, J., Sampedro-Martínez, A., Rosa-Fraile, M., et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of hemolytic *Streptococcus agalactiae* from post-menopausal women. *Maturitas*, v.85, p.5–10, 2016.

Mook-Kanamori, B. B.; Geldhoff, M.; van der Poll, T.; van de Beek, D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clinical microbiology reviews*, v. 24, n.3, p. 557-591, 2011.

Moscoso, M., Garcia, E., Lopez, R. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J. Bacteriol.*, v.188, p.7785–7795, 2006.

Motallebirad, T., Fazeli, H., Ghahiri, A., Shokri, D., Jalalifar, S., Moghim, S., Esfahani, B.N. Prevalence, population structure, distribution of serotypes, pilus islands and resistance genes among erythromycin-resistant colonizing and invasive *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from pregnant and non-pregnant women in Isfahan, Iran. *BMC Microbiology*, v. 21, n.139, p.1-11, 2021.

Navarro-Torne, A., Curcio, D., Moïsi, J.C., Jodar, L. Burden of invasive group B Streptococcus disease in non-pregnant adults: A systematic review and metaanalysis. *PLoS One*, v. 16, n. 9, p. 1-18, 2021.

Ness, T. L., Hogaboam, C.M., Strieter, R.M. Kunkel, S.L. Immunomodulatory role of CXCR2 during experimental septic peritonitis. *J. Immunol.*, v.171, p.3775–3784, 2003.

Netea, M.G., L.A. Joosten, E. Latz, K.H. Mills, G. Natoli, H.G. Stunnenberg, L.A. O'Neill, and R.J. Xavier. 2016. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science*, v.352, aaf1098, 2016.

Nielsen, T. B., Pantapalangkoor, P., Yan, J., Luna, B. M., Dekitani, K., Bruhn, K., Tan, B., Junus, J., Bonomo, R. A., et al. Diabetes Exacerbates Infection via Hyperinflammation by Signaling through TLR4 and RAGE. *American Society for Microbiology.* v. 8, p. 1-15, 2017.

Nguyen, L. M.; Omage, J. I.; Noble, K.; McNew, K. L.; Moore, D. J.; Aronoff, D. M.; Doster, R. S. Group B streptococcal infection of the genitourinary tract in pregnant and non-pregnant patients with diabetes mellitus: An immunocompromised host or something more? *American Journal of Reproductive Immunology*., v. 86, p. 13501, 2021.

Olokoba, A. B.; Obateru, O. A.; Olokoba, L. B. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman medical journal*, v. 27, p. 269, 2012.

O'neill, A.M.; Thurston, T.L.M.; Holden, D. W. Cytosolic replication of group A Streptococcus in human macrophages. *MBio*, v. 7, n. 2, p. e00020-16, 2016.

Oppmann, Birgit et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, v. 13, n. 5, p. 715-725, 2000.

Palmeiro JK, Dalla-Costa LM, Fracalanzza SEL, Botelho ACN, Nogueira KS, Scheffer MC, Torres ARLS, Carvalho NS, Cogo LL, Madeira HMF. Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in southern Brazil. *J Clin Microbiol.* v. 12, p. 4397-4403, 2010.

Panikkath, D.; Tantrachoti, P.; Panikkath, R.; Nugent, K. *Streptococcus agalactiae* pyomyositis in diabetes mellitus. Proc, v. 29, n.3, p. 290-291, 2016.

Paulson, T. Epidemiology: a mortal foe. *Nature*, v.502, p.S2–S3, 2013.

Parks, T.; Barrett, L.; Jones, N. Invasive streptococcal disease: a review for clinicians. *British Medical Bulletin*, v. 115, p. 77-89, 2015.

Patras, K. A.; Doran, K. S. A murine model of group B Streptococcus vaginal colonization. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. (117), p. e54708, 2016.

Pérez-Moreno, M.O., Picó-Plana, E., Grande-Armas, J., Centelles-Serrano, M.J., Arasa-Subero, M., Ochoa, N.C., Led By Mo Pérez-Moreno MOTSGG. Group B streptococcal bacteriuria during pregnancy as a risk factor for maternal intrapartum colonization: a prospective cohort study. *J. Med. Microbiol.*, v.66, p.454–460, 2017.

Patras, K.A.; Doran, K.S. A murine model of group B Streptococcus vaginal colonization. *JoVE*, n. 117, p. e54708, 2016.

Pezzicoli, A., Ruggiero, P., Amerighi, F., Telford, J. L., and Soriani, M. Exogenous sialic acid transport contributes to group B streptococcus infection of mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.*, v.206, p.924–931, 2012.

Phares, C.R., Lynfield, R., Farley, M.M., Mohle-Boetani, J., Harrison, L.H., Petit, S., Craig, A.S., Schaffner, W., Zansky, S.M., Gershman, K., Stefonek, K.R., Albanese, B.A., Zell, E.R., Schuchat, A., Schrag, S.J. Active Bacterial Core surveillance/Emerging Infections Program Network. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005. *JAMA*, v.299, p.2056–2065, 2008.

Pietrella D, Rachini A, Pines M, Pandey N, Mosci P, et al. Th17 Cells and IL-17 in Protective Immunity to Vaginal Candidiasis. PLoS ONE, v.6, n.7, e22770, 2011.

Pimentel, B. A. S, Martins, C. A. S., Mendonça, J. C., Miranda, P. S. D., Sanches, G. F., Mattos-Guaraldi, A. L., Nagao, P. E. Streptococcus agalactiae infection in câncer patients: a five-year study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* v. 35, p. 927-933, 2016.

Pompeu, F.R. Endocardite Bacteriana – Parte I. 2003. Disponível em <a href="http://www.medicina.ufmg.br/edump/clm/endocar1.htm">http://www.medicina.ufmg.br/edump/clm/endocar1.htm</a> . Acesso em: 30 de janeiro de 2022.

Phoompoung, P.; Pirogard, N.; Leelaporn, A.; Angkasekwinai, N. Incidence of invasive Group B Streptococcus (iGBS) infections and the factors associated with iGBS mortality in adults during 2013–2017: a retrospective study at Thailand's largest national tertiary referral center. *Annals of Medicine*, v. 53(1), p. 715-721, 2021.

Raabe, V.N., Shane, A.L. Group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiol. Spectr.*, v.7, n.2, p.1-21, 2019.

Rajagopal, L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiol.* v. 4, p. 201-221, 2009.

Rajagopalan, S. Serious Infections in Elderly Patients with Diabetes Mellitus. *Clin Infect Dis.* v. 40, p. 990-996, 2005.

Rapisarda, C., Tassinari, M., Gubellini, F., Fronzes, R. Using cryo-EM to investigate bacterial secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.72, p.231–254, 2018.

Ratzke, C.; Denk, J.; Gore, J. Ecological suicide in microbes. *Nature ecology & evolution*, v. 2, p. 867-872, 2018.

Rayfield, E. J.; Ault, M. J.; Keusch, G. T.; Brothers, M. J.; Nechemias, C.; Smith, H. Infection and diabetes: the case for glucose control. *The American journal of medicine*, v. 72(3), p. 439-450, 1982.

Ritzman, A. M., Hughes-Hanks, J. M., Blaho, V. A., Wax, L. E., Mitchell, W. J., & Brown, C. R. The chemokine receptor CXCR2 ligand KC (CXCL1) mediates

neutrophil recruitment and is critical for development of experimental Lyme arthritis and carditis. Infection and immunity, v.78, n.11, p.4593-4600, 2010.

Rivera-Calzada, A., Famelis, N., Liorca, O., Geibel, S. Type VII secretion systems: structure, functions and transport models. *Nat. Rev.*, v.19, p.567-584, 2021.

Rollán, M. J., San Román, J. A., Vilacosta, I., Sarriá, C., López, J., Acuña, M., & Bratos, J. L. Clinical profile of *Streptococcus agalactiae* native valve endocarditis. American heart journal, v. 146, n. 6, p. 1095-1098, 2003.

Rosenberg, O. S., Dovala, D., Li, X., Connolly, L., Bendebury, A., Finer-Moore, J., Holton, J., Cheng, Y., Stroud, R. M., and Cox, J. S. Substrates Control Multimerization and Activation of the Multi-Domain ATPase Motor of Type VII Secretion. *Cell*, v.161, p.501-512, 2015.

Rosini, R., Margarit, I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v.5, n.6, p.1-4, 2015.

Russell, N. J.; Seale, A. C.; O'Driscoll, M.; O'Sullivan, C.; Bianchi-Jassir, F.; Gonzalez-Guarin, J.; et al. Maternal colonization with group B Streptococcus and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clinical infectious diseases*, v. 65(suppl\_2), p. S100-S111, 2017.

Sadarangani, M. Protection Against Invasive Infections in Children Caused by Encapsulated Bacteria. Frontiers, v. 9, p. 1-9, 2018.

Salloum, M.; van der Mee-Marquet, N.; Valentin-Domelier, A.S.; Quentin, R. Diversity of prophage DNA regions of Streptococcus agalactiae clonal lineages from adults and neonates with invasive infectious disease. *PLoS One*, v. 6, n. 5, p. 1 – 12, 2011.

Sambola, A.; Miro, J.M.; Tornos, M.P.; Almirante, B.; Moreno-Torrico, A.; Gurgui, M.; et al. Streptococcus agalactiae infective endocarditis: Analysis of 30 cases and review of the literature, 1962-1998. Clin Infect Dis, v. 34, n. 12, p. 1576-1584, 2002.

Sanches, G.F, Lannes-Costa, P.M., Cristoforêto, M.C., Doran, K.S., Mattos-Guaraldi, A.L., Nagao, P.E. Streptococcus agalactiae strains isolated from cancer patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.52, p.303-310, 2021.

Schrag, S.J.; Phil, D.; Zywicki, S.; Farley, M.M.; Reingold, A.L.; Harrison, L.H.; Lefkowitz L.B.; Hadler, J.L.; Danila, R.; Cieslak, P.R.; Schuchat, A. Group B Streptococcal Disease in the Era of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis. *N Engl J Med.*, v. 342, p. 15-20, 2000.

Schuchat, A. Epidemiology of group B Streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 11, p. 497-513, 1997.

Seki, T., Kimura, K., Reid, M.E., Miyazaki, A., Banno, H., Jin, W., Wachino, J., Yamada, K., Arakawa, Y. High isolation rate of MDR group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.70, p.2725– 2728, 2015. Shabayek, S., Spellerberg, B. Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. *Front. Microbiol.*, v.9, n.437, p.1-14, 2018.

Shabayek, S., Koga, T., Aoki, W., Fujii, M., Satou, K., Ikeda, Y. Spontaneous Infection Caused by *Streptococcus agalactiae* in KK-A<sup>y</sup> Mice. *American Association for Laboratory Animal Science*. v. 67, p. 416-419, 2017.

Siegrist, M. S., Steigedal, M., Ahmad, R., Mehra, A., Dragset, M. S., Schuster, B. M., Philips, J. A., Carr, S. A., and Rubin, E. J. Mycobacterial Esx-3 requires multiple components for iron acquisition. *mBio*, v.5, p.e01073-01014, 2014.

Singer, M.; Deutschman, C.S.; Seymour, C.W.; et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). JAMA, v. 315, p. 801–810, 2016.

Skoff, T.H., Farley, M.M., Petit, S., et al. Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *Clin. Infect. Dis.*, v.49, n.1, p.85–92, 2009.

Slotved, H.C.; Kong, F.; Lambertsen, L.; Sauer, S. and Gilbert, G. L. Serotype IX, a proposed new Streptococcus agalactiae serotype. *J. Clin. Micobiol.* v. 45, p. 2929-2936, 2007.

Sorensen, A.L., Nagai, S., Houen, G., Andersen, P., Andersen, A.B. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun., v.63, n.5, p.1710–1717, 1995.

Sørensen, U. B. S., Poulsen, K., Ghezzo, C., Margarit, I., and Kilian, M. Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. mBio., v.1, p.e00178-10, 2010.

Souza, V. C. et al. Antimicrobial susceptibility and genetic diversity of Streptococcus agalactiae recovered from newborns and pregnant women in Brazil. 2013. Disponível em: <a href="https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/7091">https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/7091</a>. Acesso em: 15 jan. 2022.

Spencer, B.L., Tak, U., Mendonça, J.C., Nagao, P.E., Niederweis, M., Doran, K.S. A type VII secretion system in Group B Streptococcus mediates cytotoxicity and virulence. *PLoS Pathog.*, v.17, n.12, p.1-25, 2021.

Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., Wondrack, L. Detection of erythromycinresistant determinants by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.40, n.11, p.2562– 2566, 1996.

Tazi, A., Disson, O., Bellais, S., Bouaboud, A., Dmytruk, N., Dramsi, S., et al. The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *J. Exp. Med.*, v.207, p.2313–2322, 2010.

Tchatalbachev, S., Ghai, R., Hossain, H., Chakraborty, T. Gram-positive pathogenic bacteria induce a common early response in human monocytes. *BMC microbiol.*, v.10, n.1, p.1-13, 2010.

Thigpen, M.C.; Whitney, C.G.; Messonnier, N.E.; Zell, E.R.; Lynfield, R.; Hadler, J.L.; et al. Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. N Engl J Med., v. 364, p. 2016-2025, 2011.

Thompson, D. M.; Meloche, M.; Ao, Z.; Paty, B.; Keown, P.; Shapiro, R. J.; Warnock, G. L.; et al. Reduced progression of diabetic microvascular complications with islet cell transplantation compared with intensive medical therapy. *Transplantation*, v. 91(3), p. 373-378, 2011.

Tinaztepe, E., Wei, J-R., Raynowska, J., Portal-Celhay, C., Thompson, V., Philips, J.A. Role of Metal-Dependent Regulation of ESX-3 Secretion in Intracellular Survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.*, v.84, n.8, p.2255-2263, 2016.

Tiwari, S.; Pratyush, D.D.; Gahlot, A.; Singh, S.K. Sepsis in diabetes: a bad duo. *Diabetes Metab Syndr.* v. 5, p. 222-227, 2011.

Trunz, B. B., Fine, P., and Dye, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet*, v.367, p.1173-1180, 2006.

Ueno, H.; Yamamoto, Y.; Yamamichi, A.; Kikuchi, K.; Kobori, S.; Miyazaki, M. Characterization of group B streptococcus isolated from women in Saitama city, Japan. Jpn J Infect Dis., v. 65, n. 6, p. 516–521, 2012.

van Winden, V. J. C., Houben, E. N. G., Braunstein, M. Protein Export into and across the Atypical Diderm Cell Envelope of Mycobacteria. *Microbiol Spectr.*, v. 7, 2019.

Vasikasin, V.; Changpradub, D. Clinical manifestations and prognostic factors for Streptococcus agalactiae bacteremia among nonpregnant adults in Thailand. *Journal of Infection and Chemotherapy.*, v. 27, p. 967-971, 2021.

Verani, J.R.; McGee, L.; Schrag, S.J.; et al. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease–Revised Guidelines From CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep.*, v. 59, n. RR-10, p. 1-36, 2010.

Villar, H. E., Jugo, M. B. Emergence of high-level resistance to gentamicin and streptomycin in Streptococcus agalactiae in Buenos Aires, Argentina. *Rev Esp Quimiroter.* v. 26, p. 112-115, 2013.

Villareal, K.; Goslin, A.; Bajracharya, H. Group B Streptococcus Meningitis Associated with Acute Otitis Media in an Adult Patient. *The American Journal of Case Reports*, v. 22, p. e933093-1, 2021.

Wang, H. E.; Moore, J. X.; Donnelly, J. P.; Levitan, E. B.; Safford, M. M. Risk of acute coronary heart disease after sepsis hospitalization in the REasons for Geographic and Racial Differences in Stroke (REGARDS) cohort. Sepsis and Acute CHD. v. 65, n. 1, p. 29-36, 2017.

Warne, B. et al. The Ess/Type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* shows unexpected genetic diversity. BMC Genomics, v.17, n.222, 2016.

Warne, B.; Harkins, C. P.; Harris, S. R.; Vatsiou, A.; Stanley-Wall, N.; Parkhill, J.; Holden, M. T. The Ess/Type VII secretion system of Staphylococcus aureus shows unexpected genetic diversity. *BMC genomics*, v. 17(1), p. 1-13, 2016

WHO. Group B Streptococcus infection causes an estimated 150,000 preventable stillbirths and infant deaths every year. *Immunization, Vaccines Biol*, 2017.

Wimpenney, J. et al. The Physiology and biochemistry of biofilme. In: Characklis, W. G. e Wilderer, P. A. eds. Structure and Function of Biofilms. *Dahlem Workshop, John Wiley and Sons*, Inc. p.111-127, 1993.

Yang, Q.; Porter, A. J.; Zhang, M.; Harrington, D. J.; Black, G. W.; Sutcliffe, I. C. The impact of pH and nutrient stress on the growth and survival of Streptococcus agalactiae. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 102, p. 277-287, 2012.

Yannam, G.R., Gutti, T., Poluektova, L.Y. IL-23 in infections, inflammation, autoimmunity and cancer: possible role in HIV-1 and AIDS. J. *Neuroimmune Pharmacol.*, v.7, p. 95-112, 2012.

Zhang, Y., W. Cai, Q. Huang, Y. Gu, Y. Shi, J. Huang, F. Zhao, Q. Liu, X. Wei, M. Jin, C. Wu, Q. Xie, Y. Zhang, B. Wan, and Y. Zhang. Mesenchymal stem cells alleviate bacteria-induced liver injury in mice by inducing regulatory dendritic cells. *Hepatology*, v.59, p.671–682, 2014.

Zhu, L.; Yerramilli, P.; Pruitt, L.; Mishra, A.; Olsen, R. J.; Beres, S. B.; Musser, J. M. Functional insights into the high-molecular-mass penicillin-binding proteins of Streptococcus agalactiae revealed by gene deletion and transposon mutagenesis analysis. *Journal of Bacteriology*, v. 203(17), p. e00234-21, 2021.

Zoubi, S. A.; Chen, J.; Murphy, C.; Martin, L.; Chiazza, F.; Collotta, D.; Yaqoob, M. M.; Thiemermann, C. Linagliptin attenuates the cardiac dysfunction associated with pre-existing type 2 diabetes by inibiting NF-κB. Frontiers in Immunology, v. 8, p. 1-13, 2018.

Zuckerman, S. H.; Evans, G. F.; Guthrie, L. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms involved in the differential expression of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA. *Immunology*, v. 73, n. 4, p. 460, 1991.

Zwijnenburg, P.J.G., van der Poll, T., Roord, J.J., van Furth, A.M. Chemotactic Factors in Cerebrospinal Fluid during Bacterial Meningitis. Infect. Immun., v.74, n.3, p.1445-1451, 2006.

ANEXO A – Artigo científico públicado durante o doutorado: A type VII secretion system in Group B Streptococcus mediates cytotoxicity and virulence

### **PLOS PATHOGENS**

RESEARCH ARTICLE

# A type VII secretion system in Group B *Streptococcus* mediates cytotoxicity and virulence

Brady L. Spencer<sub>©</sub><sup>1</sup>, Uday Tak<sub>©</sub><sup>2¤</sup>, Jéssica C. Mendonça<sup>1,3</sup>, Prescilla E. Nagao<sup>3</sup>, Michael Niederweis<sub>©</sub><sup>2</sup>, Kelly S. Doran<sub>©</sub><sup>1</sup>\*

1 University of Colorado Anschutz Medical Campus, Department of Immunology and Microbiology, Aurora, Colorado, United States of America, 2 University of Alabama at Birmingham, Department of Microbiology, Birmingham, Alabama, United States of America, 3 Rio de Janeiro State University, Roberto Alcântara Gomes Biology Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Current address: University of Colorado Boulder, Department of Biochemistry, Boulder, CO, United States of America

\* kelly.doran@cuanschutz.edu

#### Abstract

Type VII secretion systems (T7SS) have been identified in Actinobacteria and Firmicutes and have been shown to secrete effector proteins with functions in virulence, host toxicity, and/or interbacterial killing in a few genera. Bioinformatic analysis indicates that isolates of Group B Streptococcus (GBS) encode at least four distinct subtypes of T7SS machinery, three of which encode adjacent putative T7SS effectors with WXG and LXG motifs. However, the function of T7SS in GBS pathogenesis is unknown. Here we assessed the role of the most abundant GBS T7SS subtype during GBS pathogenesis. In a murine model of hematogenous meningitis, mice infected with GBS lacking a functional T7SS or lacking the secreted WXG100 effector EsxA exhibited less mortality, lower bacterial burdens in tissues, and decreased inflammation in the brain compared to mice infected with the parental GBS strain. We further showed that this T7SS induces cytotoxicity in brain endothelium and that EsxA contributes to these cytotoxicity phenotypes in a WXG motif-dependent manner. Finally, we determined that EsxA is a pore-forming protein, thus demonstrating the first role for a non-mycobacterial EsxA homolog in pore formation. This work reveals the importance of a T7SS in host-GBS interactions and has implications for T7SS effector function in other Gram-positive bacteria.

#### Author summary

Group B *Streptococcus* (GBS) is an important human pathogen that is a leading cause of invasive disease in newborns and certain adult populations, including pregnant women, the elderly, and those with diabetes. During pregnancy, asymptomatically colonizing GBS in the female genital tract can be transmitted to the fetus or newborn and can result in neonatal meningitis upon GBS disruption of the blood-brain barrier (BBB). GBS encodes a type VII secretion system (T7SS), which may allow export of proteins and/or toxins that



#### OPEN ACCESS

Citation: Spencer BL, Tak U, Mendonça JC, Nagao PE, Niederweis M, Doran KS (2021) A type VII secretion system in Group B *Streptococcus* mediates cytotoxicity and virulence. PLoS Pathog 17(12): e1010121. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010121</u>

Editor: Michael R. Wessels, Boston Children's Hospital, UNITED STATES

Received: July 7, 2021

Accepted: November 16, 2021

Published: December 6, 2021

Copyright: © 2021 Spencer et al. This is an open access article distributed under the terms of the <u>Creative Commons Attribution License</u>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its <u>Supporting</u> Information files.

Funding: Funding for this work was provided by NIH/NIAID F32 Al143203 to BLS (https://www.nih. gov/), NIH/NIAID R01 Al153332 and NIH/NINDS R01 NS116716 to KSD (https://www.nih.gov/), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 to JCM (https://www.gov.br/capes/pt-br). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

promote BBB disruption; however, the GBS T7SS has not been studied. Here we show that GBS encodes four types of T7SSs and that the most prevalent subtype is important for GBS meningitis progression, possibly by inducing inflammation and cell death in the brain. We also show that a secreted T7SS effector protein, EsxA, contributes to GBS pathogenesis and can form pores in lipid membranes. This is the first demonstration of EsxAmediated pore-formation in Gram-positive bacteria.

#### Introduction

Bacteria utilize secretion systems to respond to changes in environment, defend against interbacterial killing, acquire nutrients, exchange genetic material, and promote virulence within the host [1,2]. To date, several secretion systems have been identified in bacteria, but the majority are encoded by Gram-negative organisms. The type VII secretion system (T7SS) was discovered in *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), in which core machinery components assemble in the inner membrane and utilize an ATPase to drive secretion of typically small,  $\alpha$ -helical proteins lacking traditional signal peptides [3]. These proteins are approximately 100 amino acids in length and center a tryptophan-variable-glycine (WXG) motif within the hairpin loop between two  $\alpha$ -helices; they are designated WXG100 proteins and are now considered canonically secreted factors of T7SSs [4–6]. The five ESX systems in Mtb [3] secrete at least 22 WXG100 proteins [Z] and have been implicated in a number of functions, including phagosomal rupture and macrophage intracellular survival [8,9], toxin secretion [10] and nutrient acquisition [11].

Improvements in next generation sequencing techniques have facilitated the identification of additional T7SS loci in other Actinobacteria (T7SSa) and in Firmicutes (T7SSb) based on homology of ATPase- and WXG100 protein-encoding genes [7]. In Firmicutes, the mechanism and components of the T7SSb have been most extensively studied in *Staphylococcus aureus* [12–16], in which the core machinery consists of four membrane proteins: EsaA, EssA, EssB, and EssC, as well as a cytoplasmic protein, EsaB [17,18]. While deletion of any one of these core components can abrogate T7SSb activity [13,19,20], the hexameric, membrane-bound ATPase EssC is considered the driver of T7SSb, of which the ATP-binding domains in the C-terminal region are required for substrate secretion and the C-terminal region is also necessary for substrate recognition and specificity [15,21,22]. It has been shown in several Gram-positive bacterial species that the C-terminal sequence of EssC is highly variable across strains, and each EssC variant is accompanied by a unique set of putative secreted effector-encoding genes [17,23,24]. Thus, it is likely that the function of a given T7SS in interbacterial competition or virulence is determined at the level of its secreted effectors.

Despite variation in EssC sequence and putative effector repertoires between strains and bacterial species, genomic analyses indicate that T7SSb loci encode relatively conserved core components (including the N-terminus of EssC) as well as homologs of the WXG100 protein EsxA, a widely studied T7SS substrate [12,17,25,26]. Increasing numbers of reports have shown a role for the T7SSb and/or EsxA in the pathogenesis of several Gram-positive bacteria [12,27–30]; however, T7SSb has not yet been characterized in the important pathogen *Strepto-coccus agalactiae* (also known as Group B *Streptococcus*, GBS). GBS is a  $\beta$ -hemolytic strepto-coccal species and the leading etiologic agent of bacterial meningitis in neonates [31–33]. GBS exists primarily as an asymptomatic colonizer of the gastrointestinal and female reproductive tracts but can cause disease in newborns upon its transmission from the vaginal tract of the mother *in utero* or during birth [34,35]. In the newborn, GBS can infect the lungs or blood to

cause pneumonia and bacteremia, and in some cases may penetrate the brain resulting in meningitis [36,37]. GBS infection among other immunocompromised populations such as elderly adults or adults with cancer or diabetes is also rising in prevalence [38-40]. While many factors have been identified that mediate the physical interaction of GBS with the brain endothelial cells that constitute the blood-brain barrier (BBB) [41], the mechanisms by which GBS damages or breaks down that endothelial barrier are still being elucidated.

Herein, we characterize the T7SSb in GBS. We show by genomic analysis of available whole genome sequences that the GBS T7SS can be divided into at least four subtypes based on the C-terminus of EssC. The GBS T7SS subtype I is the most prevalent, representing >50% of all isolates analyzed. Using an example subtype I GBS strain, CJB111, we show that deletion of the ATPase-encoding gene, *essC*, mitigates virulence and GBS-induced inflammation in the brain, as well as cell death in brain endothelial cells, and that these phenotypes are dependent on the secreted T7SS substrate EsxA. We further show that the EsxA WXG motif is required for cytotoxicity in brain endothelium and that EsxA is a pore-forming protein. Our study provides the first experimental evidence indicating the T7SS promotes GBS pathogenesis and is the first to demonstrate a role for a non-mycobacterial EsxA homolog in pore formation.

#### Results

#### Identification of four GBS T7SS subtypes based on EssC protein sequence

As a T7SS for major neonatal pathogen GBS has not been described, we analyzed closed genome sequences from GBS isolates for the presence of T7SS core genes and putative effectors. We observed an extensive amount of genetic diversity in T7SS operons regarding sequence homology of essC as well as the presence of putative T7SS effectors, including esxA homologs and putative LXG toxin-encoding genes. To determine which GBS T7SS subtype might be most prevalent, we examined the C-terminal 225 amino acids of EssC. In S. aureus and Listeria monocytogenes, the EssC C-terminus is the point at which the protein sequence diverges into distinct EssC variants, and each associate with unique downstream putative effector-encoding genes [15,24]. We observed that the 80 GBS whole genome sequenced isolates that encode the 225 C-terminal amino acids of EssC (S1 Table) can be divided into at least four subtypes, the majority of which (46/80; 57.5%) encode an EssC variant that we now classify as subtype I (Fig 1A and 1B). While the full protein sequences between GBS EssC variants did not vastly differ (~89-98% identity), GBS EssC variants exhibited less homology to the four EssC variants identified in S. aureus [17] (~42% identity) and the seven EssC variants identified in L. monocytogenes [24] (~48% identity) (SIA Fig and S2 Table). Further, BLAST analysis of the putative T7SS effector-encoding genes downstream of EssC1 in subtype I strain CJB111 (Fig 1C) revealed little to no homology to the downstream putative effectors encoded in other GBS subtypes or those encoded in S. aureus or L. monocytogenes (examples of GBS strains from each subtype are shown in S1B Fig). Despite this low sequence identity, however, some proteins encoded in this region contain similar conserved domains/motifs across GBS T7SS subtypes and thus may have conserved function (as was hypothesized in S. aureus [17]). Aside from the highly conserved EsxA effector encoded upstream of the T7SS locus, the genes found most commonly across GBS subtypes were those encoding DUF4176 domain-containing proteins (S1B Fig), which are located slightly downstream of putative LXG effector encoding genes across GBS T7SS subtype I-III.

#### Deletion of essC from GBS T7SS subtype I strain, CJB111

As the majority of GBS strains are in subtype I, we utilized neonatal isolate CJB111 as an example subtype I strain to study the role of the GBS T7SSb in virulence. In addition to EssC,

#### PLOS PATHOGENS

GBS T7SS mediates virulence





https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010121.g001

CJB111 encodes putative T7SSb core components, of which EssB, and EsaB are homologous to those found in *S. aureus* genomes (Fig 1C). CJB111 also encodes two copies of the WXG100 protein-encoding gene *esxA* upstream of the T7SS core genes (designated as *esxA1* and *esxA2* as they are 95% identical to each other) and additional putative T7SS effectors (including an LXG-domain containing protein) downstream of the T7SS core genes (Fig 1C). In *S. aureus*, the EssC ATPase has been characterized as the driver of T7SS secretion and deletion of this gene abrogates secretion of all T7SS substrates [12,19]; we hypothesized that EssC might have

a similar role in GBS and thus deleted *essC* from CJB111 to assess the contribution of T7SS to GBS pathogenesis. The  $\Delta essC$  deletion strain was complemented using an overexpression plasmid and these strains were confirmed to have the expected expression levels of *essC* (S2A Fig).

#### T7SS contributes to virulence and meningitis development

To assess if the GBS T7SS is important for virulence *in vivo*, we infected CD1 mice with CJB111 or CJB111 $\Delta essC$  via tail vein injection and assessed survival and meningitis progression. Mice displaying neurological symptoms, such as paralysis or seizures, as well as those found moribund were sacrificed. Mice injected with CJB111 became moribund much more quickly than those infected with the  $\Delta essC$  mutant. By 36 hours post-infection, approximately 55% of the CJB111-infected mice had succumbed to infection compared to just 5% of those infected with the  $\Delta essC$  mutant (Log rank test, p = 0.0001, \*\*\*; Fig 2A). To assess the impact of the T7SS on GBS burden during infection, blood and various tissues were isolated, homogenized and plated to enumerate CFU (Fig 2B–2D). Significantly less bacteria were observed in the blood and heart of  $\Delta essC$ -infected mice (Fig 2B and 2C) implicating CJB111 T7SS in virulence of GBS. However, we did not observe a significant effect of the T7SS on bacterial burden in the brain (Fig 2D). This is consistent with our finding that the  $\Delta essC$  mutant exhibited a similar ability to adhere to, invade, and survive in human cerebral microvascular endothelial



**Fig 2. CJB111 T7SS mediates virulence in a model of hematogenous meningitis. a)** Survival curve of 8 week-old CD1 male mice tail-vein injected with CJB111 (n = 26) or CJB111 $\Delta esc$  (n = 23). Graph shows combined survival curves of three independent experiments, all of which ended at 52 hours post-infection. Statistics reflect the Log rank (Mantel-Cox) test, p < 0.001, \*\*\*. Recovered CFU counts from the **b**) blood **c**) heart, and **d**) brain tissue of infected mice. **e**) KC protein levels quantified from infected brain tissue by ELISA, and **f**) normalized to the log<sub>10</sub> CFU within each brain. In panels **b**-f, each dot represents one mouse and all three independent experiments' data are combined in these figures. Plots show the median. Statistics represent the Mann Whitney U test. p < 0.05, \*; p < 0.01, \*\*.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010121.g002

cells (hCMEC), which we used as an *in vitro* model for the BBB [42] (S2B–S2D Fig). Because meningitis is an inflammatory disease, we hypothesized that CJB111 might elicit a heightened inflammatory response in the brains of infected mice, despite the relatively equivalent bacterial load observed in CJB111- and  $\Delta essC$  mutant-infected mice. Using ELISA to quantify protein levels in brain tissue, we observed that mice infected with CJB111 had significantly higher amounts of the neutrophil chemokine KC (an early indicator of meningitis development) in brain tissue than those infected with the  $\Delta essC$  mutant (Fig 2E). Further, when KC protein levels were normalized to the bacterial CFU within the same tissue, brains of CJB111-infected mice exhibited higher levels of KC protein compared to brains of  $\Delta essC$  mutant-infected mice (Fig 2F). This demonstrates that even at equivalent bacterial tissue burden, T7SS-sufficient CJB111 elicits more inflammation in the brain compared to the  $\Delta essC$  mutant, which may promote the large survival differences observed between groups during meningitis progression.

#### CJB111 T7SS induces cell death in brain endothelial cells

Damage to host endothelium occurs during bacterial infection and sepsis [43,44] and can exacerbate disease progression and result in multi-organ failure [45]. The T7SS in other organisms, such as S. aureus, is known to secrete toxins that target the host [16]. To determine if GBS T7SS induces endothelial cell death, we measured cytotoxicity induced by CJB111, CJB111AessC mutant, and complemented strains in hCMEC using lactate dehydrogenase (LDH) release assays (see Materials and Methods). CJB111 induced approximately 70% cytotoxicity after an infection of MOI 10 for 4–5 hours, while cytotoxicity caused by the  $\Delta essC$ mutant was significantly reduced (~40%). This phenotype was complemented by expression of essC in the AessC mutant (Fig 3A). This T7SS-mediated cytotoxicity was largely contact-dependent as experiments in which the bacteria and cells were separated by a 0.4 µm transwell resulted in minimal LDH release (~4% cytotoxicity), approximately 17 times lower than the cytotoxicity observed during normal infection by CJB111 (Fig 3B). However, even this slight level of contact-independent cytotoxicity was T7SS-dependent as the AessC mutant did not induce detectable levels of cytotoxicity compared to untreated cells (Fig 3B). These data indicate that the CJB111 T7SS mediates cell death responses in brain endothelium that may translate to poor outcomes during in vivo infection models.



**Fig 3. CJB111 T7SS elicits cell death in human cerebral microvascular endothelial cells. a)** hCMEC cytotoxicity calculated based on LDH release assay. Supernatant was collected from hCMECs infected with CJB111+pDC, CJB111AessC+pDC, and CJB111AessC+pDCessC at MOI 10, 4–5 hours post-infection. Percent cytotoxicity was calculated based on 0% (uninfected) and 100% (+lysis buffer) lysis controls. **b)** Contact-independent cytotoxicity in hCMECs during GBS infection using 0.4 µm polycarbonate transwells in which GBS and cells were separated by the porous membrane. Cytotoxicity was measured 24 hours later. Supernatant from hCMEC compartments were plated after the experiment to ensure no bacterial contamination. Statistics reflect the repeated-measures one way ANOVA with Tukey's multiple comparisons, p < 0.05, \*; p < 0.01, \*\*. Data represent the mean of three independent experiments and error bars represent standard error of the mean.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010121.g003

### CJB111 WXG100 protein EsxA homologs in other T7SS-encoding bacteria and other GBS isolates

The most conserved T7SS effector described in the literature is ESAT-6 (early secreted antigenic target of 6 kDa; also known as EsxA), which was the first identified secreted substrate of the Mtb T7SS ESX-1 [46,47]. EsxA orthologs are encoded across Actinobacteria and Firmicutes and retain a similar antiparallel hairpin structure despite large differences in sequence identity [4]. GBS strain CJB111 encodes two adjacent EsxA homologs that are 95% identical to each other and are located immediately upstream of the T7SS locus (Fig 1C). We performed BLAST analysis to compare the CJB111 EsxA1 against orthologs in other species in which the T7SS has been studied: Mtb (H37Rv) [46], S. aureus (USA300 strain FSRP357) [13], Enterococcus faecalis (OG1RF) [28], L. monocytogenes (EGD-e) [48], Bacillus subtilis (PY79) [49], Streptococcus intermedius (B196) [29], Streptococcus suis (GZ0565) [50], and Streptococcus gallolyticus (TX20005) [30]. CJB111 EsxA1 shared the least identity with Mtb EsxA (18%) and was more similar to S. aureus EsxA (49% identical) than to S. intermedius or E. faecalis EsxAs (33% and 32% identical, respectively), despite the fact that Streptococcus and Enterococcus are more phylogenetically similar overall [51]. Unsurprisingly, CJB111 EsxA1 displayed high identity with EsxA expressed by streptococcal species S. suis and S. gallolyticus (65 and 66% identical, respectively) (Fig 4A).





**Fig 4. Canonical T7SS substrate EsxA is conserved across T7SSa and T7SSb loci. a)** ClustalW alignments and percent identity matrix of EsxA protein sequences from Mtb (H37Rv; accession CP003248.2), *E. faecalis* (OG1RF; accession CP002621.1), *S. intermedius* (B196; accession NC\_022246.1), *B. subtilis* (PY79; accession NC\_022888.1), *L. monocytogenes* (EGD-e; accession NZ\_CP023861.1), *S. aureus* (USA300 FPR3757; accession NC\_00793.1), *S. gallolyticus* (TX20005; accession AEEM0000000.1), *S. agalactiae* (CJB111; accession CP063198.2) and *S. suis* (GZ0565; accession NZ\_CP017142.1). In the above matrix, the purple shading corresponds to the level of identity between two strains (on a spectrum of 0 to 100% identity), with darker shading indicative of higher percent identity. **b)** Western blot showing EssC-dependent scretion of EsxA from GBS, *in vitro*. Blots pictured are representative of 3 independent experiments. The un-cropped Western blot as well as the Coomassie stained gel can be found in <u>S3B and S3C Fig</u>.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010121.g004

PLOS Pathogens https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010121 December 6, 2021

Within GBS, at least four T7SS subtypes exist based on the EssC C-terminal amino acid sequence and also vary based on presence/number of EsxA homologs (See <u>S1B Fig</u>). Similar to subtype I strain CJB111 (described above), subtype II and III GBS strains also encode EsxA upstream of the T7SS core genes. However, subtype II strains encode just one EsxA, which is most similar to CJB111 EsxA2 (98.98% identity; <u>S3A Fig</u>). Finally, subtype IV GBS strains do not encode EsxA upstream of the T7SS locus.

#### EsxA secretion is dependent on the EssC ATPase in CJB111

To confirm that EsxA is a T7SS substrate in GBS, we assessed presence of EsxA in the supernatant of CJB111 and CJB111ΔessC strains. We further constructed a CJB111 deletion mutant lacking both esxA1 and esxA2 genes (referred to here as  $\Delta$ esxA1-2) to serve as a negative control. CJB111, *AessC*, and *AesxA1-2* strains were grown statically in rich medium for 24 hours and EsxA protein was assessed in the pellet and supernatant fractions by Western blot using a polyclonal anti-EsxA1 antibody (GenScript). We observed a band for EsxA (~11 kDa) in the supernatant of CJB111, but not in that of the *DessC*, or *DesxA1-2* mutants (Fig 4B), whereas EsxA was detected in the pellet fraction of both CJB111 and *\DeltaessC*, but not the *\DeltaesxA1-2* mutant (Fig 4B). Equal loading of protein across wells was confirmed by Coomassie and specific staining of the polyclonal antibody was confirmed by probing a duplicate blot with IgG purified from the pre-immune sera of the same rabbits used to generate the anti-EsxA sera (S3B and S3C Fig). In these experiments, the  $\Delta essC$  mutant served as the lysis control, since EsxA produced in the pellet of this strain was not detectable in the supernatant fraction (Fig 4B). These data indicate that EsxA is produced in both the parental CJB111 and AessC bacterial cells but is only secreted when EssC is present. As expected, no EsxA protein was detected in the pellet or supernatant of the  $\Delta esxA1-2$  mutant. Thus, EsxA is a T7 secreted substrate in CJB111 and this is dependent on the T7SS ATPase, EssC.

#### EsxA1-2 contribute to CJB111 virulence and cytotoxicity

To determine if EsxA1-2 contribute to virulence *in vivo*, CD1 mice were infected as described above and in the Materials and Methods with parental CJB111 and  $\Delta esxA1-2$  mutant strains and monitored for mortality and moribundity. We observed that mice infected with the  $\Delta esxA1-2$  mutant exhibited no mortality compared with the 75% mortality that occurred in mice infected with the parental CJB111 strain (Log rank test, p = 0.0013, \*\*; Fig 5A). Further, mice infected with the  $\Delta esxA1-2$  mutant had significantly lower bacterial burden in the blood, as well as in heart and brain tissue (Fig 5B–5D) compared to CJB111-infected mice. As observed previously in mice infected with the  $\Delta essC$  mutant (Fig 2E and 2F), there were decreased levels of neutrophil chemokine KC in the brain in  $\Delta esxA1-2$  mutant-infected mice compared to CJB111-infected mice (Fig 5E). This difference was also exacerbated upon normalization of brain KC protein levels to bacterial brain CFU (Fig 5F). These data indicate a role for EsxA1-2 in both GBS virulence and meningitis progression.

Finally, to determine if EsxA1-2 contribute to the cytotoxicity observed in brain endothelial cells (Fig 3), hCMEC monolayers were infected with CJB111,  $\Delta esxA1-2$  mutant, and complemented strains. Similar to the  $\Delta essC$  mutant, the  $\Delta esxA1-2$  mutant exhibited attenuated cytotoxicity in brain endothelium compared to the parental CJB111 strain (Fig 5G). This EsxA-dependent cytotoxicity in hCMECs could be restored with a double *esxA1esxA2* complement or with *esxA1* or *esxA2* single complements (Fig 5H), indicating that expression of either of the EsxA proteins is sufficient for T7SS-dependent cytotoxicity.

WXG100 proteins such as EsxA form antiparallel  $\alpha$ -helical bundles, with the hydrophobic WXG motif located in the hairpin loop [4]. These WXG motifs have been shown to facilitate



Fig.5. ESAX control test to  $c_{01}$  in the field of the distribution of the distribution of  $c_{01}$  in the field of the distribution of  $c_{01}$  in the distribution of  $c_{01}$  is the distribution of  $c_{01}$  in the distribution of  $c_{01}$  is the distribution of  $c_{01}$  in the distribution of  $c_{01}$  is the distribution of  $c_{01}$  in the distribution of  $c_{01}$  is the dis

mouse and all three independent experiments' data are combined in these figures. Plots show the median. Statistics represent the Mann Whitney *U* test. p < 0.05, s > 0.01, s > 0.001, s > 0.001

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010121.g005

oligomerization and pore formation and may also mediate export of other T7SS substrates [10,26,52]. To assess the influence of the EsxA1-2 WXG motifs on host cell cytotoxicity, we created single gene complements expressing WXG-mutant EsxA1 or EsxA2 (annotated as  $esxA1_{W43A}$  or  $esxA2_{W43A}$ ); yet, neither of these significantly complemented the cytotoxicity defect of the  $\Delta esxA1-2$  mutant (Fig 5H). These data indicate that the WXG motif is indeed important for EsxA-mediated cytotoxicity in brain endothelium.

#### CJB111 EsxA1 is a pore-forming protein

EsxA is a well-known T7SS substrate [<u>3,12,20,25,53</u>]; yet the specific mechanism by which it contributes to T7SS-dependent phenotypes is not clearly defined. Tak et al. recently showed that the EsxE-EsxF complex, a mycobacterial WXG100 protein pair, forms pores to enable toxin secretion [<u>10</u>]. Thus, we hypothesized that GBS EsxA might also form pores, facilitating our observed T7SS-dependent phenotypes. To examine this, we purified CJB111 EsxA1 as described in the Materials and Methods via expression of an EsxA1-maltose binding protein (MBP) fusion [<u>10,54</u>] (<u>S4A-S4C Fig</u>). EsxA1 was purified in the absence of detergents to prevent potential artifacts [<u>55</u>]. MBP was cleaved from EsxA1 during the later stages of purification and the purity and folding of EsxA1 was confirmed by differential scanning fluorimetry (<u>S4A-S4C Fig</u>). Similar to previous purifications of Esx proteins [<u>10</u>], GBS EsxA1 formed many oligomeric species, which were confirmed by native PAGE using EsxA1 antiserum (<u>S4D</u> Fig). Most of the high molecular weight oligomers were dissociated to the monomer by 6 M guanidine hydrochloride, except for one protein species that stained with anti-EsxA1 antiser um, but not with an anti-MBP antibody (<u>S4D Fig</u>), indicating it is a stable oligomer of EsxA1.

To determine whether GBS EsxA1 forms pores, we used planar lipid bilayer experiments as previously described [10]. While we observed no channel activity with buffer alone, the purified GBS EsxA1 protein formed transmembrane pores, as observed by a stepwise current increase (Figs <u>6A</u>, <u>6B</u>, <u>S5A</u> and <u>S5B</u>). Reducing the buffer pH from 7.4 to pH 4.0 increased the channel activity significantly (Figs <u>6B</u>, <u>S5A</u> and <u>S5B</u>). These data demonstrate that EsxA1 forms open pores in lipid membranes. We also used electron microscopy of negatively stained protein samples in order to visualize the pore architecture [10,56]. Indeed, water-soluble EsxA1 protein negatively stained with uranyl formate and imaged by electron microscopy revealed particles with typical appearance of pores (Fig <u>6C</u>). Reference-free 2D class averaging of 12,727 particles revealed consistent oligomeric complexes with a central pore as well as multiple heterogeneous complexes that may represent incomplete or assembling pores (Figs <u>6C</u> and <u>S5C</u>) thus corroborating our observations of higher-order oligomers by native gel (<u>S4D</u> Fig). Collectively, these results indicate that GBS EsxA1 forms water-soluble pore and/or prepore complexes that are capable of membrane insertion.

#### Discussion

In this study, we describe for the first time a T7SS in GBS and identify four T7SS subtypes based on the C-terminus of the ATPase EssC. We further demonstrate a role for GBS T7SS



**Fig 6. CJB111 EsxA is a pore-forming protein.** Lipid bilayers composed of 1,2-diphytanoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (DphpC), 4ME 16:0 PC were incubated with 5 µg CJB111 recombinant EsxA at **a**) pH 7 and **b**) pH 4.0 in 25 mM sodium phosphate 1M KCl. Representative current traces are shown, and insertion sizes and frequencies are summarized in the histograms. Ten membranes were run in each buffer condition. No protein controls were also performed to rule out artifactual pore formation due to contamination of the system or buffer. Additional current traces can be found in <u>S5A and S5B Fig. c</u>) Transmission electron microscopy of recombinant EsxA1. Shown are EsxA1 particles negatively stained with 1% uranyl formate and selected reference-free 2D class averages from 12,727 particles that resembled an intact oligomeric pore. The full set of class averages can be found in <u>S5C Fig</u>.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010121.g006

subtype I in virulence and meningitis progression and show that it is dependent on the secreted T7SS effector EsxA. Finally, we show that T7SS-and EsxA-dependent virulence in CJB111 may be promoted by the ability of EsxA to form pores in membranes and to induce cytotoxicity in brain endothelial cells via the canonical WXG motif.

As the most broadly conserved T7SS effector, EsxA is known to contribute to numerous virulence phenotypes in Mtb and, more recently, in Firmicutes [53]. In Mtb, ESAT-6, or EsxA, was shown to promote virulence in a murine model of infection [26] and the ESX1 system that secretes EsxA has been well established as necessary for phagolyosomal escape and intracellular survival in macrophages [8.9]. Mtb EsxA is also known to elicit strong interferon responses from T cells [46], is strongly immunodominant in the T-cell response to Mtb [57,58], and induces apoptosis and membrane perturbation in host cells [59–61]. Similarly, in *S. aureus*, T7SS has broadly been attributed to virulence in murine models of blood infection, nasal colonization, and pneumonia [12,19,62,63] and EsxA specifically was shown to be important for *S. aureus* virulence in an abscess model of infection [12]. However, it is unknown whether these

virulence phenotypes are a result of EsxA directly or because EsxA is required for the secretion of other T7SS substrates [13,64,65]. This dependency on EsxA has led to the hypotheses that T7SS substrates may be co-secreted as multimeric complexes and/or that WXG100 proteins such as EsxA may actually comprise part of the secretion machinery, potentially forming an extracellular or surface-associated component of the secretion apparatus [7,53]. In this manner, recently, Mtb WXG100 proteins EsxEF were hypothesized to form the outer membrane T7SS channel allowing export of the toxin, CpnT [10].

Consistent with this, our data here indicate that EsxA deletion essentially phenocopies a EssC deletion in GBS during hematogenous meningitis (Figs 2 and 5). Bacterial burdens did not differ significantly between  $\Delta essC$  and  $\Delta esxA1-2$  infected mice in the brain, blood, or the heart. It is currently unclear whether GBS EsxA1-2 directly causes the drastic virulence and cytotoxicity phenotypes observed in this study or if EsxA1-2 may facilitate the export of other GBS T7SS substrates that directly impact virulence and cytotoxicity. In support of the hypothesis that EsxA1-2 may comprise a cell-associated component of the GBS T7SS machinery, our data suggest that the majority of the cytotoxicity induced by the GBS T7SS is contact-dependent, as we observed minimal levels of contact-independent hCMEC cytotoxicity using transwells. Thus, GBS EsxA1-2 may be important for the secretion of other GBS T7SS substrates, either by chaperoning other T7SS effectors or by comprising part of the T7SS apparatus itself; however, this requires further investigation.

In addition to its contribution to T7SS activity, EsxA was an intuitive first T7SS substrate to study as it is broadly conserved across all T7SSa and T7SSb systems, and almost all GBSS T7SS loci (subtypes I, II and III). It has been suggested that conservation of S. aureus EsxA across strains expressing different EssC variants may indicate that EsxA interacts with a conserved portion of EssC (that is common across all variants) instead of the EssC C-terminus, which may be specific for each subtype's secreted effectors [15,17]. EsxA, as well as other WXG100 proteins, commonly form  $\alpha$ -helical structures containing coiled-coil domains, and mutations of hydrophobic residues within these domains (such as the WXG motif) have been predicted to abrogate WXG100 protein interactions (either with self or with other protein partners) [7,26,66,67]. In Tak et al, the pore-formation function of EsxEF was dependent on the WXG motif and this consequently affected secretion of the CpnT toxin [10]. Our data herein corroborates these findings in that the WXG motif is also important for GBS EsxA-mediated cytotoxicity. Future studies will determine if the WXG motif is required for EsxA pore-forming activity and whether GBS EsxA-dependent cytotoxicity is specific to brain endothelium, or commonly observed in other cell types such aortic endothelium or in epithelial cells. Further, the mechanism by which EsxA1-2 or other T7SS substrates induce host cell death has been contested in previous literature and likely depends on the strain-specific secreted factors. In Mtb, T7SS-mediated cytotoxicity due to EsxA was shown to occur independently of pore formation, as cells died via apoptosis due to tearing of the membrane [55]. Conversely, in S. aureus, EsxA was shown to inhibit or delay apoptosis [68,69], and in Mtb, export of toxin CpnT resulted in macrophage death via necroptosis [70]. Our observation that EsxA poreforming activity increased at pH 4 compared to pH 7 could indicate that EsxA pore-formation may be relevant for intracellular rupture of membranes as in the phagolysosome. Yet, this and the mechanism by which GBS T7SS induces cell death requires further investigation.

Interestingly, GBS subtype I encodes two full copies of *esxA*. As these genes are 95% identical, we have annotated them as *esxA1* and *esxA2* and we show in this study that expression of just one is sufficient for maximal CJB111 cytotoxicity in brain endothelium. In addition to *esxA1* and *esxA2*, which are encoded upstream of the T7SS locus, CJB111 also encodes two orphaned WXG100 proteins located elsewhere in the genome (ID870\_08245 and ID870\_10565) that are 85% and 86% identical to EsxA1, respectively. Whether these EsxA-like proteins also contribute to T7SS-mediated virulence, cytotoxicity, and pore formation is unknown.

EsxA1-2 are just two of many potential T7SS substrates in CJB111. Despite diversity in sequence and size, T7SS substrates are usually  $\alpha$ -helical in nature and often contain T7SS-associated motifs, such as WXG, LXG, YxxxD/E or the C-terminal hydrophobic pattern HxxxD/ ExxhxxxH ("H" and "h" indicating highly conserved and less conserved hydrophobic residues, respectively [4]. Additional common substrates of the T7SS include LXG-domain containing polymorphic toxins, which encode a conserved N-terminus similar in structure to WXG100 proteins but with an extended variable C-terminal toxin domain [71]. These toxins have been described in S. intermedius [29,72], S. aureus [14,16], and E. faecalis [28] and mediate interbacterial competition and/or host toxicity. CJB111 encodes a putative LXG effector just downstream of the T7SS core machinery locus that is conserved across the GBS T7SS subtype I strains (listed in <u>S1 Table</u>). Because LXG toxin-encoding genes are prevalent in bacteria that comprise the human gut microbiota [29] and the T7SS of E. faecalis has been shown to be important for colonization of the murine vaginal tract [73], it is possible that GBS LXG effectors may promote interbacterial competition of GBS with normal flora in both the gastrointestinal and female reproductive tracts. However, no conserved toxin domain was identified within the C-terminus of this protein (upon NCBI BLAST, NCBI CDART, and InterPro analysis). Additionally, while this putative subtype I LXG effector has high homology to a putative LXG effector in other streptococcal species (namely S. uberis and S. parasanguinis), it exhibits very little homology to other putative LXG effectors encoded by other GBS T7SS subtypes, S. aureus, or L. monocytogenes. Therefore, further investigation is warranted to determine the function of this GBS T7SS subtype I LXG-domain containing protein.

Other T7SS substrates may exist in addition to Esx proteins and LXG toxins and may be encoded downstream of essC; however, finding conditions in which T7SS is induced in vitro constitutes a significant hurdle to their identification. As has been the case in studying other secretion systems, T7SS structures may only be assembled in vivo or when in contact with specific host factors or host or bacterial cells [7,74]. Simply identifying conditions by which to induce expression of T7SS genes in vitro has proven elusive [48] and may be species dependent. Further, it is currently unknown how many genes downstream of the T7SS core machinery are actually associated with the GBS T7SS. In general, putative GBS T7SS-associated genes seem to be commonly located downstream of carbamoyl phosphate synthase encoding genes and upstream of an LtdRS two component system, which we have characterized previously [75]; however, we have not yet determined if all genes in this region are associated with GBS T7SS. To compound the difficulty of identifying additional GBS T7SS effectors, while most Firmicutes' T7SS loci commonly encode homologs for core T7SS machinery and WXG100 proteins, the C-terminal end of EssC as well as the downstream putative T7SS effectors (including LXG toxins) vary widely across strains of the same species. This extensive T7SS diversity has been described based on EssC C-terminal sequences in S. aureus (4 variants) [17], L. monocytogenes (7 variants) [24], and Staphylococcus lugdenensis (2 variants) [23]. These systems exhibit little to no cross talk, as in Mtb, ESX systems are not known to complement each other, and in S. aureus, expression of essC variants in heterologous strain backgrounds allowed EsxA secretion but not secretion of strain-specific effectors [15]. Although only subtype I in GBS has been studied to date (present study), GBS also exhibits extensive diversity and encodes four T7SS subtypes, each associated with a unique set of downstream effectors; therefore, an EssC variant-specific secretome likely exists across GBS strains, which will inevitably affect T7SS-dependent phenotypes. Determining whether other GBS T7SS subtypes are functional and important for virulence, as well as identifying subtype-specific effectors will be the subject of our follow-up studies.

In conclusion, this work provides the first characterization of a T7SS in GBS and is the first to demonstrate a role for a non-mycobacterial EsxA homolog in pore formation. This study builds on previous Gram-positive T7SS literature, demonstrating that GBS T7SS subtype I has a role in virulence that is dependent on EsxA1-2, and more specifically, the EsxA1-2 WXG motifs. Further study of T7SS effectors may uncover previously unknown mechanisms of GBS pathogenesis and may provide insight into new therapeutic targets for Group B streptococcal disease.

#### Materials and methods

#### **Ethics statement**

Animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at University of Colorado Anschutz Medical Campus protocol #00316 and were performed using accepted veterinary standards. The University of Colorado Anschutz Medical Campus is AAALAC accredited; and its facilities meet and adhere to the standards in the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".

#### **Bioinformatic analysis of GBS T7SS**

Closed genomes of Streptococcus agalactiae were downloaded in Geneious Prime 2020.1.2 using the NCBI Nucleotide Blast function searching for the following terms: "Streptococcus agalactiae complete genome", "Streptococcus agalactiae complete sequence", or "Streptococcus agalactiae chromosome". 136 closed genomes were downloaded in total. Protein BLAST was performed in Geneious to assess the presence of the EssC C-terminus (with the terminal 225 amino acids of CJB111 EssC used as template). Protein alignments were manually checked for true alignment to the queried sequence and strains encoding EssC exhibited a minimum Bitscore of 160, E value = 8.65e-43, Grade = 74.3%. These metrics equate to minimum of 35.9% identity/ 98.67% coverage of the 225-amino acid query. While most strains that encoded the EssC C-terminus also encoded other T7SS genes, some GBS isolates contain fragmented T7SS loci. Thus, only the EssC C-terminus sequence was assessed in this analysis. Of 136 GBS isolates, 80 encode an EssC C-terminus. A phylogenetic tree was generated in Geneious based on the EssC C-terminal sequences extracted from the above protein BLAST. Branches are transformed proportionally and are in decreasing order. T7SS subtypes were classified based on the visual branching of the tree. EsxA protein alignments were performed using the EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory- European Bioinformatics Institute) ClustalW program (v.1.2.4) [76].

#### Bacterial strains and cell lines

GBS strain CJB111, an isolate from a case of neonatal bacteremia without focus (accession: NZ\_CP063198.2) [77] was used in this study. GBS strains were grown in Todd Hewitt Broth (THB; Research Products International, RPI) statically at 37<sup>\*</sup> C. When needed, antibiotic was added to THB at final concentrations of 100 µg/mL spectinomycin. Strains containing the plasmid pDCErm were grown in THB + 5 µg/mL erythromycin. All strains used in this study can be found in <u>S3 Table</u>. The human cerebral endothelial cell line hCMEC/D3 (Millipore-Sigma; SCME-004) used in this study was grown in EndoGRO complete medium with 5% fetal bovine serum and 1 ng/mL FGF-2 (fibroblast growth factor-2) and each lot of cells are authenticated/genotyped by Millipore-Sigma via STR analysis.

#### Cloning

Deletion mutants of *essC* (ID870\_04200) and *esxA1/esxA2* (ID870\_04170/ ID870\_04175) were created as described previously using the temperature sensitive plasmid pHY304 [78] with slight modifications: namely, this time using a gene encoding spectinomycin resistance, *aad9*, in the knockout construct. Second crossover mutants were screened for erythromycin sensitivity and spectinomycin resistance. Vector controls and complemented mutants were generated as previously described using overexpression plasmid pDCErm [78]. Primers used in this study can be found in <u>S4 Table</u>.

#### **RNA purification and qRT-PCR**

qRT-PCR analysis of bacterial gene expression was performed as described previously [78]. To assess gene expression in CJB111,  $\Delta essC$  mutant, and essC complement, strains were grown to mid-log (OD<sub>600</sub> = 0.4–0.6). RNA was purified using the Machery-Nagel Nucleospin kit (catalog# 740955.250) according to manufacturer instructions with the addition of three bead beating steps (30 sec x 3, with one minute rest on ice between each) following the resuspension of bacterial pellets in RA1 buffer +  $\beta$ -mercaptoethanol. Purified RNA was treated with the turbo DNAse kit (Invitrogen, catalog# AM1907) according to manufacturer instructions. cDNA was synthesized using the SuperScript cDNA synthesis kit (QuantaBio, catalog# 95047–500), per manufacturer instructions. cDNA was diluted 1:150 to further reduce bacterial DNA contamination and qRT-PCR was performed using PerfeCTa SYBR Green (QuantaBio, catalog# 95072-05K) and BioRad CFX96 Real-Time System, C1000 Touch Thermocycler. qRT-PCR primers used in this study can be found in <u>S4 Table</u>.

#### Murine model of hematogenous meningitis

Contribution of T7SS to GBS virulence was assessed using a model of hematogenous meningitis as described previously [78]. Male 8-week old CD1 mice (Charles River) were tail vein injected with 2–3 x  $10^7$  CFU of CJB111 or an isogenic T7SS mutant. Mice were euthanized (via CO<sub>2</sub> asphyxiation and cervical dislocation) either upon exhibition of neurological symptoms such as paralysis or moribundity for "survival" experiments or at 52 hours to assess GBS tissue burden. Upon mouse death, brain, heart and blood were collected. Tissue was homogenized and samples were serially diluted and plated on THA for CFU enumeration. Bacterial counts were normalized to the tissue weight.

#### ELISA

KC protein in homogenized tissues was quantified using R&D systems ELISA kits (catalog # DY453). KC protein detected was normalized to tissue weight and reported as KC protein (pg) per mg of tissue.

## Cell based assays: Adherence, Invasion, Intracellular survival, and LDH release

hCMECs were passaged, seeded at 150,000 cells/well into rat tail collagenized 24-well plates (Corning, catalog# 3524), and grown into a confluent monolayer overnight in EndoGRO complete medium. Confluent cell monolayers were then washed with PBS and media was replaced (0.4 mL media per well). For cell-based assays, GBS was sub-cultured from overnight cultures (1:10) and grown to mid-log. Bacteria were pelleted and normalized to an  $OD_{600}$  value predetermined to yield 1 x 10<sup>8</sup> CFU in PBS. Bacteria were serially diluted in PBS and added to the cell monolayers in 24-well plates.

GBS T7SS mediates virulence

Adherence, invasion, and intracellular assays were performed as previously described [78]. Briefly, for adherence assays, GBS was added to hCMEC monolayers at an MOI of 1 and incubated for 30 minutes. For invasion assays, GBS was added to hCMEC monolayers at an MOI of 1, incubated two hrs, washed three times with PBS, and then incubated in media containing penicillin and gentamycin for two hrs to kill any extracellular bacteria. In both these assays, at the final timepoint, cells were washed with PBS, trypsinized five minutes at 37° C, and lysed using 0.025% Triton-X-100 in PBS. After mixing the lysate well by pipetting, CFU were quantified by serial dilution of the lysate and plating on THA. Percent adherence or invasion was calculated by taking the quotient of CFU quantified at the end of the assay and the inoculum. Intracellular survival assays were performed identically to the invasion assay, except cells were incubated for 12 hours instead of 2 hours following the addition of antibiotic-containing medium.

For LDH release assays, bacteria were added to hCMEC monolayers as described above in EndoGRO complete medium at an MOI of 10 and allowed to incubate for 4–5 hrs. LDH release was measured according to manufacturer instructions (Pierce, Thermo Fisher, catalog # 88953).

Transwell assays were performed in tissue culture-treated 24-well polystyrene plates containing 6.5mm, polycarbonate transwell inserts with  $0.4\mu$ M porous membranes (Corning, catalog# 3413). hCMEC were seeded into collagenized wells in the bottom compartment and grown overnight in EndoGRO complete medium as described above. On the day of the assay, cells were washed with PBS, fresh medium was added, and transwells were inserted and equilibrated with EndoGRO complete medium. GBS was added to the transwell bucket at an MOI of 10, and the plate was incubated for 24 hours. Supernatant from the hCMEC lower compartment was plated at the end of the assay to ensure lack of bacterial contamination.

#### Detection of cell-associated and secreted GBS EsxA

To assess secretion of EsxA into GBS culture supernatant, overnight CJB111, CJB111ΔessC, and CJB111ΔesxA1-2 cultures were sub-cultured into 30 mL of THB and grown 24 hours statically at 37° C. Bacteria were pelleted at 3214 x g for 10 minutes at 4° C. Supernatants were decanted from the pellets, filtered, supplemented with a EDTA-free protease inhibitor cocktail (Millipore-Sigma set III, catalog # 539134; 1:250 dilution), and run through a 30K molecular weight cut-off Amicon filter (Millipore-Sigma, catalog # UFC803024) to remove high molecular weight secreted proteins. The flow-through was then trichloroacetic acid (TCA)-precipitated overnight at 4° C. Precipitated proteins were centrifuged for 15 minutes, 14K x g, 4° C, protein pellets were washed gently with acetone, and centrifuged again at the same settings. Protein pellets were allowed to dry following removal of acetone and were resuspended in Tris buffer (50 mM Tris HCl, 10% glycerol, 500 mM NaCl, pH 7). The above bacterial pellets were washed once with PBS, frozen overnight, resuspended the next day in Tris buffer + protease inhibitor, and bead-beaten (2 x one minute) using 0.1mm zircona/silica beads (Biospec). Triton-X-100 was added to lysates at a final concentration of 1% to solubilize membrane proteins and vortexed to mix. Lysates were then passed through a 30K MWCO Amicon filter and flowthrough was collected.

Supernatant and pellet samples were mixed 1:1 with Lamelli buffer+ BME, boiled 10 minutes, and run on SDS-PAGE for Western blotting. Proteins were transferred to a membrane using BioRad's Trans-Blot Turbo Transfer System (high molecular weight settings). Membranes were washed three times in TBST and blocked in LI-COR's Intercept Blocking Buffer (catalog# 927–60001) for one hour at room temperature. Membranes were probed with an anti-EsxA1 rabbit polyclonal antibody (0.5  $\mu$ g/ml; GenScript) or the pre-immune rabbit IgG isotype control antibody (0.5 µg/ml; GenScript) in the above LI-COR blocking buffer, overnight at 4° C. Following washes in TBST, membranes were incubated with IRDye 680RD goat anti- rabbit IgG (H + L) secondary antibodies from LI-COR (1:10,000 dilution; 1 hour, room temperature; catalog# 926–68070). Following washes in TBST and water, western blots were imaged using the LI-COR Odyssey.

#### EsxA1 protein purification

Purification of CJB111 EsxA1 was performed as recently described [10] with modifications described here. The esxA1 gene of CJB111 (ID870\_04170) was cloned into expression vector pML3339 [79] and expressed in Escherichia coli BL21(DE3) using 1L of ZYP5052 autoinduction medium [80] + carbenicillin (100 µg/ml). Cultures were grown at 37°C, shaking (200 rpm) for 24 hours and the E. coli pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7.5 + 1 mM PMSF, + 1 mg/ml lysozyme, + 3 µl benzonase (Novagen, Merck Millipore 70746-3), + 1 Roche complete protease inhibitor tablet), sonicated 30 seconds on /off for 20 minutes on ice, and spun at 14,000 x g to pellet debris and to collect the soluble fraction. The soluble fraction was run over packed and equilibrated nickel resin (Thermo Fisher, HisPur Ni-NTA Resin, catalog# 88222), washed with 25 mM HEPES 150 mM NaCl + 20 mM imidazole (pH 7.0) and eluted in 25 mM HEPES 150 mM NaCl + 300 mM imidazole (pH 7.0) to obtain clean 6xHIS-MBP-EsxA (maltose binding protein; fusion protein is~55 kDa). The sample was dialyzed (3.5 kDa MWCO, Spectrum Spectra/Por, catalog# 086705B) to remove imidazole, cleaved with 6xHIS-TEV protease overnight at 4°C, and then run over a nickel column to bind 6xHIS-MBP and 6xHIS-TEV as described above. EsxA1 was collected in the flowthrough, run over amylose resin (NEB, catalog# E8021L) twice to bind any remaining MBP contaminants, and the flowthrough was collected. The final EsxA1 product was concentrated using 3 kDa amicon centrifugal filters (Millipore, catalog# UFC900324) and verified by Coomassie, where it exhibited a clear monomeric band at approximately 10 kDa in addition to putative dimers, trimers, and higher order oligomers.

EsxA1 sample purity was confirmed using tryptophan fluorescence (NanoTemper Tycho). Pure MBP was used as a negative control (sample impurity control) and EsxEF [10] was used as a positive control. To further confirm the purity of the sample, purified EsxA1 (including monomers and oligomers) was incubated with either water or guanidine hydrochloride (6 M) for 30 minutes at room temperature, run on a native gel (12% Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels, BioRad) and were transferred and stained as described above except using an ammonium sulfate cut of anti-EsxA1 rabbit antiserum (30  $\mu$ g/ml; GenScript) or murine anti-MBP monoclonal antibody (1:10,000; NEB; catalog# E8032S) primary antibodies and IRDye 680RD goat anti- rabbit or goat anti-mouse IgG (H + L) secondary antibodies (catalog#s 926–68071 and 926–68070, respectively).

#### Lipid bilayers

Pore forming activity was assessed using lipid bilayers as described previously [10] using EsxA1 protein that had been purified that day. Briefly, 100% DphpC (1,2-diphytanoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine, 4ME 16:0 PC) lipid bilayers were used in 25 mM sodium phosphate, 1M KCl at pH 7.4 or pH 4.0. Purified GBS EsxA1 (5 µg) was added to cis / trans side and nine membranes were assessed for pore-forming activity. 46 insertions were observed in total. The insertion profile did not exhibit a gaussian distribution or trend towards a particular conductance value. At pH 4.0, 132 insertions were observed in total. The insertion profile at pH 4.0 exhibited a more uniform distribution and, once channels were formed, the overall

conductance was higher than those at pH 7.4. Data was analyzed using a custom algorithm in IGOR Pro.

#### Transmission Electron Microscopy of negatively-stained EsxA1

Negative stain of EsxA1 was performed as described previously [10]. Recombinant EsxA1 was prepared to a concentration of approximately 370 µg/mL in 25mM sodium phosphate buffer pH 4.0, blotted on glow-discharged grids (continuous carbon), washed twice with milli-q water, and then stained with 1% uranyl formate for 2 minutes. All grids were prepared within 16–48 hours of EsxA1 purification. Micrographs were collected on a 120kV ThermoFisher Talos L120C transmission electron microscope using 45,000X magnification and a fixed defocus of -2.24 µm. Particle picking was performed using EMAN2.2 Swarm picking with a particle size of 100 and box size of 150 at 3.19 Å/ pixel. Particle quality was manually inspected and aggregates were removed. Reference-free 2D class averages were generated in EMAN2.2 from a total of 12,727 particles over 43 CTF-corrected micrographs. Micrograph quality / CTF was confirmed manually. The low-pass filtered (20 Å) particle set was subjected to four iterations of class averaging. Each iteration displayed similar results.

#### Statistics

Statistical analysis was performed using Prism version 9.0.2 (134) for macOS (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States). Statistical details of experiments, such as statistical test used, experimental *n*, definition of center, and dispersion and precision measures can be found in each figure legend. Significance was defined as  $p < \alpha$ , with  $\alpha = 0.05$ .

#### Supporting information

**S1 Table. GBS strains by T7SS subtype.** (XLSX)

S2 Table. Strains used to assess EssC variant sequence identity across GBS, *S. aureus*, and *L. monocytogenes* T7SS subtypes in <u>S1A Fig</u>. (XLSX)

S3 Table. Strains used in this study. (XLSX)

**S4 Table. Primers used in this study.** (XLSX)

**S1 Fig. Heterogeneity of GBS subtypes based on EssC variation and putative T7SS effectors. a)** Percent identity matrix of full EssC amino acid sequences from example GBS, *S. aureus*, and *L. monocytogenes* strains from various T7SS subtypes. Strain information is listed in <u>S2 Table</u>. The purple shading corresponds to the level of identity between two strains (on a spectrum of 0 to 100% identity), with darker shading indicative of higher percent identity. **b)** Diagram of putative T7SS loci from example strains across GBS T7SS subtypes I—IV. CJB111 (accession CP063198.2) is an example of subtype I and expresses the EssC1 variant (ID870\_04200). 2603 V/R (accession NC\_004116.1) is an example of subtype II and expresses the EssC2 variant (SAG\_RS07895). CNTC 10/84 (accession NZ\_CP006910.1) is an example of subtype III and expresses the EssC3 variant (W903\_RS05455). COH1 (accession NZ\_HG939456.1) is an example of subtype IV and expresses the EssC4 variant (GBSCOH1\_RS05095). Genes in purple encode WXG100 or WXG100-like proteins, gene in teal encodes a LXG domain-containing protein, and gene in maroon encodes a DUF4176 domain-containing protein. Genes in various

shades of gray are either annotated as hypothetical or do not have a predicted function. Arrows with patterns indicate T7SS subtype-specific genes that exhibit little to no homology to those present in other GBS T7SS subtypes. Putative core genes of the operon are *esaA* through *essC*. (TIF)

S2 Fig. Deletion of *essC* abrogates *essC* transcription but does not affect GBS interaction with host cells, *in vitro*. a) Expression of *essC* in CJB111+ pDC, CJB111 $\Delta$ *essC*+ pDC, CJB111 $\Delta$ *essC* + pDC*essC* strains by qRT-PCR. T7SS gene expression was normalized to housekeeping gene *gyrA*. Statistics reflect the repeated measures, one way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test to CJB111 $\Delta$ *essC*+pDC, *p* < 0.05, \*. Data indicate the mean of three independent experiments and error bars represent standard error of the mean. The CJB111 + pDC, CJB111 $\Delta$ *essC*+ pDC, CJB111 $\Delta$ *essC* + pDC*essC* strains were further evaluated for **b**) adherence to (n = 3), **c**) invasion of (n = 3), or **d**) intracellular survival (12 hrs; n = 2) in human cerebral microvascular endothelial cells (hCMEC). Data represent percent CFU recovered of the initial inoculum and were performed in technical duplicates or triplicates. (TIF)

**S3 Fig. Canonical T7SS substrate EsxA is conserved across GBS T7SS subtypes I—III. a)** ClustalW alignments and percent identity matrix of EsxA amino acid sequences from GBS T7SS subtypes I-III that are encoded upstream of the putative GBS T7SS loci. Subtype I example strain CJB111 (accession: NZ\_CP063198.2) encodes EsxA1 and EsxA2. Subtype II example strain 2603V/R (accession: NC\_004116.1) encodes EsxA2. Subtype III example strain CNCTC 10/84 (accession: NZ\_CP006910.1) encodes EsxA1 and a truncated EsxA2. In the above matrix, the purple shading corresponds to the level of identity between two strains (on a spectrum of 0 to 100% identity), with darker shading indicative of higher percent identity. **b**) uncropped, full picture of the Western blot shown in Fig 4B. The only other band (CJB111 supernatant) may indicate oligomerization of monomeric EsxA over time, but this needs to be further investigated. **c**) Coomassie-stained SDS PAGE gel indicating that wells were equally loaded (see blue arrows) for the Western blot shown in Fig 4B. (TIF)

**S4 Fig. EsxA1 expression, purification, and quality control. a)** Plasmid map of CJB111 *esxA1* cloned into the backbone of pET vector pML3339. EsxA1 expressed from this vector is <sub>6xhis</sub>MBP-tagged to facilitate nickel affinity and amylose affinity column purification. **b**) SDS-PAGE gel of EsxA1 during purification: un-induced BL21 culture, auto-induced BL21 culture, post-nickel affinity column (IMAC), post-TEV cleavage/dialysis; post amylose column to remove cleaved MBP, final EsxA1. Final EsxA1 product shows a ~11 kDa monomer as well as higher order oligomers. **c**) Quality control of the purified EsxA1 by differential scanning fluorimetry (Tycho, NanoTemper Technologies). Maltose binding protein was run as a negative control and mycobacterial EsxEF was run as a positive control. **d**) Native-PAGE indicating that most EsxA1 oligomers resolve to the monomeric state upon treatment of protein with 6M guanidine HCl for 30 minutes at room temperature. EsxA1 bands stain with anti-EsxA1 rabbit antiserum but not with anti-MBP antibody. (TIF)

**S5 Fig. Complete set of EsxA1 lipid bilayer traces and 2D class averages.** Additional current traces of recombinant CJB111 EsxA1 pore formation in DphpC lipid bilayers at **a**) pH 7.4 and **b**) pH 4.0 in 25 mM sodium phosphate 1M KCl. **c**) Additional reference-free 2D class averages of negatively stained EsxA1 imaged by transmission electron microscopy. (TIF)

#### Acknowledgments

We thank Jennifer Bourne and Eduardo Romero Camacho of the Electron Microscopy Core and the Cryo-EM Structural Biology Shared Resource Facility (University of Colorado Anschutz Medical Campus), respectively, for assistance with negative stain and imaging of EsxA1 protein. We also thank Terje Dokland (University of Alabama at Birmingham) for his review of our negative strain/transmission electron microscopy data.

#### **Author Contributions**

Conceptualization: Brady L. Spencer, Kelly S. Doran.

Data curation: Brady L. Spencer, Uday Tak.

Formal analysis: Brady L. Spencer, Uday Tak.

Funding acquisition: Brady L. Spencer, Jéssica C. Mendonça, Prescilla E. Nagao, Kelly S. Doran.

Investigation: Brady L. Spencer, Uday Tak, Jéssica C. Mendonça.

Methodology: Brady L. Spencer, Uday Tak, Michael Niederweis.

Project administration: Kelly S. Doran.

Resources: Prescilla E. Nagao, Michael Niederweis, Kelly S. Doran.

Supervision: Kelly S. Doran.

Validation: Brady L. Spencer, Uday Tak.

Writing - original draft: Brady L. Spencer.

Writing – review & editing: Brady L. Spencer, Uday Tak, Jéssica C. Mendonça, Prescilla E. Nagao, Michael Niederweis, Kelly S. Doran.

#### References

- Green ER, Mecsas J. Bacterial Secretion Systems: An Overview. Microbiol Spectr. 2016; 4(1). Epub 2016/03/22. <u>https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015</u> PMID: <u>26999395</u>; PubMed Central PMCID: PMC4804464.
- Tseng TT, Tyler BM, Setubal JC. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. BMC Microbiol. 2009; 9 Suppl 1:S2. Epub 2009/03/19. <u>https://doi.org/ 10.1186/1471-2180-9-S1-S2</u> PMID: <u>19278550</u>; PubMed Central PMCID: PMC2654662.
- Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Type VII secretion—mycobacteria show the way. Nat Rev Microbiol. 2007; 5(11):883–91. Epub 2007/ 10/09. https://doi.org/10.1038/nrmicro1773 PMID: 17922044.
- Poulsen C, Panjikar S, Holton SJ, Wilmanns M, Song YH. WXG100 protein superfamily consists of three subfamilies and exhibits an alpha-helical C-terminal conserved residue pattern. PLoS One. 2014; 9(2):e89313. Epub 2014/03/04. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089313 PMID: 24586681; PubMed Central PMCID: PMC3935865.
- Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, Muskett FW, Kelly G, Frenkiel TA, et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. EMBO J. 2005; 24 (14):2491–8. Epub 2005/06/24. <u>https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600732</u> PMID: <u>15973432</u>; PubMed Central PMCID: PMC1176459.
- Groschel MI, Sayes F, Simeone R, Majlessi L, Brosch R. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. Nat Rev Microbiol. 2016; 14(11):677–91. Epub 2016/09/27. <u>https://doi. org/10.1038/nrmicro.2016.131</u> PMID: <u>27665717</u>.
- Pallen MJ. The ESAT-6/WXG100 superfamily—and a new Gram-positive secretion system? Trends Microbiol. 2002; 10(5):209–12. Epub 2002/04/26. <u>https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)02345-4</u> PMID: <u>11973144</u>.

- van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. Cell. 2007; 129(7):1287–98. Epub 2007/07/03. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.059</u> PMID: <u>17604718</u>.
- Simeone R, Bobard A, Lippmann J, Bitter W, Majlessi L, Brosch R, et al. Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. PLoS Pathog. 2012; 8(2):e1002507. Epub 2012/02/10. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002507</u> PMID: <u>22319448</u>; PubMed Central PMCID: PMC3271072.
- Tak U, Dokland T, Niederweis M. Pore-forming Esx proteins mediate toxin secretion by Mycobacterium tuberculosis. Nat Commun. 2021; 12(1):394. Epub 2021/01/17. <u>https://doi.org/10.1038/s41467-020-20533-1</u> PMID: <u>33452244</u>; PubMed Central PMCID: PMC7810871.
- Serafini A, Pisu D, Palu G, Rodriguez GM, Manganelli R. The ESX-3 secretion system is necessary for iron and zinc homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2013; 8(10):e78351. Epub 2013/ 10/25. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078351</u> PMID: 24155985; PubMed Central PMCID: PMC3796483.
- Burts ML, Williams WA, DeBord K, Missiakas DM. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(4):1169–74. Epub 2005/01/20. https://doi.org/10.1073/pnas.0405620102 PMID: 15657139: PubMed Central PMCID: PMC545836.
- Anderson M, Aly KA, Chen YH, Missiakas D. Secretion of atypical protein substrates by the ESAT-6 secretion system of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. 2013; 90(4):734–43. Epub 2013/09/17. <u>https://doi.org/10.1111/mmi.12395</u> PMID: <u>24033479</u>; PubMed Central PMCID: PMC3951145.
- Cao Z, Casabona MG, Kneuper H, Chalmers JD, Palmer T. The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria. Nat Microbiol. 2016; 2:16183. Epub 2016/10/11. <u>https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.183</u> PMID: <u>27723728</u>; PubMed Central PMCID: PMC5325307.
- Jager F, Kneuper H, Palmer T. EssC is a specificity determinant for *Staphylococcus aureus* type VII secretion. Microbiology (Reading). 2018; 164(5):816–20. Epub 2018/04/06. <u>https://doi.org/10.1099/</u> mic.0.000650 PMID: <u>29620499</u>; PubMed Central PMCID: PMC5994694.
- Ulhuq FR, Gomes MC, Duggan GM, Guo M, Mendonca C, Buchanan G, et al. A membrane-depolarizing toxin substrate of the *Staphylococcus aureus* type VII secretion system mediates intraspecies competition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020; 117(34):20836–47. Epub 2020/08/10. <u>https://doi.org/10.1073/</u> <u>pnas.2006110117</u> PMID: <u>32769205</u>; PubMed Central PMCID: PMC7456083.
- Warne B, Harkins CP, Harris SR, Vatsiou A, Stanley-Wall N, Parkhill J, et al. The Ess/Type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* shows unexpected genetic diversity. BMC Genomics. 2016; 17:222. Epub 2016/03/13. <u>https://doi.org/10.1186/s12864-016-2426-7</u> PMID: <u>26969225</u>; PubMed Central PMCID: PMC4788903.
- Tran HR, Grebenc DW, Klein TA, Whitney JC. Bacterial type VII secretion: An important player in hostmicrobe and microbe-microbe interactions. Mol Microbiol. 2021; 115(3):478–89. Epub 2021/01/08. <u>https://doi.org/10.1111/mmi.14680</u> PMID: <u>33410158</u>.
- Kneuper H, Cao ZP, Twomey KB, Zoltner M, Jager F, Cargill JS, et al. Heterogeneity in ess transcriptional organization and variable contribution of the Ess/Type VII protein secretion system to virulence across closely related *Staphylocccus aureus* strains. Mol Microbiol. 2014; 93(5):928–43. Epub 2014/07/22. <u>https://doi.org/10.1111/mmi.12707</u> PMID: <u>25040609</u>; PubMed Central PMCID: PMC4285178.
- Aly KA, Anderson M, Ohr RJ, Missiakas D. Isolation of a Membrane Protein Complex for Type VII Secretion in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2017;199(23). Epub 2017/09/07. <u>https://doi.org/10.1128/JB.00482-17</u> PMID: <u>28874412</u>; PubMed Central PMCID: PMC5686593.
- Zoltner M, Ng WM, Money JJ, Fyfe PK, Kneuper H, Palmer T, et al. EssC: domain structures inform on the elusive translocation channel in the Type VII secretion system. Biochem J. 2016; 473(13):1941–52. Epub 2016/05/01. <u>https://doi.org/10.1042/BCJ20160257</u> PMID: <u>27130157</u>; PubMed Central PMCID: PMC4925161.
- Mietrach N, Damian-Aparicio D, Mielich-Suss B, Lopez D, Geibel S. Substrate Interaction with the EssC Coupling Protein of the Type VIIb Secretion System. J Bacteriol. 2020;202(7). Epub 2020/01/23. <u>https:// doi.org/10.1128/JB.00646-19</u> PMID: <u>31964696</u>; PubMed Central PMCID: PMC7167477.
- Lebeurre J, Dahyot S, Diene S, Paulay A, Aubourg M, Argemi X, et al. Comparative Genome Analysis of *Staphylococcus lugdunensis* Shows Clonal Complex-Dependent Diversity of the Putative Virulence Factor, ess/Type VII Locus. Front Microbiol. 2019; 10:2479. Epub 2019/11/19. <u>https://doi.org/10.3389/ fmicb.2019.02479</u> PMID: <u>31736914</u>; PubMed Central PMCID: PMC6834553.
- Bowran K, Palmer T. Extreme genetic diversity in the type VII secretion system of *Listeria monocyto-genes* suggests a role in bacterial antagonism. Microbiology (Reading). 2021; 167(3). Epub 2021/02/ 19. <u>https://doi.org/10.1099/mic.0.001034</u> PMID: <u>33599605</u>.

- Champion PA, Stanley SA, Champion MM, Brown EJ, Cox JS. C-terminal signal sequence promotes virulence factor secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 2006; 313(5793):1632–6. Epub 2006/09/16. <u>https://doi.org/10.1126/science.1131167</u> PMID: <u>16973880</u>.
- 26. Brodin P, de Jonge MI, Majlessi L, Leclerc C, Nilges M, Cole ST, et al. Functional analysis of early secreted antigenic target-6, the dominant T-cell antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, reveals key residues involved in secretion, complex formation, virulence, and immunogenicity. J Biol Chem. 2005; 280 (40):33953–9. Epub 2005/07/29. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M503515200</u> PMID: <u>16048998</u>.
- Garufi G, Butler E, Missiakas D. ESAT-6-like protein secretion in *Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 2008; 190(21):7004–11. Epub 2008/08/30. <u>https://doi.org/10.1128/JB.00458-08</u> PMID: <u>18723613</u>; PubMed Central PMCID: PMC2580693.
- Chatterjee A, Willett JLE, Dunny GM, Duerkop BA. Phage infection and sub-lethal antibiotic exposure mediate *Enterococcus faecalis* type VII secretion system dependent inhibition of bystander bacteria. PLoS Genet. 2021; 17(1):e1009204. Epub 2021/01/08. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009204</u> PMID: <u>33411815</u>; PubMed Central PMCID: PMC7790226.
- Whitney JC, Peterson SB, Kim J, Pazos M, Verster AJ, Radey MC, et al. A broadly distributed toxin family mediates contact-dependent antagonism between gram-positive bacteria. Elife. 2017; 6. Epub 2017/ 07/12. <u>https://doi.org/10.7554/eLife.26938</u> PMID: <u>28696203</u>; PubMed Central PMCID: PMC5555719.
- Taylor JC, Gao X, Xu J, Holder M, Petrosino J, Kumar R, et al. A type VII secretion system of *Strepto-coccus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* contributes to gut colonization and the development of colon tumors. PLoS Pathog. 2021; 17(1):e1009182. Epub 2021/01/07. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009182</u> PMID: <u>33406160</u>; PubMed Central PMCID: PMC7815207.
- Verani JR, McGee L, Schrag SJ, Division of Bacterial Diseases NCfl, Respiratory Diseases CfDC, Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC, 2010. MMWR Recomm Rep. 2010; 59(RR-10):1–36. Epub 2010/11/23. PMID: <u>21088663</u>.
- Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, et al. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues. Pediatrics. 2011; 127 (5):817–26. Epub 2011/04/27. <u>https://doi.org/10.1542/peds.2010-2217</u> PMID: <u>21518717</u>; PubMed Central PMCID: PMC3081183.
- Ku LC, Boggess KA, Cohen-Wolkowiez M. Bacterial meningitis in infants. Clin Perinatol. 2015; 42 (1):29–45, vii-viii. Epub 2015/02/14. <u>https://doi.org/10.1016/j.clp.2014.10.004</u> PMID: <u>25677995</u>; PubMed Central PMCID: PMC4332563.
- Baker CJ, Barrett FF. Transmission of group B streptococci among parturient women and their neonates. J Pediatr. 1973; 83(6):919–25. Epub 1973/12/01. <u>https://doi.org/10.1016/s0022-3476(73)80524-</u> <u>4</u> PMID: <u>4585831</u>.
- Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(3):497–513. Epub 1998/07/17. <u>https://doi.org/10.1128/CMR.11.3.497</u> PMID: <u>9665980</u>; PubMed Central PMCID: PMC88893.
- Baker CJ. The spectrum of perinatal group B streptococcal disease. Vaccine. 2013; 31 Suppl 4:D3–6. Epub 2013/08/30. <u>https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.02.030</u> PMID: <u>23973344</u>.
- Wilkinson HW. Group B streptococcal infection in humans. Annu Rev Microbiol. 1978; 32:41–57. Epub 1978/01/01. <u>https://doi.org/10.1146/annurev.mi.32.100178.000353</u> PMID: <u>360972</u>
- Pitts SI, Maruthur NM, Langley GE, Pondo T, Shutt KA, Hollick R, et al. Obesity, Diabetes, and the Risk of Invasive Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults in the United States. Open Forum Infect Dis. 2018;5(6):ofy030. Epub 2018/07/07. <u>https://doi.org/10.1093/ofid/ofy030</u> PMID: <u>29977953</u>; PubMed Central PMCID: PMC6016410.
- Skoff TH, Farley MM, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Gershman K, et al. Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990–2007. Clin Infect Dis. 2009; 49(1):85–92. Epub 2009/06/02. <u>https://doi.org/10.1086/599369</u> PMID: <u>19480572</u>.
- McLaughlin JM, Peyrani P, Furmanek S, Khan FL, Quinn A, Jodar L, et al. Burden of Adults Hospitalized with Group B Streptococcal Infection. J Infect Dis. 2020. Epub 2020/03/20. <u>https://doi.org/10.1093/ infdis/jiaa110</u> PMID: <u>32188975</u>
- Armistead B, Oler E, Adams Waldorf K, Rajagopal L. The Double Life of Group B Streptococcus: Asymptomatic Colonizer and Potent Pathogen. J Mol Biol. 2019; 431(16):2914–31. Epub 2019/02/04. <u>https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.01.035</u> PMID: <u>30711542</u>; PubMed Central PMCID: PMC6646060.
- 42. Vu K, Weksler B, Romero I, Couraud PO, Gelli A. Immortalized human brain endothelial cell line HCMEC/D3 as a model of the blood-brain barrier facilitates in vitro studies of central nervous system infection by *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell. 2009; 8(11):1803–7. Epub 2009/09/22. <u>https:// doi.org/10.1128/EC.00240-09</u> PMID: <u>19767445</u>; PubMed Central PMCID: PMC2772405.
- Quagliarello VJ, Long WJ, Scheld WM. Morphologic alterations of the blood-brain barrier with experimental meningitis in the rat. Temporal sequence and role of encapsulation. J Clin Invest. 1986; 77

(4):1084–95. Epub 1986/04/01. <u>https://doi.org/10.1172/JCI112407</u> PMID: <u>3514671</u>; PubMed Central PMCID: PMC424442.

- Mutunga M, Fulton B, Bullock R, Batchelor A, Gascoigne A, Gillespie JI, et al. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. Am J Respir Crit Care Med. 2001; 163(1):195–200. Epub 2001/02/ 24. <u>https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.1.9912036</u> PMID: <u>11208646</u>.
- Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. Blood. 2003; 101(10):3765–77. Epub 2003/01/25. <u>https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1887</u> PMID: 12543869.
- Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 1995; 63 (5):1710–7. Epub 1995/05/01. <u>https://doi.org/10.1128/iai.63.5.1710-1717.1995</u> PMID: <u>7729876</u>; PubMed Central PMCID: PMC173214.
- Tekaia F, Gordon SV, Garnier T, Brosch R, Barrell BG, Cole ST. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. Tuber Lung Dis. 1999; 79(6):329–42. Epub 2000/03/01. <u>https://doi.org/10.1054/tuld.1999.0220</u> PMID: <u>10694977</u>.
- Pinheiro J, Reis O, Vieira A, Moura IM, Zanolli Moreno L, Carvalho F, et al. *Listeria monocytogenes* encodes a functional ESX-1 secretion system whose expression is detrimental to in vivo infection. Virulence. 2017; 8(6):993–1004. Epub 2016/11/01. <u>https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1244589</u> PMID: 27723420; PubMed Central PMCID: PMC5626235.
- Huppert LA, Ramsdell TL, Chase MR, Sarracino DA, Fortune SM, Burton BM. The ESX system in Bacillus subtilis mediates protein secretion. PLoS One. 2014; 9(5):e96267. Epub 2014/05/07. <u>https://doi.org/</u> <u>10.1371/journal.pone.0096267</u> PMID: <u>24798022</u>; PubMed Central PMCID: PMC4010439.
- Lai L, Dai J, Tang H, Zhang S, Wu C, Qiu W, et al. Streptococcus suis serotype 9 strain GZ0565 contains a type VII secretion system putative substrate EsxA that contributes to bacterial virulence and a vanZ-like gene that confers resistance to teicoplanin and dalbavancin in Streptococcus agalactiae. Vet Microbiol. 2017; 205:26–33. Epub 2017/06/18. <u>https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.030</u> PMID: <u>28622857</u>.
- Ludwig W, Seewaldt E, Kilpper-Balz R, Schleifer KH, Magrum L, Woese CR, et al. The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. J Gen Microbiol. 1985; 131(3):543–51. Epub 1985/03/01. <u>https://doi.org/10.1099/00221287-131-3-543</u> PMID: <u>2410543</u>
- Sysoeva TA, Zepeda-Rivera MA, Huppert LA, Burton BM. Dimer recognition and secretion by the ESX secretion system in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111(21):7653–8. Epub 2014/05/ 16. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1322200111</u> PMID: <u>24828531</u>; PubMed Central PMCID: PMC4040557.
- Unnikrishnan M, Constantinidou C, Palmer T, Pallen MJ. The Enigmatic Esx Proteins: Looking Beyond Mycobacteria. Trends Microbiol. 2017; 25(3):192–204. Epub 2016/11/30. <u>https://doi.org/10.1016/j.tim.</u> 2016.11.004 PMID: <u>27894646</u>.
- Arbing MA, Chan S, Harris L, Kuo E, Zhou TT, Ahn CJ, et al. Heterologous expression of mycobacterial Esx complexes in Escherichia coli for structural studies is facilitated by the use of maltose binding protein fusions. PLoS One. 2013; 8(11):e81753. Epub 2013/12/07. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.</u> 0081753 PMID: 24312350; PubMed Central PMCID: PMC3843698.
- Conrad WH, Osman MM, Shanahan JK, Chu F, Takaki KK, Cameron J, et al. Mycobacterial ESX-1 secretion system mediates host cell lysis through bacterium contact-dependent gross membrane disruptions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017; 114(6):1371–6. Epub 2017/01/26. <u>https://doi.org/10.1073/ pnas.1620133114</u> PMID: <u>28119503</u>; PubMed Central PMCID: PMC5307465.
- Engelhardt H, Heinz C, Niederweis M. A tetrameric porin limits the cell wall permeability of Mycobacterium smegmatis. J Biol Chem. 2002; 277(40):37567–72. Epub 2002/07/20. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.</u> <u>M206983200</u> PMID: <u>12130659</u>.
- Mollenkopf HJ, Groine-Triebkorn D, Andersen P, Hess J, Kaufmann SH. Protective efficacy against tuberculosis of ESAT-6 secreted by a live *Salmonella typhimurium* vaccine carrier strain and expressed by naked DNA. Vaccine. 2001; 19(28–29):4028–35. Epub 2001/06/28. <u>https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00109-8</u> PMID: <u>11427279</u>.
- Lalvani A, Nagvenkar P, Udwadia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, Shastri JS, et al. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. J Infect Dis. 2001; 183(3):469–77. Epub 2001/01/03. <u>https://doi.org/ 10.1086/318081</u> PMID: <u>11133379</u>.
- Derrick SC, Morris SL. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. Cell Microbiol. 2007; 9(6):1547–55. Epub 2007/02/15. <u>https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00892.x</u> PMID: <u>17298391</u>.
#### GBS T7SS mediates virulence

- 60. de Jonge MI, Pehau-Arnaudet G, Fretz MM, Romain F, Bottai D, Brodin P, et al. ESAT-6 from *Mycobac-terium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. J Bacteriol. 2007; 189(16):6028–34. Epub 2007/06/15. <u>https://doi.org/10.1128/JB.00469-07</u> PMID: <u>17557817</u>; PubMed Central PMCID: PMC1952024.
- Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM, et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(21):12420–5. Epub 2003/10/15. <a href="https://doi.org/10.1073/pnas.1635213100">https://doi.org/10. 1073/pnas.1635213100</a> PMID: <a href="https://doi.org/10.1073/pnas.1635213100">https://doi.org/10. 1073/pnas.1635213100</a> PMID: <a href="https://doi.org/10.1073/pnas.1635213100">https://doi.org/10.1073/pnas.1635213100</a> PMID: <a href="https://doi.org/10.1073/pnas.1635213100">https://doi.0073/pnas.1635213100</a> PMID: <a href="https://doi.org/10.1073/pnas.1635213100">https://doi.0073/pnas.1635213100</a> PMID: <a href="https://doi.org/10.1073/pnas.1635213100">https
- Burts ML, DeDent AC, Missiakas DM. EsaC substrate for the ESAT-6 secretion pathway and its role in persistent infections of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. 2008; 69(3):736–46. Epub 2008/06/17. <u>https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06324.x</u> PMID: <u>18554323</u>; PubMed Central PMCID: PMC2597432.
- Wang Y, Hu M, Liu Q, Qin J, Dai Y, He L, et al. Role of the ESAT-6 secretion system in virulence of the emerging community-associated *Staphylococcus aureus* lineage ST398. Sci Rep. 2016; 6:25163. Epub 2016/04/27. <u>https://doi.org/10.1038/srep25163</u> PMID: <u>27112266</u>; PubMed Central PMCID: PMC4844983.
- MacGurn JA, Raghavan S, Stanley SA, Cox JS. A non-RD1 gene cluster is required for Snm secretion in Mycobacterium tuberculosis. Mol Microbiol. 2005; 57(6):1653–63. Epub 2005/09/02. <u>https://doi.org/ 10.1111/j.1365-2958.2005.04800.x</u> PMID: <u>16135231</u>.
- Fortune SM, Jaeger A, Sarracino DA, Chase MR, Sassetti CM, Sherman DR, et al. Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102 (30):10676–81. Epub 2005/07/21. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0504922102</u> PMID: <u>16030141</u>; PubMed Central PMCID: PMC1176248.
- Delahay RM, Knutton S, Shaw RK, Hartland EL, Pallen MJ, Frankel G. The coiled-coil domain of EspA is essential for the assembly of the type III secretion translocon on the surface of enteropathogenic *Escherichia coli.* J Biol Chem. 1999; 274(50):35969–74. Epub 1999/12/10. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.</u> 274.50.35969 PMID: <u>10585486</u>.
- 67. Daniell SJ, Delahay RM, Shaw RK, Hartland EL, Pallen MJ, Booy F, et al. Coiled-coil domain of enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis. Infect Immun. 2001; 69(6):4055–64. Epub 2001/05/12. <u>https://doi.org/10. 1128/IAI.69.6.4055-4064.2001</u> PMID: <u>11349076</u>; PubMed Central PMCID: PMC98469.
- Korea CG, Balsamo G, Pezzicoli A, Merakou C, Tavarini S, Bagnoli F, et al. Staphylococcal Esx proteins modulate apoptosis and release of intracellular *Staphylococcus aureus* during infection in epithelial cells. Infect Immun. 2014; 82(10):4144–53. Epub 2014/07/23. <u>https://doi.org/10.1128/IAI.01576-14</u> PMID: <u>25047846</u>; PubMed Central PMCID: PMC4187876.
- Cruciani M, Etna MP, Camilli R, Giacomini E, Percario ZA, Severa M, et al. Staphylococcus aureus Esx Factors Control Human Dendritic Cell Functions Conditioning Th1/Th17 Response. Front Cell Infect Microbiol. 2017; 7:330. Epub 2017/08/09. <u>https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00330</u> PMID: <u>28785545</u>; PubMed Central PMCID: PMC5519619.
- Pajuelo D, Gonzalez-Juarbe N, Tak U, Sun J, Orihuela CJ, Niederweis M. NAD(+) Depletion Triggers Macrophage Necroptosis, a Cell Death Pathway Exploited by *Mycobacterium tuberculosis*. Cell Rep. 2018; 24(2):429–40. Epub 2018/07/12. <u>https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.042</u> PMID: <u>29996103</u>; PubMed Central PMCID: PMC6136256.
- Zhang D, Iyer LM, Aravind L. A novel immunity system for bacterial nucleic acid degrading toxins and its recruitment in various eukaryotic and DNA viral systems. Nucleic Acids Res. 2011; 39(11):4532–52. Epub 2011/02/11. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkr036</u> PMID: <u>21306995</u>; PubMed Central PMCID: PMC3113570.
- Klein TA, Pazos M, Surette MG, Vollmer W, Whitney JC. Molecular Basis for Immunity Protein Recognition of a Type VII Secretion System Exported Antibacterial Toxin. J Mol Biol. 2018; 430(21):4344–58. Epub 2018/09/09. <u>https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.08.027</u> PMID: <u>30194969</u>; PubMed Central PMCID: PMC6193138.
- Alhajjar N, Chatterjee A, Spencer BL, Burcham LR, Willett JLE, Dunny GM, et al. Genome-Wide Mutagenesis Identifies Factors Involved in *Enterococcus faecalis* Vaginal Adherence and Persistence. Infect Immun. 2020;88(10). Epub 2020/08/12. <u>https://doi.org/10.1128/IAI.00270-20</u> PMID: <u>32778611</u>; PubMed Central PMCID: PMC7504943.
- Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, et al. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. EMBO J. 1998; 17(8):2166–76. Epub 1998/05/26. <u>https://doi.org/10.1093/emboj/17.8.2166</u> PubMed Central PMCID: PMC1170561. PMID: <u>9545230</u>
- 75. Deng L, Mu R, Weston TA, Spencer BL, Liles RP, Doran KS. Characterization of a Two-Component System Transcriptional Regulator, LtdR, That Impacts Group B Streptococcal Colonization and

Disease. Infect Immun. 2018;86(7). Epub 2018/04/25. <u>https://doi.org/10.1128/IAI.00822-17</u> PMID: 29685987; PubMed Central PMCID: PMC6013667.

- Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. Nucleic Acids Res. 2019; 47(W1):W636–W41. Epub 2019/04/ 13. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkz268</u> PMID: <u>30976793</u>; PubMed Central PMCID: PMC6602479.
- Spencer BL, Chatterjee A, Duerkop BA, Baker CJ, Doran KS. Complete Genome Sequence of Neonatal Clinical Group B Streptococcal Isolate CJB111. Microbiol Resour Announc. 2021; 10(2). Epub 2021/ 01/16. <u>https://doi.org/10.1128/MRA.01268-20</u> PMID: <u>33446593</u>; PubMed Central PMCID: PMC7849706.
- Spencer BL, Deng L, Patras KA, Burcham ZM, Sanches GF, Nagao PE, et al. Cas9 Contributes to Group B Streptococcal Colonization and Disease. Front Microbiol. 2019; 10:1930. Epub 2019/09/10. <u>https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01930</u> PMID: <u>31497003</u>; PubMed Central PMCID: PMC6712506.
- Tak U, Vlach J, Garza-Garcia A, William D, Danilchanka O, de Carvalho LPS, et al. The tuberculosis necrotizing toxin is an NAD(+) and NADP(+) glycohydrolase with distinct enzymatic properties. J Biol Chem. 2019; 294(9):3024–36. Epub 2018/12/30. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005832</u> PMID: <u>30593509</u>; PubMed Central PMCID: PMC6398120.
- Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif. 2005; 41(1):207–34. Epub 2005/05/26. <u>https://doi.org/10.1016/i.pep.2005.01.016</u> PMID: <u>15915565</u>.

ANEXO B – Artigo científico públicado durante o doutorado: Identification of Zinc-Dependent Mechanisms Used by Group B Streptococcus To Overcome Calprotectin-Mediated Stress





# Identification of Zinc-Dependent Mechanisms Used by Group B *Streptococcus* To Overcome Calprotectin-Mediated Stress

<sup>10</sup>Lindsey R. Burcham,<sup>a</sup> Yoann Le Breton,<sup>b\*</sup> Jana N. Radin,<sup>c</sup> Brady L. Spencer,<sup>a</sup> Liwen Deng,<sup>a</sup> Aurélia Hiron,<sup>e</sup> Monica R. Ransom,<sup>a</sup> Jéssica da C. Mendonça,<sup>a</sup> Ashton T. Belew,<sup>b,f</sup> ONajib M. El-Sayed,<sup>b,f</sup> Kevin S. McIver,<sup>b</sup> Thomas E. Kehl-Fie,<sup>c,d</sup> Kelly S. Doran<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Immunology and Microbiology, University of Colorado School of Medicine, Aurora, Colorado, USA

<sup>b</sup>Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland, College Park, Maryland, USA

<sup>c</sup>Department of Microbiology, University of Illinois at Urbana—Champaign, Urbana, Illinois, USA

<sup>d</sup>Carl R. Woese Institute for Genomic Biology, University of Illinois at Urbana—Champaign, Urbana, Illinois, USA <sup>e</sup>Université de Tours, INRAE, ISP, Tours, France

<sup>f</sup>Center for Bioinformatics and Computational Biology, University of Maryland, College Park, Maryland, USA

Yoann Le Breton, Jana N. Radin, Kevin S. McIver, and Thomas E. Kehl-Fie contributed equally to this article.

ABSTRACT Nutritional immunity is an elegant host mechanism used to starve invading pathogens of necessary nutrient metals. Calprotectin, a metal-binding protein, is produced abundantly by neutrophils and is found in high concentrations within inflammatory sites during infection. Group B Streptococcus (GBS) colonizes the gastrointestinal and female reproductive tracts and is commonly associated with severe invasive infections in newborns such as pneumonia, sepsis, and meningitis. Although GBS infections induce robust neutrophil recruitment and inflammation, the dynamics of GBS and calprotectin interactions remain unknown. Here, we demonstrate that disease and colonizing isolate strains exhibit susceptibility to metal starvation by calprotectin. We constructed a mariner transposon (Krmit) mutant library in GBS and identified 258 genes that contribute to surviving calprotectin stress. Nearly 20% of all underrepresented mutants following treatment with calprotectin are predicted metal transporters, including known zinc systems. As calprotectin binds zinc with picomolar affinity, we investigated the contribution of GBS zinc uptake to overcoming calprotectin-imposed starvation. Quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) revealed a significant upregulation of genes encoding zinc-binding proteins, adcA, adcAll, and Imb, following calprotectin exposure, while growth in calprotectin revealed a significant defect for a global zinc acquisition mutant ( $\Delta adcA\Delta adcAll\Delta lmb$ ) compared to growth of the GBS wild-type (WT) strain. Furthermore, mice challenged with the  $\Delta adcA \Delta adcA II \Delta Imb$  mutant exhibited decreased mortality and significantly reduced bacterial burden in the brain compared to mice infected with WT GBS; this difference was abrogated in calprotectin knockout mice. Collectively, these data suggest that GBS zinc transport machinery is important for combatting zinc chelation by calprotectin and establishing invasive disease.

**IMPORTANCE** Group B *Streptococcus* (GBS) asymptomatically colonizes the female reproductive tract but is a common causative agent of meningitis. GBS meningitis is characterized by extensive infiltration of neutrophils carrying high concentrations of calprotectin, a metal chelator. To persist within inflammatory sites and cause invasive disease, GBS must circumvent host starvation attempts. Here, we identified global requirements for GBS survival during calprotectin challenge, including known and putative systems involved in metal ion transport. We characterized the role of zinc import in tolerating calprotectin stress *in vitro* and in a mouse model of infection. We observed that a global zinc uptake mutant was less virulent than the pa-

November/December 2020 Volume 11 Issue 6 e02302-20

Citation Burcham LR, Le Breton Y, Radin JN, Spencer BL, Deng L, Hiron A, Ransom MR, Mendonça JDC, Belew AT, BI-Sayed NM, McIver KS, Kehl-Fie TE, Doran KS. 2020. Identification of zinc-dependent mechanisms used by group B *Streptococcus* to overcome calprotectinmediated stress. mBio 11:e02302-20. https:// doi.org/10.1128/mBio.02302-20.

Invited Editor Laura Cook, Binghamton University

Editor Larry S. McDaniel, University of Mississippi Medical Center

Copyright © 2020 Burcham et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Kelly S. Doran, kelly.doran@cuanschutz.edu. \* Present address: Yoann Le Breton, Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, Maryland, USA.

Received 13 August 2020 Accepted 12 October 2020 Published 10 November 2020

mBio mbio.asm.org 1

rental GBS strain and found calprotectin knockout mice to be equally susceptible to infection by wild-type (WT) and mutant strains. These findings suggest that calprotectin production at the site of infection results in a zinc-limited environment and reveals the importance of GBS metal homeostasis to invasive disease.

**KEYWORDS** GBS, calprotectin, meningitis, nutritional immunity, zinc

acteria, like eukaryotes, have a strict requirement for transition metals that often Bacteria, like eukaryotes, have a strict requirement of the structural support (1). Though essential for survival, metal ions can also be toxic, and to successfully survive within a host, pathogens must coordinate ion uptake and efflux to maintain intracellular metal homeostasis (2-4). To antagonize the nutritional requirements of invading pathogens, the vertebrate host immune system has evolved elaborate mechanisms for restricting access to metal ions, a process termed nutritional immunity (5, 6). The hosts' efforts to limit access to metal ions can dampen pathogen metalloenzyme function, restricting growth and the ability to cause disease (7-9). Widely recognized host iron-binding proteins include transferrin, lactoferrin, and lipocalin-2 that sequester iron(III) or ironbound siderophores (10-12) from pathogens. Calprotectin, another metal-binding host protein, is unique in that it can interact with multiple metal ions (2). Calprotectin is a tetraheterodimer of two members of the S100 protein family, S100A8/S100A9, or calgranulin A/B and MRP-8/14 (6, 13) and makes up approximately 50% of the neutrophilic cytoplasmic protein content (13). S100A8 and S100A9 form a heterodimer that, upon calcium-dependent conformational change, create two metal-binding sites that bind zinc with picomolar/femtomolar affinity (14-16) and manganese at nanomolar affinities (7, 16, 17). More recent studies have shown that calprotectin can additionally chelate iron(II) (18-20), copper (20, 21), and nickel in vitro (22), but the implications of the binding of these metals during infection are not understood. Calprotectin is abundant during inflammation or at sites of infection, where a stool concentration of >250  $\mu$ g/g indicates active intestinal inflammation in patients with Crohn's disease (23, 24) and concentrations can exceed 1 mg/ml in tissue abscesses; therefore, invading pathogens must be able to cope with these pressures to cause disease (17, 25).

Streptococcus agalactiae, or group B Streptococcus (GBS), is a pathobiont that colonizes the vaginal tract but can be a severe threat to the fetus and newborn. The onset of GBS invasive disease in the neonate can occur as a result of aspiration during passage through a colonized birth canal (26), bacterial transmigration through the bloodstream (27), and penetration of the blood-brain barrier (BBB) (28). To combat the risk of infection in newborns, many countries have implemented the use of prophylactic antibiotics administered to colonized pregnant mothers at the time of delivery (29); however, despite these widespread efforts, GBS remains a leading cause of neonatal pneumonia, sepsis, and meningitis (30). Bacterial meningitis is a severe and potentially lethal pathology of the central nervous system that develops when pathogens overcome host defenses and successfully penetrate the BBB. Meningitis is characterized by an overwhelming cytokine response and immune cell influx to the site of infection (31). Meningitis is a particularly complex disease and results in a neonatal mortality rate as high as 40% (31, 32). Furthermore, the associated inflammation results in neuronal damage and brain injury, with nearly 20% to 50% of surviving patients suffering permanent neurological sequelae, including hearing and vision impairment, cognitive deficiencies, and seizures (33, 34).

During acute bacterial meningitis, neutrophils predominate in the cerebral spinal fluid, which is often used as a diagnostic marker. Following interaction with hu man cerebral microvascular endothelial cells (hCMEC) *in vitro*, GBS induces a characteristic neutrophilic inflammatory response, including expression of chemoattractants interleukin-8 (IL-8), C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL-1), and CXCL-2 (35–37). Similar results are observed in animal models of experimental GBS meningitis, as brain tissue of GBS-infected mice shows increased neutrophil and monocyte infiltration compared to that of naive controls (37), indicating a close interaction between GBS and

mbio.asm.org 2

granulocytic cells during active infection. Additional studies have shown that, in response to GBS, neutrophils elaborate extracellular traps decorated with lactoferrin (38) and that S100A9, a calprotectin subunit, is present in the blood and amniotic fluid during intrauterine GBS infection (39). These observations suggest that GBS experiences metal limitation during infection, but the mechanisms used by GBS to overcome nutritional immunity remain unknown.

Bacteria utilize a number of strategies to obtain zinc during infection, including direct uptake of the metal, the use of metallophores, and piracy from zinc-bound host proteins. While there is a myriad of strategies employed to obtain zinc, the AdcABC/ ZnuABC family of ATP-binding cassette transporters are present in most bacteria. Streptococcal pathogens *S. pneumoniae* and *S. pyogenes* harbor two zinc-binding proteins, AdcA and AdcAll/Lmb, whereas GBS is particularly distinct as it possesses three zinc-binding proteins, AdcA, AdcAll, and Lmb (40, 41). AdcA and AdcAll/Lmb have been shown to utilize distinct mechanisms to bind zinc ions and shuttle them through the AdcBC transporter and are important for growth in zinc-restricted environments and infection (42–45).

Here, we investigated GBS fitness during calprotectin stress using a newly constructed saturated transposon mutant library and targeted amplicon sequencing. We characterized the global requirements for GBS survival during nutritional immunity, identifying 258 mutants, 123 underrepresented and 135 overrepresented, that impact calprotectin sensitivity. We show here that characterized and putative metal transporters are important for calprotectin survival *in vitro* and that the zinc uptake machinery contributes to survival during calprotectin-induced starvation and invasive disease progression. These results provide insight into zinc-dependent mechanisms that GBS employs to evade the host immune response and nutritional immunity to successfully cause disease and establish a groundwork to study the comprehensive effects of chelation on multimetal transport in GBS.

#### RESULTS

GBS growth inhibited in the presence of calprotectin. Previous studies have shown calprotectin inhibits bacterial growth by limiting nutrient metal ions (7-9). To characterize the response of GBS to metal chelation by calprotectin, we assessed growth of GBS strains in the presence of purified calprotectin. Disease clinical isolates A909 (serotype Ia) (46), CJB111 (serotype V) (47), and COH1 (serotype III) (48) were incubated with increasing concentrations of purified calprotectin ranging from 0 to 480  $\mu$ g/ml, and growth was assessed by optical density and plating for viable bacteria. Although various levels of chelation sensitivity were detected, growth of all GBS strains (as measured by optical density at 600 nm [OD<sub>600</sub>]) was significantly inhibited at high, but still physiologically relevant, calprotectin doses (Fig. 1A to C). Similar patterns of growth inhibition were observed when growth was assessed by enumerating CFU following an 8-h incubation with calprotectin. Exposure to calprotectin at concentrations higher than 120  $\mu$ g/ml significantly inhibited growth of all GBS strains (Fig. 1D to F), while supplementation of zinc sulfate during calprotectin stress restored growth in all three strains (see Fig. S1A to C in the supplemental material). Additionally, we determined how a panel of 27 vaginal isolates collected from the vaginal tracts of pregnant women (49) survived in the presence of calprotectin. All strains were grown with or without 120  $\mu$ g/ml calprotectin, and data are displayed as percent inhibition in treated versus untreated controls for isolates belonging to five different capsular serotypes. We observed a mean percent inhibition across the isolates that ranged from 30% to 55%. When mean inhibition of each serotype was compared against the others, we observed that vaginal isolates belonging to serotype V exhibited the most variability between strains and were significantly more resistant to calprotectin-mediated chelation than serotype la isolates (Fig. 1G). Representative invasive isolates A909, CJB111, and COH1 were included in the isolate panel in their capsular serotype grouping and are denoted by the open shapes in Fig. 1G. These data suggest that while there is

November/December 2020 Volume 11 Issue 6 e02302-20



**FIG 1** Calprotectin inhibits GBS growth *in vitro*. Growth of GBS invasive isolates A909 (A), CJB111 (B), and COH1 (C) was assessed by measuring optical density (OD<sub>600</sub>) following an 8-h incubation with recombinant calprotectin (0 to 480  $\mu$ g/ml) or by quantitating CFU (D to F). (G) Sensitivity was assessed by OD<sub>600</sub> across a panel of vaginal isolates (closed shapes) and invasive isolates (open shapes) following an 8-h incubation with 120  $\mu$ g/ml calprotectin. Data are displayed as percent growth inhibition compared to that of untreated isolate controls. All experiments were performed in technical triplicates (*n* = 3), and data were averaged from three independent experiments. Significance for panels A to F was determined by Kruskal-Wallis with Dunn's multiple-comparison tests comparing treated samples to untreated controls. Significance for panel G was determined by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparison test. \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.001; \*\*\*, *P* < 0.001; \*\*\*\*, *P* < 0.001;

variation in levels of sensitivity across strains and serotypes, GBS is broadly sensitive to the antimicrobial activity of calprotectin.

Essential genes for GBS growth in calprotectin. To successfully colonize the host or survive within highly inflammatory environments during infection, GBS must cope with nutritional immunity and, specifically, metal limitation imposed by calprotectin. To identify factors that are important for responding to calprotectin-mediated chelation, we constructed a GBS saturated Krmit transposon (Tn) mutant library in the CJB111 strain background as described previously for group A Streptococcus (50). Analysis of the library revealed 68,857 unique insertion sites across the GBS genome (Fig. 2). To identify essential genes for GBS growth, we outgrew the Tn mutant library in Todd Hewitt broth with yeast extract (THY), modified RPMI medium (mRPMI), and mRPMI plus subinhibitory (60  $\mu$ g/ml) and inhibitory (480  $\mu$ g/ml) concentrations of calprotectin. We recovered CFU from these growth conditions, extracted genomic DNA, and prepared sequencing libraries as described in Materials and Methods. Transposon insertions were sequenced as previously described (51) with minor changes, and sequenced reads were mapped back to the GBS genome. Bayesian statistical analyses (52) identified, in the absence of calprotectin, 206 essential genes for growth in THY and 450 essential genes for growth in mRPMI (Fig. 3A and B), with 153 essential genes common to both media conditions (Fig. 3C; see also Table S1). The genes deemed essential for growth in THY and mRPMI were assigned clusters of orthologous groups of proteins (COGs) and were found to be involved primarily in translation, ribosomal structure, and biogenesis (23% in THY, 13% in mRPMI), replication, recombination, and repair (16% in THY, 13% in mRPMI), cell wall/membrane/envelope biogenesis (10% in THY, 10% in mRPMI), and carbohydrate transport and metabolism (10% in THY, 7% in mRPMI) (Fig. 3D and E).

Bayesian analyses were then used to determine the essential genes for growth in the presence of calprotectin. These analyses compared essential genes from the base medium (mRPMI) and subinhibitory and inhibitory concentrations of calprotectin. From these analyses, we identified 40 genes that were essential specifically for growth in mRPMI, 30 genes that were essential only for growth in a subinhibitory dose of calprotectin, and 55 genes that were essential only for growth in an inhibitory calpro-



FIG 2 Construction of a saturated *Krmit* transposon mutant library in GBS. CIRCOS atlas representation of the A909 genome is shown with base pair (bp) ruler on the outer ring. The next two interior circles represent GBS open reading frames on the (+) and (-) strands, with colors depicting COG categories. The next circle (blue) indicates the frequency of *Krmit* transposon insertion site (TIS) observed in the initial mutant library grown in THY, with 68,857 unique insertion sites detected. The inner four circles present the results of Bayesian analysis of GBS gene essentiality under different growth conditions (THY, mRPMI, mRPMI plus subinhibitory calprotectin, and mRPMI plus inhibitory dose calprotectin, in order toward center; essential genes (red), nonessential genes (green), and excluded genes in either gray (too small for analysis) or black (inconclusive call). The center circle compiles the summary analysis of GBS genes under all four growth conditions, with essential genes under all conditions (red), nonessential genes under all conditions (gellow), and small/inconclusive genes (gray/black).

tectin dose. The remaining 306 essential genes were deemed important for growth across all environments (mRPMI, subinhibitory calprotectin, and inhibitory calprotectin) (Fig. 3F and G; Table S1).

Global impact of calprotectin on GBS fitness. To determine the global effect of calprotectin on GBS fitness, differential analyses were performed using DESeq2 com-

November/December 2020 Volume 11 Issue 6 e02302-20

mbio.asm.org 5



FIG 3 GBS essential genes for growth *in vitro*. Bayesian analysis of essential genes for growth in THY (A) or mRPMI (B). Essential genes are depicted as yellow (A) or pink (B), nonessential genes are shown in black, and inconclusive genes are shown in gray. The x axis is a linear representation of the A909 genome. EggNOG 5.0 was used to assign COGs to determine functions for essential genes for growth in THY (D) and mRPMI (E). Venn diagrams depict the essential genes for growth in mRPMI and THY (C) or mRPMI and subinhibitory ( $60 \mu g/mI$ ) and inhibitory ( $480 \mu g/mI$ ) calprotectin (F). (G) Linear map represents Bayesian analyses of essential genes for growth in mRPMI and subinhibitory and inhibitory calprotectin.

paring samples treated with subinhibitory (60  $\mu$ g/ml) or inhibitory (480  $\mu$ g/ml) calprotectin and untreated mRPMI controls. Genes found to be essential for growth in mRPMI (pink), subinhibitory calprotectin (blue), inhibitory calprotectin (purple), or across two treatments (gray) were excluded from fitness analyses (Fig. 4A and B). We characterized the global impact of calprotectin stress on GBS growth and identified a total of 258 mutants in the output pool whose growth was significantly impacted by calprotectin. We identified 135 mutations that conferred a fitness advantage for GBS during calprotectin stress, with 94 mutants in subinhibitory-dose and 98 mutants in inhibitory-dose calprotectin (Fig. 4A and B; Table S1), with 57 mutants common between the two calprotectin treatment groups. We also identified 123 mutants that resulted in a fitness defect during calprotectin stress; of those, 93 mutants were important in the subinhibitory dose of calprotectin and 76 mutants were important in the inhibitory levels of calprotectin (Fig. 4A and B; Table S1), with 46 mutants observed in both calprotectintreated samples (Fig. 4C). Of the Tn mutants that were identified as underrepresented following treatment with calprotectin, COGs were identified for 76 of the mutations observed in subinhibitory treatment and 60 of the mutations observed in inhibitory calprotectin treatment. The most abundant COGs of known function were those involved in inorganic ion transport, amino acid and carbohydrate transport and metabolism, and defense (Fig. 4D and E). Approximately 15% of the mutants underrepresented in both concentrations were grouped into the inorganic ion COG and were previously characterized or putative systems involved in metal ion uptake or efflux (Table 1). These systems involved in maintaining metal homeostasis were many of the

November/December 2020 Volume 11 Issue 6 e02302-20

mbio.asm.org 6



**FIG 4** GBS genomic fitness screen in calprotectin. Volcano plots identify essential genes for growth in mRPMI and subinhibitory ( $60 \ \mu g/mI$ ) calprotectin (A) and inhibitory ( $480 \ \mu g/mI$ ) calprotectin (pink, blue/purple, and gray) (B) as well as nonessential genes (black) and genes involved in metal transport (red). (39). Essential genes (all but "nonessential" and "metal transport") were excluded from fitness analyses by DESeq2. (C) Venn diagram depicts the underrepresented mutants detected in low ( $60 \ \mu g/mI$ ) and high calprotectin ( $480 \ \mu g/mI$ ) and common genes important for growth under both conditions. COGs were assigned to genes that contribute to survival in subinhibitory dose (B) and inhibitory dose (C) of calprotectin using EggNOG 5.0. (F) Schematic of GBS metal importers that contribute to survival during calprotectin stress.

most significantly underrepresented mutants as denoted in the volcano plots (shown in red) for each calprotectin concentration (Fig. 4A and B).

To gain more insight into how the identified metal transport systems may contribute to homeostasis, all proteins of interest were clustered by ortholog against characterized metal transport machinery in the closely related *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 genome. Of the three genes encoding zinc-binding proteins, we identified only *adcA* (*SAK\_0685*) and *adcAll* (*SAK\_1898*) as important for growth in calprotectin. The gene encoding their cognate ATPase, *adcC* (*SAK\_0218*), and one of the genes encoding

# TABLE 1 Genes encoding metal transporters implicated in survival in calprotectin

Locus tag	Name	Description	P value control vs. calprotectin at:	
			Subinhibitory dose	Inhibitory dose
SAK_0218	adcC	Zinc ABC transporter, ATP-binding protein	0.01132	0.00004049
SAK_0252	SAK_0252	Peptide/opine/nickel uptake ABC transporter, substrate-binding protein	2.713E-15	1.019E-15
SAK_0253	SAK_0253	Peptide/opine/nickel uptake ABC transporter, permease protein	2.396E-19	4.972E-11
SAK_0254	SAK_0254	Peptide/opine/nickel uptake ABC transporter, permease protein	1.971E-17	1.16E-20
SAK_0255	SAK_0255	Peptide/opine/nickel uptake ABC transporter, ATP-binding protein	3.388E-19	7.2E-19
SAK_0514	czcD	Cation efflux transporter, cation diffusion facilitator (CDF) family	0.002825	0.01577
SAK_0515	scZA	Transcriptional regulator, TetR family	3.515E-07	0.00000315
SAK_0516	SAK_0516	Transcriptional regulator, AraC family	7.831E-11	6.017E-10
SAK_0685	adcA	Zinc ABC transporter, zinc-binding protein	2.612E-28	2.018E-21
SAK_0871	mntH	Mn <sup>2+</sup> /Fe <sup>2+</sup> transporter, NRAMP family	0.006823	0.04543
SAK_1539	nikE	Nickel ABC transporter, ATP-binding protein	0.04795	
SAK_1554	mtsC	Metal ABC transporter, permease protein	9.914E-12	
SAK_1555	mtsB	Metal ABC transporter, ATP-binding protein	2.325E-10	
SAK_1556	mtsA	Metal ABC transporter, metal-binding lipoprotein	1.381E-11	0.003134
SAK_1897	shtll	Streptococcal histidine triad family protein	0.0001926	2.972E-08
SAK_1898	adcAll	Laminin-binding surface protein		0.04445
SAK_2051	cadD	Cadmium resistance protein	0.000001093	6.657E-11

November/December 2020 Volume 11 Issue 6 e02302-20

mbio.asm.org 7



**FIG 5** Zinc transport contributes to calprotectin resistance. Quantitative RT-PCR was used to assess expression of *adcA* (A), *adcAII* (B), and *Imb* (C) following exposure to 120  $\mu$ g/ml calprotectin (CP) or 25  $\mu$ M TPEN (TP). Fold change was calculated by  $\Delta\Delta C_{\tau}$  analysis with *gyrA* serving as the internal control. Data are displayed as the average fold change from three independent experiments. Significance was determined by unpaired Student's t tests. \*\*, P < 0.001; \*\*\*\*, P < 0.0001.

a streptococcal histidine triad protein, *shtll (SAK\_1897)*, were also underrepresented in our Tn sequencing analyses (Fig. 4F). Underrepresentation of mutants in *adcAll* was specific to treatment with inhibitory levels of calprotectin, while mutants in the remaining zinc transport genes detected were defective in calprotectin survival independent of concentration (Table 1).

In addition to the zinc machinery, significant underrepresentation was detected for Tn insertions in the genes encoding the manganese/iron ABC transporter, *mtsABC* (*SAK\_1554-1556*), and the gene encoding the manganese/iron natural resistanceassociated macrophage protein (NRAMP), *mntH* (*SAK\_0871*) (53) (Fig. 4F). Ortholog clustering again confirmed the conservation of the GBS transporter MtsABC to the pneumococcal transporter PsaABC (53, 54); however, other pathogenic streptococci, including *S. pyogenes* and *S. pneumoniae*, are devoid of manganese- and irondependent NRAMP transporters (55–57). Additionally, mutants in genes that comprise two other putative metal ion uptake systems were identified as underrepresented (Fig. 4F). *nikD* (*SAK\_1539*) is an ATP-binding protein encoded within the operon *nikABCDE* (*SAK\_1538-1542*) that encodes a putative but uncharacterized nickel ABC transport system, and the second underrepresented and uncharacterized ABC transport system is encoded by *SAK\_0252-0255*; however, the substrate transported by this system remains unknown (Fig. 4F). The substrate-binding proteins of both putative metal transport systems belong to the NikA/DppA/OppA superfamily.

Calprotectin induces expression of zinc import machinery. Upon identifying mutants in genes encoding two zinc-binding proteins, adcA and adcAll, in our transposon sequencing analyses, we hypothesized that differential expression of genes involved in zinc acquisition might occur following exposure to calprotectin, a natural source of zinc limitation. Quantitative reverse transcriptase PCR (gRT-PCR) analysis of genes encoding the zinc-binding proteins adcA, adcAll, and Imb was performed following treatment with calprotectin or the cell membrane permeable chelator N.N.'.N'tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine (TPEN). TPEN chelates zinc with an extremely high affinity (dissociation constant  $[K_d] = 10^{-15}$  M); however, it has been shown to bind other metal ions, including nickel (58), iron (59), and copper (60). Fold changes in gene expression were calculated by the comparative threshold cycle ( $\Delta\Delta C_{\tau}$ ) with gyrA serving as an internal control and were compared to expression observed in untreated controls. Expression of adcA was induced 4-fold following exposure to calprotectin and 10-fold following TPEN treatment, while expression of adcAll and Imb was more robustly upregulated, with 18- and 15-fold inductions, respectively, in response to calprotectin treatment and 320- and 227-fold inductions, respectively, after treatment with TPEN (Fig. 5A to C). Expression of SAK\_0514, ortholog to the cation diffusion facilitator encoded by czcD of S. pneumoniae, was also assessed by qRT-PCR to confirm that calprotectin and TPEN were inducing zinc-limited conditions. As expected, expression of czcD was downregulated following exposure to both (see Fig. S2A). To confirm what was previously described for GBS in zinc-limited chemically

November/December 2020 Volume 11 Issue 6 e02302-20

mBio

mbio.asm.org 8



**FIG 6** GBS zinc homeostasis contributes to calprotectin survival *in vivo*. Kaplan-Meier plot showing survival of C57BL/6 (A) or  $5100A9^{-/-}$  (E) mice infected with  $3 \times 10^8$  CFU of WT (solid line) or the  $\Delta adcA\Delta adcAll\Delta lmb$  mutant (dotted line). Recovered CFU were quantified from brain tissue homogenates (B and F) or blood (C and G). (D and H) Cytokine abundance was quantified from brain tissue homogenates by ELISA. Statistical analyses include log rank (Mantel-Cox) tests for panels A and E and unpaired Student's t tests for panels B to D and F to H. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; ns, not significant.

defined medium (40, 41), we observed that mutants lacking individual zinc-binding proteins exhibited similar calprotectin sensitivity as the wild-type (WT) GBS strain, while growth of a triple  $\Delta adcA\Delta adcA||\Delta|mb$  mutant was reduced (Fig. S2B). An increased sensitivity to calprotectin was also observed in a triple  $\Delta adcA\Delta adcA||\Delta|mb$  mutant compared to that for the WT in both A909 and CJB111 strain backgrounds (Fig. S2C and D). These significant differences, though subtle are consistent with previous results that demonstrate functional redundancy exists between zinc-binding proteins and suggest that additional transport systems could be contributing to survival during calprotectin stress.

Zinc homeostasis contributes to GBS virulence and meningitis. Our results thus far suggest that GBS utilizes zinc uptake machinery to cope with calprotectin stress in vitro; thus, we hypothesized that zinc homeostasis would contribute to GBS virulence. Using a murine model of GBS systemic infection, we infected mice (C57BL/6) intravenously with the A909 WT or the isogenic \(\Delta adcA\(\Delta adcA\) adcA\(\Delta dcA\) mutant strain. Infection with the WT GBS strain resulted in significantly higher mortality than with the mutant strain (Fig. 6A). By 36 h postinfection, 7/8 WT infected mice succumbed to infection. Conversely, only 3/8 mice challenged with the  $\Delta adcA\Delta adcAll\Delta lmb$  strain succumbed to infection by the experimental endpoint of 144 h (Fig. 6A). At the time of death or the experimental endpoint, blood and brains were harvested to determine bacterial load. Despite similar levels of bacterial CFU recovered from blood (Fig. 6B), a significantly higher bacterial burden was observed in brain tissue (Fig. 6C) of WT GBS-infected animals than in animals infected with the \(\Delta adcA\(\Delta adcA\) adcA\(\Delta dcA\) we further detected an increase in KC, a neutrophil chemokine, in brain homogenates of mice challenged with WT GBS compared to that in the  $\Delta adcA\Delta adcAll\Delta lmb$  mutant strain (Fig. 6D), suggesting a more robust infection and increased inflammation in WTinfected mice. Similar results were also observed in the GBS CJB111 background (see Fig. S3A to D) and during infection in another mouse (CD-1) background (Fig. S3E to G).



**FIG 7** Summary of the GBS zinc-dependent response to calprotectin. GBS senses metal limitation in the presence of calprotectin and induces expression of three zinc-binding proteins to acquire zinc and overcome starvation. GBS that is capable of regulating zinc homeostasis in a zinc-limited environment remains virulent, whereas GBS zinc transport mutant strains are deficient in their ability to cause invasive disease.

To determine the contribution of calprotectin specifically to GBS disease progression, we infected  $5100A9^{-/-}$  mice with WT and  $\Delta adcA\Delta adcAll\Delta lmb$  GBS. We observed that  $5100A9^{-/-}$  mice were equally susceptible to WT and mutant GBS (Fig. 6E) and had similar bacterial loads in the brain and blood (Fig. 6F and G) and levels of neutrophilic chemokine KC in brain tissue (Fig. 6H). Interestingly,  $5100A9^{-/-}$  mice were less susceptible to WT GBS infection than WT mice. Taken together, these data indicate that GBS zinc homeostasis is required for invasive disease, specifically, in the presence of host calprotectin.

# DISCUSSION

GBS infections are known to result in increased immune cell influx and inflammation, specifically, neutrophilic infiltrate (35, 61). As these are characteristic signs of bacterial meningitis, GBS would encounter high concentrations of granulocyte-derived calprotectin (62) during infection. Calprotectin makes up more than 50% of the neutrophil cytosol and has been proven to be an effective molecule at starving incoming pathogens of nutrient metal ions (7, 63). However, despite this mechanism employed by the immune system to impede bacterial growth, GBS continues to cause life-threatening illnesses, suggesting that this bacterium possesses machinery to thwart host defenses and permit survival. Here, we have examined the global effect of calprotectin stress on GBS fitness using a newly developed mariner GBS transposon mutant library. We identified systems involved in zinc and manganese/iron homeostasis as well as putative metal-transport systems that were not previously described in GBS to be important for growth in the presence of calprotectin. Through mutagenesis and functional analyses, we determined that the Adc zinc acquisition system, comprising three zinc-binding proteins, promotes survival during calprotectin stress and contributes to systemic infection in vivo. Furthermore, the loss of calprotectin in vivo ablates the requirement of zinc homeostasis for GBS virulence. These data support the growing appreciation for the role of zinc uptake in bacterial pathogenesis and provide new insight into the mechanisms by which GBS resists nutritional immune challenge (Fig. 7).

In this study, we demonstrate, for the first time, the global impact of calprotectinmediated metal chelation on GBS fitness using transposon library screening. We observed that growth of both GBS disease and colonizing clinical isolates was inhibited by physiologically relevant concentrations of recombinant calprotectin. Serotype V isolates were significantly more resistant to chelation than serotype la isolates *in vitro*,

#### mBio°

but the basis for this requires further investigation. As our current understanding of GBS metal homeostasis is limited, we sought to characterize the global effects of calprotectin-mediated metal chelation on GBS fitness, utilizing a newly constructed Krmit transposon mutant library. This screen identified COG categories of GBS gene function during calprotectin stress, with the most abundant genes of known function involved in inorganic ion transport, amino acid and carbohydrate transport and metabolism, transcription, cell wall biogenesis, and defense mechanisms. Some of the most significant underrepresented factors identified were those involved in metal transport, including zinc/manganese/iron uptake and efflux. Our data also identified GBS essential genes for growth in rich media, including THY and mRPMI, and our results were consistent with a previous study using transposon sequencing of a different GBS strain, which identified essential genes in tRNA synthesis pathways, glycolysis, and nucleotide metabolism (64). We did, however, observe some differences. The transcriptional regulator ccpA was previously deemed part of the GBS essential genome (64), though in our analysis, ccpA was only essential in mRPMI. Similarly, the global nutritional regulator codY, which is essential for Streptococcus pneumoniae growth (65) and nonessential for GBS in rich medium (64), was found in our study to be nonessential for growth in THY but essential for GBS growth in mRPMI. Together, these data suggest that the essential genome of GBS is largely similar across strains, although this is dependent on the growth medium.

To survive in metal-limited environments, bacterial pathogens possess tightly regulated, high-affinity metal uptake systems, and many Gram-positive bacteria are known to use the ZnuABC/AdcABC zinc transport systems (66-68). In the case of pathogens such as Staphylococcus aureus and Bacillus anthracis, each possesses a single zincbinding protein, AdcA and ZnuA, respectively (69, 70), and their associated ATP-binding cassette transporter permease and ATPase are AdcB/ZnuB and AdcC/ZnuC (40, 71). The zinc uptake machinery of streptococcal pathogens S. pneumoniae and S. pyogenes possess two zinc-binding lipoproteins, AdcA and AdcAll/Lmb. GBS is particularly unique in that in addition to AdcA and AdcAll, it harbors a third zinc-binding protein, annotated as Lmb (72), encoded on a mobile element that is cotranscribed with a second streptococcal histidine triad protein, Shtll. Lmb is thought to have been acquired by horizontal gene transfer and shares homology with Lsp of Streptococcus pyogenes (73), but the direct origin remains unknown. Originally annotated as laminin-binding proteins, Lmb and Lsp were thought to contribute to adherence, though this interaction has been debated and may be species or strain dependent (44, 74, 75). The GBS zinc uptake machinery is encoded by four distinct operons and is under the regulation of the zinc-dependent AdcR repressor (40). AdcR is involved in maintaining intracellular zinc homeostasis and has been shown to be important for growth under zinc-limited conditions (40, 41). Components of this system are also significantly upregulated during GBS murine vaginal colonization and following incubation with human blood (76, 77). In addition to the ABC transporters, bacteria have evolved other mechanisms to maintain zinc homeostasis, examples include the metallophore staphylopine produced by Staphylococcus aureus that binds zinc ions and is imported by the CntABCDF machinery (70) and the TdfH transporter of Neisseria gonorrhoeae that binds calprotectin directly to hijack and secure zinc ions (78). Although, similar systems have not been described in GBS.

Our transposon mutant screen during calprotectin treatment identified loss-offunction mutations in the zinc-binding protein AdcA as the most significantly underrepresented metal mutation. Mutants in the AdcC subunit of the zinc-dependent ABC transporter, zinc-binding proteins AdcA and AdcAll, and the streptococcal histidine triad protein Shtll were also underrepresented in our screen. Interestingly, mutations in Lmb and Sht did not result in fitness defects in our transposon library screen, suggesting that in a competitive growth environment, loss of either AdcA or AdcAll reduced GBS fitness in the presence of calprotectin. However, in monoculture, while loss of all three solute-binding proteins sensitized GBS to calprotectin, their individual losses did not. Expression of *adcAll* and *Imb* were both induced to greater extent than *adcA* by

mbio.asm.org 11

both calprotectin and TPEN, and mutations in AdcAll were specifically observed in inhibitory calprotectin treatment. Collectively, these observations could indicate that the GBS zinc importers may uniquely contribute to resisting metal limitation or other aspects of infection, but further investigation is needed.

Additional systems of interest that were underrepresented in our calprotectin transposon library screen were mtsABC (SAK\_1554 to 1556), mntH (SAK\_0871), sczA (SAK\_0515), czcD (SAK\_0514), and cadD (SAK\_2051). mtsABC encodes the manganese/ iron-dependent ABC transporter, and mtsA is a component of the core GBS genome and could be a conserved system for survival during calprotectin-mediated stress within the host (53, 79). Additionally, mntH encodes the manganese/iron NRAMP and is known to be important for survival under acidic conditions similar to what GBS would encounter during inflammation or within the phagolysosome (57). Similar to what has been shown for zinc import, the mtsABC transporter was shown to be upregulated in human blood and during vaginal colonization (76, 77). In the context of metal ion efflux, we identified mutations in sczA, czcD, and cadD, which all resulted in fitness defects when grown in media containing calprotectin. SczA is a zinc-dependent transcriptional activator of the cation diffusion facilitator protein CzcD. This system has been shown to contribute to bacterial survival during zinc toxicity, neutrophil and macrophage killing, and GAS virulence (80-83). To date, SczA has been suggested to be an activator in GBS (80), but the functional roles of SczA and CzcD in metal efflux and GBS survival have not been described. Additionally, the cadDX operon in Streptococcus salivarius has been shown to have both cadmium- and zinc-inducible repression (84); thus, CadD may function similarly in GBS, but this warrants further investigation. Recently, a new highly virulent GBS sequence type (ST), ST485 of the clonal complex 103, has become increasingly common in China, specifically, with the frequency of isolation quickly climbing from 1% to 14% (85). These isolates have evolved from a genetic lineage capable of causing both human and bovine disease, and both the increase in virulence and rapid emergence of these isolates are thought to be due to the acquisition of the cadDX operon (85).

An additional strength of our study is the sensitivity of our screen to detect genes involved in overcoming various degrees of metal starvation. We identified 30 genes that were essential for GBS growth in a subinhibitory concentration of calprotectin (see Table S1 in the supplemental material), representing genes that are necessary for overcoming low-level metal sequestration but are nonessential for survival in extreme metal limitation. Genes of importance include those encoding two ribosomal proteins, key enzymes involved in glycolysis, two enzymes involved in folate metabolism, and a cobalt transporter ATPase. We also identified 55 uniquely essential genes for survival in inhibitory levels of calprotectin. These genes represent those that are important for growth when GBS encounters high degrees of starvation or the starvation of multiple metals. Systems of interest in these data were genes encoding four ribosomal proteins, six prophage-related proteins, phosphotransferase systems, and the stress response serine protease HtrA (Table S1). These differential findings are significant, as it is becoming increasingly appreciated that metal starvation/intoxication occurs across a gradient and that the maintenance of metal homeostasis is dynamic and requires numerous fine-tuned responses. These data are supported by previous studies that show streptococcal metabolism (86, 87) to be dependent on metal ions and that ribosomal proteins serve as reservoirs for intracellular zinc during metal limitation (88).

As the relative contribution of zinc homeostasis to GBS virulence had not been previously characterized, we utilized a murine model of GBS systemic infection to compare WT and  $\Delta adcA \Delta adcA \parallel \Delta lmb$  strains. These experiments demonstrated that the  $\Delta adcA \Delta adcA \parallel \Delta lmb$  mutant was significantly attenuated compared to WT GBS in two different GBS strain backgrounds and in different mouse strains. These data further validate our *in vitro* results and confirm the importance of zinc uptake machinery to the pathogenesis of GBS infection. To determine the contribution of host calprotectin to the GBS disease process, we utilized a calprotectin knockout mouse strain (*S100A9<sup>-/-</sup>*) (89, 90). In contrast to the phenotypes observed in WT mice, *S100A9<sup>-/-</sup>* mice were

mBio°

equally susceptible to GBS WT and  $\Delta adcA \Delta adcA ll \Delta lmb$  strains (Fig. 7A), suggesting that zinc transport machinery is expendable when the zinc-limiting pressure of calprotectin is absent. Furthermore, we observed that WT mice exhibited increased mortality due to GBS infection compared to that of  $5100A9^{-/-}$  mice. In our studies, nearly 90% of WT mice infected with WT GBS succumbed to illness by 48 h, whereas the  $5100A9^{-/-}$  mice infected with WT GBS did not reach 50% lethality until 90 h postinfection. Similar trends were recently observed in  $5100A9^{-/-}$  mice challenged with *S. pyogenes* (91). Additionally, these data are consistent with previous findings that suggest a role for calprotectin as an immunological alarmin in promoting inflammatory signaling (92–94). Studies to determine the specific role of calprotectin in inflammation during GBS disease progression warrant further investigation.

Here, we report the generation and utilization of a highly saturated GBS *mariner* transposon library to investigate bacterial response to calprotectin-mediated metal chelation. Genome-wide screening revealed numerous metabolic pathways and metal transport systems that may contribute to the ability of GBS to overcome calprotectin stress and nutritional immunity. Our results emphasize the importance of zinc transport to the development of GBS systemic infection, highlighting the significance of zinc homeostasis to disease progression. As zinc uptake machinery is highly conserved across streptococcal pathogens, they present a promising target for the development of novel antimicrobials.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** Streptococcus agalactiae (GBS) isolates A909 (serotype Ia), CJB111 (serotype V), COH1 (serotype III), a cohort of 25 vaginal colonization isolates (serotypes Ia, Ib, II, III, and V) (49), and mutant strains (A909  $\Delta adcA$ , A909  $\Delta adcA$ /I, A909  $\Delta Imb$ , A909  $\Delta adcA\Delta adcAll\Delta Imb$ , and CJB111  $\Delta adcA\Delta adcAll\Delta Imb$ ) were cultured in Todd-Hewitt broth (THB) at 37°C. Mutant strains were constructed as previously described (40, 41). Deletion of these genes did not affect growth in metalsufficient medium (40).

**Calprotectin growth assays.** Briefly, GBS cultures grown overnight (for 18 h) in THB were diluted 1:50 into 100  $\mu$ l in a 96-well microtiter plate with 38% 3× modified RPMI medium (mRPMI) (95) (RPMI powder [Gibco 31800-022], 150 mM HEPES [pH 7.4], 1.5% glucose, 3× basal medium Eagle [BME] vitamins [Sigma], 75  $\mu$ g/ml guanine, 75  $\mu$ g/ml uracil, and 75  $\mu$ g/ml adenine), 62% calprotectin buffer (20 mM Tris [pH 7.5], 100 mM NaCl, and 3 mM CaCl<sub>2</sub>), and 0 to 240  $\mu$ g/ml recombinant calprotectin (70, 96). The range of recombinant calprotectin was previously established for assaying bacterial survival *in vitro* (17, 97). At 8 h postinoculation, growth was assessed by measuring optical density (OD<sub>600</sub>) and plating serial dilutions to quantitate CFU. In experiments where zinc was supplemented to counter calprotectin chelation, zinc sulfate was added at 50  $\mu$ M for A909 or 100  $\mu$ M for COH1 and CJB111 strains.

Generation of mariner (Krmit) mutant libraries in GBS for Tn sequencing. In vivo mariner transposition for random mutagenesis in GBS was accomplished using the pKrmit system originally developed for GAS (50), as previously described (50, 98). Briefly, GBS CJB111 cells were transformed by electroporation with 300  $\mu$ g of pKrmit and outgrown in THY at 30°C (permissive temperature for pKrmit replication) for 4 h. Transformants were then selected by plating on THY agar containing 300  $\mu$ g/ml kanamycin (Km) 100  $\mu$ g/ml and spectinomycin at 30°C for 48 h. The presence of intact pKrmit was phenotypically tested as previously described (98), and proper GBS transformants were stored at – 80°C. For *Krmit* transposition, an individual pKrmit-containing GBS freezer stock was used to inoculate 250 ml of THY containing Km and incubated overnight at 37°C ( $T_0$ ) (nonpermissive temperature for pKrmit replication). The quality of *Krmit* transposition was tested as previously described (98, 99): the complexity or randomness of *Krmit* mutant libraries was assessed by amplifying the insertion sites of random mutants by arbitrarily primed PCR (AP-PCR), Sanger DNA sequencing, and mapping onto the appropriate GBS genome. Percent randomness was determined by defining a ratio of unique insertions (by AP-PCR) sequencing, among a tested population.

**Transposon library screening.** The GBS pooled *Krmit* library was grown overnight in THB with 300  $\mu$ g/ml kanamycin. Overnight culture was back diluted into 38% 3× mRPMI with 62% calprotectin buffer and 0, 60, or 480  $\mu$ g/ml purified calprotectin. Samples were incubated at 37°C for 8 h. Following incubation, samples were centrifuged and resuspended in 200  $\mu$ l phosphate-buffered saline (PBS). The total volume was spread onto Todd-Hewitt agar (THA) plates and incubated overnight at 37°C. Bacterial growth from each treatment condition was collected and pooled into three samples, and genomic DNA was extracted using a Zymobiomics DNA miniprep kit (Zymo Research).

**Transposon library sequencing.** Library preparation and sequencing were performed as previously described (51) by the microarray and genomics core at the University of Colorado Anschutz Medical Campus. Briefly, genomic DNA was sheared to approximately 340-bp fragments and processed through the Ovation Ultralow V2 DNA-Seq library preparation kit (Tecan); 9 ng of each library was used as the template to enrich by PCR (16 cycles) for the transposon insertions using *Krmit*-specific (TCGTCGGCAG CGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCGGGGACTTATCA<u>T</u>CCAACC) and Illumina P7 primers. The enriched PCR products were diluted 1:100, and 20 µl was used as the template for an indexing PCR (9 cycles) using

157

the TruSeg P5 indexing and P7 primers. Sequencing was performed using an Illumina NovaSeg 6000 in a 150-base paired-end format.

Bioinformatic analyses of Tn sequencing. Two annotated Streptococcus agalactiae genomes were used as the reference for these analyses, namely, CJB111 (AAJQ01000001) and A909 (NC\_007432). The provided annotation is based on the A909 genome, as the annotated CJB111 genome has significantly lower coverage. Italicized directory names (ending in/) refer to directories within the git repository for this project available at https://github.com/abelew/sagalacticae\_2019. Much of the postprocessing was handled by the hpgltools R package (100). Approximately 2.5 million reads of each raw library were queried for quality with Fastqc (101) before removing the mariner inverted terminal repeat (ITR) leading sequences with cutadapt (102). These libraries were aligned against the reference genomes with Bowtie (103, 104) using options to allow one mismatch (-v 1) and randomly assign multimatched reads to one of the possible matching positions (-M 1). The resulting alignments were converted to sorted/compressed binary alignments (105) and counted (106) against the reference genome coding DNA sequence (CDS) and intergenic regions. The essentiality software package (52) provides an opportunity to query statistically significant stretches of TAs that have no observed insertions to further inform its metric of essentiality. The insertion data were therefore converted into its expected format and passed to the version 1.21 of the implementation Python script. The resulting table provided a count of the number of insertions observed in each open reading frame (ORF), the number of observed TAs, the maximum length of the nonobserved sequence, the nucleotide span of this region, a call on whether each ORF is essential, and the posterior probability for each call. The default options were used, except multiple runs were performed with the minimum hit parameter set to 1, 2, 4, 8, 16, and 32. These operations were performed via CYOA (https://github.com/abelew/CYOA). In a separate invocation, the three replicates for the control, low concentration, and high concentration samples were concatenated into a single sample, and essentiality was run on the combined samples. The libraries were quantified with respect to relative coverage, similarity, and saturation and with respect to available TA insertion points. These tasks were performed using the hpgltools and the input text/wig files for the essentiality package. Thus, the essentiality input files were read into the R function "plot\_saturation" and used to visualize the saturation of each library. This was done by taking the  $\log_2$  (hits + 1) for each position and plotting them as a set of histograms. Comparison and normalization of control (input) and experimental (output) libraries were performed similarly to the essentials software package (107, 108) but using a combination of voom/ limma, EdgeR, DESeq2, EBSeq, and a statistically uninformed basic analysis instead of EdgeR. Pairwise Euclidean distances, Spearman correlation coefficients, and principal-component analyses were then used to visualize the similarities/differences between normalized libraries. Clustering of orthologous groups of proteins (COGs) were assigned using EggNOG 5.0.0 (109), and Venn diagrams were calculated and plotted using BxToolBox (BioInfoRx, Inc., Madison, WI).

Quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) and ELISA. GBS strains were grown to midlogarithmic phase (OD<sub>600</sub> of 0.4) in mRPMI and incubated with 120 µg/ml calprotectin for 1 h at 37°C or 25  $\mu$ m TPEN for 15 min at 37°C. Following incubation, bacteria were centrifuged at 5,000 imes g for 5 min, total RNA was extracted (Macherey-Nagel), and cDNA was synthesized (Quanta Biosciences) per the manufacturers' instructions. The following primer sequences (shown 5' to 3') were used in this study: adcA (forward [F], GAACGTGCGATTTCTGTTGTAG; reverse [R], TGCAATGTAAGCATCTGCATTT), adcAll (F, GCTAGTTGTGTGTGGATGAGTT; R, GGAGTAGATGAGTCAACCTTGTATG), Imb (F, GGCCTGGAAGATATGGAA GTG; R, GTATGCTGGGTCACAAAGGT), and czcD (F, TCAATACCATCCATTGACCAGAT; R, GATTCCATAGATT ACGCTGCATTAC). KC from mouse brain homogenates was quantitated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) per the manufacturer's instructions (R&D Systems).

Ortholog clustering. To evaluate if metal transport machinery involved in survival during calprotectin stress was orthologous to that in characterized systems, the closely related Streptococcus pneumoniae TIGR4 (GCF\_000006885.1) and S. agalactiae A909 (GCF\_000012705.1) were used as input for the program OrthoFinder v. 2.2.6 (110). Domain architecture of proteins in each orthogroup collected were evaluated using InterProScan v. 5.27-66.0 (111). Predicted operons in GBS were determined using the Database of prOkaryotic OpeRons (DOOR<sup>2</sup>) (112-114).

Mouse model of GBS systemic infection. All animal experiments were conducted under the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee (number 00316) at the University of Colorado Anschutz Medical Campus and performed using accepted veterinary standards. We utilized a mouse model of systemic infection as previously described (28, 36, 37), in which female 8-week-old C57BL/6, C57BL/6 S100A9-/-, and CD1 mice were injected intravenously with 3 × 10<sup>8</sup> CFU of WT A909 or A909  $\Delta adcA\Delta adcAll\Delta lmb$  or  $1 \times 10^7$  CFU CJB111 or CJB111  $\Delta adcA\Delta adcAll\Delta lmb$  mutant strains. Mice were euthanized, and blood and brain tissues were collected. Tissue homogenates and blood were plated on THA to quantify GBS CFU burden.

Statistical analyses. Significance during calprotectin growth experiments was determined by the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple-comparison posttest with treated samples compared to untreated controls. Normality was confirmed for clinical isolate data by the Shapiro-Wilk test, and significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple-comparison posttest. Calprotectin growth assays using GBS WT and mutant strains was analyzed by the Kruskal-Wallis test with Dunnett's multiple-comparison test. Statistical differences in murine experiments were determined by the log rank Mantel-Cox test for survival and by an unpaired Student's t test. Statistical significance was accepted when P value was  $\leq \alpha$ , with an  $\alpha$  of 0.05.

Data availability. Sequencing reads from the transposon sequencing analyses are available in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under the accession number PRJNA667098.

November/December 2020 Volume 11 Issue 6 e02302-20

158

# SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only. FIG S1, TIF file, 0.1 MB. FIG S2, TIF file, 0.2 MB. FIG S3, TIF file, 0.2 MB. TABLE S1, XLSX file, 0.4 MB.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the University of Colorado Anschutz Medical Campus genomics and microarray core and Dr. Alexander Tice at Mississippi State University for assistance with sequencing and data analysis.

This work was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES; finance code 001 to J.D.C.M.), by NIH 5T32AI007405-28 and F32AI143203 (to B.L.S.), NIH/NIAID R21 AI134078 and R01 AI047928 (to K.S.M.), and NIH/NINDS R01 NS116716 (to K.S.D.).

### REFERENCES

- Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday GL, Thornton JM. 2008. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. J Biol Inorg Chem 13:1205–1218. https://doi.org/10.1007/s00775 -008-0404-5.
- Zygiel EM, Nolan EM. 2018. Transition metal sequestration by the host-defense protein calprotectin. Annu Rev Biochem 87:621–643. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012312.
- Waldron KJ, Robinson NJ. 2009. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? Nat Rev Microbiol 7:25–35. https://doi.org/10.1038/nrmicro2057.
- Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ. 2009. Metalloproteins and metal sensing. Nature 460:823–830. https://doi.org/10 .1038/nature08300.
- Hood MI, Skaar EP. 2012. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. Nat Rev Microbiol 10:525–537. https://doi .org/10.1038/nrmicro2836.
- Becker KW, Skaar EP. 2014. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. FEMS Microbiol Rev 38:1235–1249. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12087.
- Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, Anderson KL, Dattilo BM, Dunman PM, Gerads R, Caprioli RM, Nacken W, Chazin WJ, Skaar EP. 2008. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. Science 319:962–965. https://doi.org/ 10.1126/science.1152449.
- Hood MI, Mortensen BL, Moore JL, Zhang Y, Kehl-Fie TE, Sugitani N, Chazin WJ, Caprioli RM, Skaar EP. 2012. Identification of an Acinetobacter baumannii zinc acquisition system that facilitates resistance to calprotectin-mediated zinc sequestration. PLoS Pathog 8:e1003068. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003068.
- Achouiti A, Vogl T, Urban CF, Röhm M, Hommes TJ, van Zoelen MAD, Florquin S, Roth J, van 't Veer C, de Vos AF, van der Poll T. 2012. Myeloid-related protein-14 contributes to protective immunity in Gram-negative pneumonia-derived sepsis. PLoS Pathog 8:e1002987. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002987.
- Weinberg ED. 1975. Nutritional immunity: host's attempt to withhold iron from microbial invaders. JAMA 231:39–41. https://doi.org/10 .1001/jama.1975.03240130021018.
- Xiao X, Yeoh BS, Vijay-Kumar M. 2017. Lipocalin 2: an emerging player in iron homeostasis and inflammation. Annu Rev Nutr 37:103–130. https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064559.
- Cassat JE, Skaar EP. 2013. Iron in infection and immunity. Cell Host Microbe 13:509–519. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.010.
- Kehl-Fie TE, Skaar EP. 2010. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. Curr Opin Chem Biol 14:218–224. https://doi.org/ 10.1016/j.cbpa.2009.11.008.
- Brophy MB, Hayden JA, Nolan EM. 2012. Calcium ion gradients modulate the zinc affinity and antibacterial activity of human calprotectin. J Am Chem Soc 134:18089–18100. https://doi.org/10.1021/ja307974e.
- Nakashige TG, Stephan JR, Cunden LS, Brophy MB, Wommack AJ, Keegan BC, Shearer JM, Nolan EM. 2016. The hexahistidine motif of

November/December 2020 Volume 11 Issue 6 e02302-20

host-defense protein human calprotectin contributes to zinc withholding and its functional versatility. J Am Chem Soc 138:12243–12251. https://doi.org/10.1021/jacs.6b06845.

- Hayden JA, Brophy MB, Cunden LS, Nolan EM. 2013. High-affinity manganese coordination by human calprotectin is calcium-dependent and requires the histidine-rich site formed at the dimer interface. J Am Chem Soc 135:775–787. https://doi.org/10.1021/ja3096416.
- Kehl-Fie TE, Chitayat S, Hood MI, Damo S, Restrepo N, Garcia C, Munro KA, Chazin WJ, Skaar EP. 2011. Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of *Staphylococcus aureus*. Cell Host Microbe 10:158–164. https:// doi.org/10.1016/j.chom.2011.07.004.
- Nakashige TG, Zhang B, Krebs C, Nolan EM. 2015. Human calprotectin is an iron-sequestering host-defense protein. Nat Chem Biol 11: 765–771. https://doi.org/10.1038/nchembio.1891.
- Zygiel EM, Nelson CE, Brewer LK, Oglesby-Sherrouse AG, Nolan EM. 2019. The human innate immune protein calprotectin induces iron starvation responses in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem 294: 3549–3562. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006819.
- Wang J, Lonergan ZR, Gonzalez-Gutierrez G, Nairn BL, Maxwell CN, Zhang Y, Andreini C, Karty JA, Chazin WJ, Trinidad JC, Skaar EP, Giedroc DP. 2019. Multi-metal restriction by calprotectin impacts *de novo* flavin biosynthesis in *Acinetobacter baumannii*. Cell Chem Biol 26: 745.e7–755.e7. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.02.011.
- Besold AN, Gilston BA, Radin JN, Ramsoomair C, Culbertson EM, Li CX, Cormack BP, Chazin WJ, Kehl-Fie TE, Culotta VC. 2017. Role of calprotectin in withholding zinc and copper from *Candida albicans*. Infect Immun 86:e00779-17. https://doi.org/10.1128/IAI.00779-17.
- Nakashige TG, Zygiel EM, Drennan CL, Nolan EM. 2017. Nickel sequestration by the host-defense protein human calprotectin. J Am Chem Soc 139:8828–8836. https://doi.org/10.1021/jacs.7b01212.
- Vernia F, Di Ruscio M, Stefanelli G, Viscido A, Frieri G, Latella G. 2020. Is fecal calprotectin an accurate marker in the management of Crohn's disease? J Gastroenterol Hepatol 35:390–400. https://doi.org/10.1111/ jgh.14950.
- National Institute for Health and Care Excellence. 2013. Faecal calprotectin diagnostic tests for inflammatory diseases of the bowel. Diagnostics guidance [DG11]. National Institute for Health and Care Excellence, London, United Kingdom.
- Gebhardt C, Németh J, Angel P, Hess J. 2006. S100a8 and S100a9 in inflammation and cancer. Biochem Pharmacol 72:1622–1631. https:// doi.org/10.1016/j.bcp.2006.05.017.
- Schuchat A. 1999. Group B Streptococcus. Lancet 353:51–56. https://doi .org/10.1016/S0140-6736(98)07128-1.
- Ferrieri P, Burke B, Nelson J. 1980. Production of bacteremia and meningitis in infant rats with group B streptococcal serotypes. Infect Immun 27:1023–1032. https://doi.org/10.1128/IAI.27.3.1023-1032.1980.
- Doran KS, Engelson EJ, Khosravi A, Maisey HC, Fedtke I, Equils O, Michelsen KS, Arditi M, Peschel A, Nizet V. 2005. Blood-brain barrier invasion by group B Streptococcus depends upon proper cell-surface

anchoring of lipoteichoic acid. J Clin Invest 115:2499-2507. https://doi .org/10.1172/JCl23829.

- Melin P. 2011. Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. Clin Microbiol Infect 17:1294–1303. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03576.x.
- CDC. 2017. Active bacterial surveillance report, Emerging Infections Program Network, group B Streptococcus. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
- Epstein FH, Quagliarello V, Scheld WM. 1992. Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. N Engl J Med 327: 864–872. https://doi.org/10.1056/NEJM199209173271208.
- 32. Bundy LM, Noor A. 2020. Neonatal meningitis. StatPearls Publishing, Treasure Island, FL.
- Libster R, Edwards KM, Levent F, Edwards MS, Rench MA, Castagnini LA, Cooper T, Sparks RC, Baker CJ, Shah PE. 2012. Long-term outcomes of group B streptococcal meningitis. Pediatrics 130:e8–e15. https://doi .org/10.1542/peds.2011-3453.
- Gordon SM, Srinivasan L, Harris MC. 2017. Neonatal meningitis: overcoming challenges in diagnosis, prognosis, and treatment with omics. Front Pediatr 5:139. https://doi.org/10.3389/fped.2017.00139.
- Doran KS, Chang JCW, Benoit VM, Eckmann L, Nizet V. 2002. Group B streptococcal B-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. J Infect Dis 185: 196–203. https://doi.org/10.1086/338475.
- Banerjee A, Kim BJ, Carmona EM, Cutting AS, Gurney MA, Carlos C, Feuer R, Prasadarao NV, Doran KS. 2011. Bacterial pili exploit integrin machinery to promote immune activation and efficient bloodbrain barrier penetration. Nat Commun 2:462. https://doi.org/10 .1038/ncomms1474.
- 37. Deng L, Spencer BL, Holmes JA, Mu R, Rego S, Weston TA, Hu Y, Sanches GF, Yoon S, Park N, Nagao PE, Jenkinson HF, Thornton JA, Seo KS, Nobbs AH, Doran KS. 2019. The group B streptococcal surface antigen I/li protein, Bspc, interacts with host vimentin to promote adherence to brain endothelium and inflammation during the pathogenesis of meningitis. PLoS Pathog 15:e1007848. https://doi.org/10 .1371/journal.ppat.1007848.
- Kothary V, Doster RS, Rogers LM, Kirk LA, Boyd KL, Romano-Keeler J, Haley KP, Manning SD, Aronoff DM, Gaddy JA. 2017. Group B Streptococcus induces neutrophil recruitment to gestational tissues and elaboration of extracellular traps and nutritional immunity. Front Cell Infect Microbiol 7:19. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00019.
- Gravett MG. 2004. Diagnosis of intra-amniotic infection by proteomic profiling and identification of novel biomarkers. JAMA 292:462. https:// doi.org/10.1001/jama.292.4.462.
- Moulin P, Patron K, Cano C, Zorgani MA, Camiade E, Borezée-Durant E, Rosenau A, Mereghetti L, Hiron A. 2016. The Adc/Lmb system mediates zinc acquisition in *Streptococcus agalactiae* and contributes to bacterial growth and survival. J Bacteriol 198:3265–3277. https://doi.org/10 .1128/JB.00614-16.
- Moulin P, Rong V, Ribeiro E Silva A, Pederick VG, Camiade E, Mereghetti L, McDevitt CA, Hiron A. 2019. Defining the role of the *Streptococcus agalactiae* Sht-family proteins in zinc acquisition and complement evasion. J Bacteriol 201:e00757-18. https://doi.org/10 .1128/JB.00757-18.
- Bayle L, Chimalapati S, Schoehn G, Brown J, Vernet T, Durmort C. 2011. Zinc uptake by Streptococcus pneumoniae depends on both AdcA and AdcAll and is essential for normal bacterial morphology and virulence. Mol Microbiol 82:904–916. https://doi.org/10.1111/j .1365-2958.2011.07862.x.
- Plumptre CD, Eijkelkamp BA, Morey JR, Behr F, Couñago RM, Ogunniyi AD, Kobe B, O'Mara ML, Paton JC, McDevitt CA. 2014. AdcA and AdcAll employ distinct zinc acquisition mechanisms and contribute additively to zinc homeostasis in *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 91: 834–851. https://doi.org/10.1111/mmi.12504.
  Brown LR, Gunnell SM, Cassella AN, Keller LE, Scherkenbach LA, Mann
- Brown LR, Gunnell SM, Cassella AN, Keller LE, Scherkenbach LA, Mann B, Brown MW, Hill R, Fitzkee NC, Rosch JW, Tuomanen El, Thornton JA. 2016. AdcAll of *Streptococcus pneumoniae* affects pneumococcal invasiveness. PLoS One 11:e0146785. https://doi.org/10.1371/journal.pone .0146785.
- Tedde V, Rosini R, Galeotti CL. 2016. Zn<sup>2+</sup> uptake in *Streptococcus pyogenes*: characterization of *adcA* and *lmb* null mutants. PLoS One 11:e0152835. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152835.
- Madoff LC, Michel JL, Kasper DL. 1991. A monoclonal antibody identifies a protective C-protein alpha-antigen epitope in group B strepto-

November/December 2020 Volume 11 Issue 6 e02302-20

cocci. Infect Immun 59:204-210. https://doi.org/10.1128/IAI.59.1.204-210.1991.

- 47. Faralla C, Metruccio MM, De Chiara M, Mu R, Patras KA, Muzzi A, Grandi G, Margarit I, Doran KS, Janulczyk R. 2014. Analysis of two-component systems in group B *Streptococcus* shows that RgfAC and the novel FspSR modulate virulence and bacterial fitness. mBio 5:e00870-14. https://doi.org/10.1128/mBio.00870-14.
- Wilson CB, Weaver WM. 1985. Comparative susceptibility of group B streptococci and *Staphylococcus aureus* to killing by oxygen metabolites. J Infect Dis 152:323–329. https://doi.org/10.1093/infdis/152.2.323.
- Burcham LR, Spencer BL, Keeler LR, Runft DL, Patras KA, Neely MN, Doran KS. 2019. Determinants of group B streptococcal virulence potential amongst vaginal clinical isolates from pregnant women. PLoS One 14:e0226699. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226699.
- Le Breton Y, Belew AT, Valdes KM, Islam E, Curry P, Tettelin H, Shirtliff ME, El-Sayed NM, McIver KS. 2015. Essential genes in the core genome of the human pathogen *Streptococcus pyogenes*. Sci Rep 5:9838. https:// doi.org/10.1038/srep09838.
- 51. Dale JL, Beckman KB, Willett JLE, Nilson JL, Palani NP, Baller JA, Hauge A, Gohl DM, Erickson R, Manias DA, Sadowsky MJ, Dunny GM. 2018. Comprehensive functional analysis of the *Enterococcus faecalis* core genome using an ordered, sequence-defined collection of insertional mutations in strain OG1RF. mSystems 3:e00062-18. https://doi.org/10.1128/mSystems.00062-18.
- DeJesus MA, Zhang YJ, Sassetti CM, Rubin EJ, Sacchettini JC, loerger TR. 2013. Bayesian analysis of gene essentiality based on sequencing of transposon insertion libraries. Bioinformatics 29:695–703. https://doi .org/10.1093/bioinformatics/btt043.
- Bray BA, Sutcliffe IC, Harrington DJ. 2009. Expression of the MtsA lipoprotein of *Streptococcus agalactiae* A909 is regulated by manganese and iron. Antonie Van Leeuwenhoek 95:101–109. https://doi.org/ 10.1007/s10482-008-9291-6.
- Eijkelkamp BA, McDevitt CA, Kitten T. 2015. Manganese uptake and streptococcal virulence. Biometals 28:491–508. https://doi.org/10.1007/ s10534-015-9826-z.
- Rosch JW, Gao G, Ridout G, Wang Y-D, Tuomanen El. 2009. Role of the manganese efflux system *mnte* for signalling and pathogenesis in *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 72:12–25. https://doi.org/10 .1111/j.1365-2958.2009.06638.x.
- Janulczyk R, Ricci S, Björck L. 2003. MtsABC is important for manganese and iron transport, oxidative stress resistance, and virulence of *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun 71:2656–2664. https://doi.org/10 .1128/IAI.71.5.2656-2664.2003.
- Shabayek S, Bauer R, Mauerer S, Mizaikoff B, Spellerberg B. 2016. A streptococcal NRAMP homologue is crucial for the survival of *Streptococcus agalactiae* under low pH conditions. Mol Microbiol 100: 589–606. https://doi.org/10.1111/mmi.13335.
- Nemec AA, Leikauf GD, Pitt BR, Wasserloos KJ, Barchowsky A. 2009. Nickel mobilizes intracellular zinc to induce metallothionein in human airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 41:69–75. https://doi .org/10.1165/rcmb.2008-0409OC.
- 59. Arslan P, Di Virgilio F, Beltrame M, Tsien RY, Pozzan T. 1985. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca<sup>2+</sup>. J Biol Chem 260:2719–2727.
- Hyun HJ, Sohn JH, Ha DW, Ahn YH, Koh JY, Yoon YH. 2001. Depletion of intracellular zinc and copper with TPEN results in apoptosis of cultured human retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 42:460–465.
- Wennekamp J, Henneke P. 2008. Induction and termination of inflammatory signaling in group B streptococcal sepsis. Immunol Rev 225: 114–127. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00673.x.
- Røseth AG, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N. 1997. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. Digestion 58:176–180. https://doi.org/10 .1159/000201441.
- Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. PLoS Pathog 5:e1000639. https://doi .org/10.1371/journal.ppat.1000639.
- Hooven TA, Catomeris AJ, Akabas LH, Randis TM, Maskell DJ, Peters SE, Ott S, Santana-Cruz I, Tallon LJ, Tettelin H, Ratner AJ. 2016. The essential

160

genome of *Streptococcus agalactiae*. BMC Genomics 17:406. https://doi .org/10.1186/s12864-016-2741-z.

- Caymaris S, Bootsma HJ, Martin B, Hermans PWM, Prudhomme M, Claverys J-P. 2010. The global nutritional regulator CodY is an essential protein in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 78:344–360. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07339.x.
- Blindauer CA. 2015. Advances in the molecular understanding of biological zinc transport. Chem Commun (Camb) 51:4544–4563. https:// doi.org/10.1039/C4CC10174J.
- Capdevila DA, Wang J, Giedroc DP. 2016. Bacterial strategies to maintain zinc metallostasis at the host-pathogen interface. J Biol Chem 291:20858–20868. https://doi.org/10.1074/jbc.R116.742023.
- Mikhaylina A, Ksibe AZ, Scanlan DJ, Blindauer CA. 2018. Bacterial zinc uptake regulator proteins and their regulons. Biochem Soc Trans 46: 983–1001. https://doi.org/10.1042/BST20170228.
- Kandari D, Gopalani M, Gupta M, Joshi H, Bhatnagar S, Bhatnagar R. 2018. Identification, functional characterization, and regulon prediction of the zinc uptake regulator (Zur) of *Bacillus anthracis* – an insight into the zinc homeostasis of the pathogen. Front Microbiol 9:3314. https:// doi.org/10.3389/fmicb.2018.03314.
- Grim KP, San Francisco B, Radin JN, Brazel EB, Kelliher JL, Párraga Solórzano PK, Kim PC, McDevitt CA, Kehl-Fie TE. 2017. The metallophore staphylopine enables *Staphylococcus aureus* to compete with the host for zinc and overcome nutritional immunity. mBio 8:e01281-17. https://doi.org/10.1128/mBio.01281-17.
- 71. Dintilhac A, Alloing G, Granadel C, Claverys JP. 1997. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. Mol Microbiol 25:727–739. https://doi.org/10 .1046/j.1365-2958.1997.5111879.x.
- Lindahl G, Stålhammar-Carlemalm M, Areschoug T. 2005. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clin Microbiol Rev 18:102–127. https://doi.org/10.1128/ CMR.18.1.102-127.2005.
- Elsner A, Kreikemeyer B, Braun-Kiewnick A, Spellerberg B, Buttaro BA, Podbielski A. 2002. Involvement of Lsp, a member of the Lrallipoprotein family in *Streptococcus pyogenes*, in eukaryotic cell adhesion and internalization. Infect Immun 70:4859–4869. https://doi.org/ 10.1128/IAI.70.9.4859-4869.2002.
- Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Schnitzler N, Lütticken R, Podbielski A. 1999. Lmb, a protein with similarities to the Lral adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. Infect Immun 67:871–878. https://doi.org/10.1128/IAI .67.2.871-878.1999.
- Terao Y, Kawabata S, Kunitomo E, Nakagawa I, Hamada S. 2002. Novel laminin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, Lbp, is involved in adhesion to epithelial cells. Infect Immun 70:993–997. https://doi.org/ 10.1128/IAI.70.2.993-997.2002.
- Cook LCC, Hu H, Maienschein-Cline M, Federle MJ. 2018. A vaginal tract signal detected by the group B *Streptococcus* SaeRS system elicits transcriptomic changes and enhances murine colonization. Infect Immun 86:e00762-17. https://doi.org/10.1128/IAI.00762-17.
- Mereghetti L, Sitkiewicz I, Green NM, Musser JM. 2008. Extensive adaptive changes occur in the transcriptome of *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) in response to incubation with human blood. PLoS One 3:e3143. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003143.
- Jean S, Juneau RA, Criss AK, Cornelissen CN. 2016. Neisseria gonorrhoeae evades calprotectin-mediated nutritional immunity and survives neutrophil extracellular traps by production of TdfH. Infect Immun 84:2982–2994. https://doi.org/10.1128/IAI.00319-16.
- 79. Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, Deboy RT, Davidsen TM, Mora M, Scarselli M, Margarit y Ros I, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Daugherty SC, Haft DH, Selengut J, Gwinn ML, Zhou L, Zafar N, Khouri H, Radune D, Dimitrov G, Watkins K, O'Connor KJB, Smith S, Utterback TR, White O, Rubens CE, Grandi G, Madoff LC, Kasper DL, Telford JL, Wessels MR, Rappuoli R, Fraser CM. 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". Proc Natl Acad Sci U S A 102: 13950–13955. https://doi.org/10.1073/pnas.0506758102.
- Martin JE, Edmonds KA, Bruce KE, Campanello GC, Eijkelkamp BA, Brazel EB, McDevitt CA, Winkler ME, Giedroc DP. 2017. The zinc efflux activator SczA protects Streptococcus pneumoniae serotype 2 D39 from

November/December 2020 Volume 11 Issue 6 e02302-20

intracellular zinc toxicity. Mol Microbiol 104:636-651. https://doi.org/ 10.1111/mmi.13654.

- Ong CL, Gillen CM, Barnett TC, Walker MJ, McEwan AG. 2014. An antimicrobial role for zinc in innate immune defense against group A Streptococcus. J Infect Dis 209:1500–1508. https://doi.org/10 .1093/infdis/jiu053.
- Martin JE, Giedroc DP. 2016. Functional determinants of metal ion transport and selectivity in paralogous cation diffusion facilitator transporters CzcD and MntE in *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol 198: 1066–1076. https://doi.org/10.1128/JB.00975-15.
- 83. Kloosterman TG, van der Kooi-Pol MM, Bijlsma JJE, Kuipers OP. 2007. The novel transcriptional regulator SczA mediates protection against Zn<sup>2+</sup> stress by activation of the Zn<sup>2+</sup>-resistance gene *czcD* in *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 65:1049–1063. https://doi.org/10 .1111/j.1365-2958.2007.05849.x.
- Chen Y-YM, Feng CW, Chiu CF, Burne RA. 2008. cadDX operon of Streptococcus salivarius 57.I. Appl Environ Microbiol 74:1642–1645. https://doi.org/10.1128/AEM.01878-07.
- Wang R, Li L, Huang T, Huang Y, Huang W, Yang X, Lei A, Chen M. 2018. Phylogenetic, comparative genomic and structural analyses of human Streptococcus agalactiae ST485 in China. BMC Genomics 19:716. https:// doi.org/10.1186/s12864-018-5084-0.
- Jordan MR, Wang J, Capdevila DA, Giedroc DP. 2020. Multi-metal nutrient restriction and crosstalk in metallostasis systems in microbial pathogens. Curr Opin Microbiol 55:17–25. https://doi.org/10.1016/j.mib .2020.01.010.
- Ong C-I. Y, Walker MJ, McEwan AG. 2015. Zinc disrupts central carbon metabolism and capsule biosynthesis in *Streptococcus pyogenes*. Sci Rep 5:10799. https://doi.org/10.1038/srep10799.
- Chandrangsu P, Huang X, Gaballa A, Helmann JD. 2019. Bacillus subtilis FolE is sustained by the ZagA zinc metallochaperone and the alarmone ZTP under conditions of zinc deficiency. Mol Microbiol 112:751–765. https://doi.org/10.1111/mmi.14314.
- Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MAD, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J. 2007. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. Nat Med 13:1042–1049. https://doi.org/10 .1038/nm1638.
- Kuipers MT, Vogl T, Aslami H, Jongsma G, van den Berg E, Vlaar APJ, Roelofs JJTH, Juffermans NP, Schultz MJ, van der Poll T, Roth J, Wieland CW. 2013. High levels of S100A8/A9 proteins aggravate ventilatorinduced lung injury via TLR4 signaling. PLoS One 8:e68694. https://doi .org/10.1371/journal.pone.0068694.
- Makthal N, Do H, Wendel BM, Olsen RJ, Helmann JD, Musser JM, Kumaraswami M. 2020. Group A *Streptococcus* AdcR regulon participates in bacterial defense against host-mediated zinc sequestration and contributes to virulence. Infect Immun 88:e00097-20. https://doi .org/10.1128/IAI.00097-20.
- Pittman K, Kubes P. 2013. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. J Innate Immun 5:315–323. https://doi.org/ 10.1159/000347132.
- 93. Boyapati RK, Rossi AG, Satsangi J, Ho G-T. 2016. Gut mucosal DAMPs in IBD: from mechanisms to therapeutic implications. Mucosal Immunol 9:567–582. https://doi.org/10.1038/mi.2016.14.
- Vandal K, Rouleau P, Boivin A, Ryckman C, Talbot M, Tessier PA. 2003. Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. J Immunol 171:2602–2609. https://doi .org/10.4049/jimmunol.171.5.2602.
- Edgar RJ, van Hensbergen VP, Ruda A, Turner AG, Deng P, Le Breton Y, El-Sayed NM, Belew AT, McIver KS, McEwan AG, Morris AJ, Lambeau G, Walker MJ, Rush JS, Korotkov KV, Widmalm G, van Sorge NM, Korotkova N. 2019. Discovery of glycerol phosphate modification on streptococcal rhamnose polysaccharides. Nat Chem Biol 15:463–471. https://doi.org/ 10.1038/s41589-019-0251-4.
- Radin JN, Zhu J, Brazel EB, McDevitt CA, Kehl-Fie TE. 2018. Synergy between nutritional immunity and independent host defenses contributes to the importance of the MntABC manganese transporter during *Staphylococcus aureus* infection. Infect Immun 87:e00642-18. https:// doi.org/10.1128/IAI.00642-18.
- Kehl-Fie TE, Zhang Y, Moore JL, Farrand AJ, Hood MI, Rathi S, Chazin WJ, Caprioli RM, Skaar EP. 2013. MntABC and MntH contribute to systemic Staphylococcus aureus infection by competing with calprotectin for nutrient manganese. Infect Immun 81:3395–3405. https://doi.org/10 .1128/IAI.00420-13.

- Le Breton Y, McIver KS. 2013. Genetic manipulation of *Streptococcus pyogenes* (the group A *Streptococcus*, GAS. Curr Protoc Microbiol 30: 9D.3.1–9D.3.29. https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc09d03s30.
- Le Breton Y, Mistry P, Valdes KM, Quigley J, Kumar N, Tettelin H, McIver KS. 2013. Genome-wide identification of genes required for fitness of group A *Streptococcus* in human blood. Infect Immun 81:862–875. https://doi.org/10.1128/IAI.00837-12.
- R Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Andrews S. 2010. Fastqc: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from highthroughput sequencing reads. EMBnet J 17:10–12. https://doi.org/10 .14806/ej.17.1.200.
- Langmead B. 2010. Aligning short sequencing reads with Bowtie. Curr Protoc Bioinformatics 32:Unit 11.7. https://doi.org/10.1002/0471250953 .bi1107s32.
- 104. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol 10:R25. https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3 -r25.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics 25:2078–2079. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352.
- Anders S, Pyl PT, Hyber W. 2015. A Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics 31:166–169. https:// doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638.
- 107. Dillies M-A, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeanmougin M, Servant N, Keime C, Marot G, Castel D, Estelle J, Guernec G, Jagla B, Jouneau L, Laloe D, Le Gall C, Schaeffer B, Le Crom S, Guedj M, Jaffrezic

F, French StatOmique Consortium. 2013. A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. Brief Bioinform 14:671–683. https://doi.org/10.1093/bib/bbs046.

- Zomer A, Burghout P, Bootsma HJ, Hermans PWM, van Hijum SAFT. 2012. Essentials: software for rapid analysis of high throughput transposon insertion sequencing data. PLoS One 7:e43012. https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0043012.
- 109. Huerta-Čepas J, Šzklarczyk D, Heller D, Hernández-Plaza A, Forslund SK, Cook H, Mende DR, Letunic I, Rattei T, Jensen LJ, von Mering C, Bork P. 2019. EggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. Nucleic Acids Res 47:D309–D314. https://doi.org/10.1093/nar/ gky1085.
- Emms DM, Kelly S. 2015. Orthofinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. Genome Biol 16:157. https://doi.org/10.1186/s13059 -015-0721-2.
- Jones P, Binns D, Chang H-Y, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, Pesseat S, Quinn AF, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Yong S-Y, Lopez R, Hunter S. 2014. Interproscan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics 30: 1236–1240. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031.
  Dam P, Olman V, Harris K, Su Z, Xu Y. 2007. Operon prediction using
- 112. Dam P, Olman V, Harris K, Su Z, Xu Y. 2007. Operon prediction using both genome-specific and general genomic information. Nucleic Acids Res 35:288–298. https://doi.org/10.1093/nar/gkl1018.
- 113. Mao X, Ma Q, Zhou C, Chen X, Zhang H, Yang J, Mao F, Lai W, Xu Y. 2014. Door 2.0: presenting operons and their functions through dynamic and integrated views. Nucleic Acids Res 42:D654–D659. https:// doi.org/10.1093/nar/gkt1048.
- Mao F, Dam P, Chou J, Olman V, Xu Y. 2009. Door: a database for prokaryotic operons. Nucleic Acids Res 37:D459–D463. https://doi.org/ 10.1093/nar/gkn757.

ANEXO C – Artigo científico públicado durante o doutorado: Identification of a novel cationic glycolipid in Streptococcus agalactiae that contributes to brain entry and meningitis

# PLOS BIOLOGY



The Editors encourage authors to publish research updates to this article type. Please follow the link in the citation below to view any related articles.

# OPEN ACCESS

Citation: Jovce LR, Manzer HS, da C, Mendonca J, Villarreal R, Nagao PE, Doran KS, et al. (2022) Identification of a novel cationic glycolipid in Streptococcus agalactiae that contributes to brain entry and meningitis. PLoS Biol 20(2): e3001555. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001555

Academic Editor: Matthew K. Waldor, Brigham and Women's Hospital, UNITED STATES

Beceived: October 5 2021

Accepted: January 26, 2022

Published: February 18, 2022

Copyright: @ 2022 Joyce et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. Illumina sequence read files are available from the Sequence Read Archive database (accession number PRJNA675025).

Funding: The work was supported in part by the National Institutes of Health (https://www.niaid.nih gov/) training grant T32 5T32AI052066-18 and F31 DISCOVERY REPORT

# Identification of a novel cationic glycolipid in Streptococcus agalactiae that contributes to brain entry and meningitis

Luke R. Joyce 1,2, Haider S. Manzer 2, Jéssica da C. Mendonça 2,3, Ricardo Villarreal<sup>2</sup>, Prescilla E. Nagao<sup>3</sup>, Kelly S. Doran<sup>2\*</sup>, Kelli L. Palmer<sup>1\*</sup>, Ziqiang Guan<sup>6</sup><sup>4</sup>\*

1 Department of Biological Sciences, The University of Texas at Dallas, Richardson, Texas, United States of America, 2 Department of Immunology and Microbiology, University of Colorado School of Medicine, Aurora, Colorado, United States of America, 3 Rio de Janeiro State University, Roberto Alcântara Gomes Biology Institute, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 4 Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, United States of America

\* Kelly.Doran@CUAnschutz.edu (KSD); Kelli.Palmer@UTDallas.edu (KLP); Ziqiang.Guan@Duke.edu (ZG)

# Abstract

Bacterial membrane lipids are critical for membrane bilaver formation, cell division, protein localization, stress responses, and pathogenesis. Despite their critical roles, membrane lipids have not been fully elucidated for many pathogens. Here, we report the discovery of a novel cationic glycolipid, lysyl-glucosyl-diacylglycerol (Lys-Glc-DAG), which is synthesized in high abundance by the bacterium Streptococcus agalactiae (Group B Streptococcus, GBS). To our knowledge, Lys-Glc-DAG is more positively charged than any other known lipids. Lys-Glc-DAG carries 2 positive net charges per molecule, distinct from the widely described lysylated phospholipid lysyl-phosphatidylglycerol (Lys-PG) that carries one positive net charge due to the presence of a negatively charged phosphate moiety. We use normal phase liquid chromatography (NPLC) coupled with electrospray ionization (ESI) highresolution tandem mass spectrometry (HRMS/MS) and genetic approaches to determine that Lys-Glc-DAG is synthesized by the enzyme MprF in GBS, which covalently modifies the neutral glycolipid Glc-DAG with the cationic amino acid lysine. GBS is a leading cause of neonatal meningitis, which requires traversal of the endothelial blood-brain barrier (BBB). We demonstrate that GBS strains lacking mprF exhibit a significant decrease in the ability to invade BBB endothelial cells. Further, mice challenged with a GBSΔmprF mutant developed bacteremia comparably to wild-type (WT) infected mice yet had less recovered bacteria from brain tissue and a lower incidence of meningitis. Thus, our data suggest that Lys-Glc-DAG may contribute to bacterial uptake into host cells and disease progression. Importantly, our discovery provides a platform for further study of cationic lipids at the host-pathogen interface.

AI164674 to H.S.M, the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (https://www.gov.br/capes/pt-br) (CAPES; finance code 001) to J.D.C.M, by grants R01NS116716 and R01AI153332 from the National Institutes of Health (https://www.niaid.nih. gov/ and https://www.ninds.nih.gov/) to K.S.D and associated NIH/NINDS supplement from R01NS116716 to R.V, National Institutes of Health (https://www.niaid.nih.gov/) grant R21Al130666 and the Cecil H. and Ida Green Chair in Systems Biology Science to K.P, National Institutes of Health (https://www.niaid.nih.gov/) grant R56Al139105 to K.P and Z.G, and National Institutes of Health grant U54GM069338 to Z.G. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist

Abbreviations: BBB, blood-brain barrier: CAMP. cationic antimicrobial peptide; CFU, colony-forming unit; CL, cardiolipin; DAG, diacylglycerol; DHDAG, dihexosyldiacylglycerol; ESI, electrospray ionization: FBS, fetal bovine serum: GBS, Group B Streptococcus; Glc2-DAG, di-glucosyldiacylglycerol; HRMS/MS, high-resolution tandem mass spectrometry; IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee; LB, Lysogeny Broth; Lys-Glc-DAG, lysyl-glucosyl-diacylglycerol; Lys-PG, lysyl-phosphatidylglycerol; MHDAG, monohexosyldiacylglycerol; MOI, multiplicity of infection; MS/MS, tandem MS; MV, membrane vesicle; NPLC, normal phase liquid chromatography; PG, phosphatidylglycerol; THB, Todd Hewitt Broth: TIC. total ion chromatogram: WT, wild-type.

# Introduction

Bacterial cellular membranes are dynamic structures that are critical for survival under varying environmental conditions and are essential for host–pathogen interactions. Phospholipids and glycolipids within the membrane have varying chemical properties that alter the physiology of the membrane, which bacteria can modulate in response to environmental stresses such as pH [1], antibiotic treatment [2], and human metabolites [3]. Despite their critical roles in the survival and pathogenesis, membrane lipids have not been carefully characterized using modern lipidomic techniques for many important human pathogens, including *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*, GBS). GBS colonizes the lower genital and gastrointestinal tracts of approximately 30% of healthy women [4,5]. However, GBS can cause sepsis and pneumonia in newborns and is a leading cause of neonatal meningitis, resulting in long-lasting neurological effects in survivors [6-8]. Due to the severity of the resulting diseases, intrapartum antibiotic prophylaxis is prescribed for colonized pregnant women [7,9]. Even with these measures, a more complete understanding of GBS pathogenesis and new therapeutic and preventive measures are needed to mitigate the devastating impact of GBS neonatal infection.

Research on the pathogenesis of the GBS has mainly focused on cell wall–anchored or secreted proteins and polysaccharides that aid in the attachment to and invasion of host cells. The numerous attachment and virulence factors possessed by the GBS are summarized in a recent review by Armistead and colleagues [10]. Comparatively, little is known about GBS cellular membrane lipids. To our knowledge, the only characterization of GBS lipids prior to our current study was the identification of the phospholipids phosphatidylglycerol (PG), cardiolipin (CL), and lysyl-phosphatidylglycerol (Lys-PG) in GBS [11–13]. Similarly, investigation into the glycolipids of the GBS membrane has focused on di-glucosyl-diacylglycerol (Glc<sub>2</sub>-DAG), which is the lipid anchor of the Type I lipoteichoic acid, and its role in pathogenesis [14].

In this study, we utilized normal phase liquid chromatography (NPLC) coupled with electrospray ionization (ESI) high-resolution tandem mass spectrometry (HRMS/MS) to characterize the GBS membrane lipid composition and identified a novel cationic glycolipid, lysylglucosyl-diacylglycerol (Lys-Glc-DAG), which comprises a major portion of the GBS total lipid extract. While Lys-PG has been reported in a range of bacterial species [15], Lys-Glc-DAG represents, to our knowledge, the first example of lysine modification of a neutral glycolipid. By gene deletion and heterologous expression, we show the GBS MprF enzyme is responsible for the biosynthesis of both the novel Lys-Glc-DAG and Lys-PG. Most strikingly, using an in vivo hematogenous murine infection model, we demonstrate that MprF does not contribute to GBS bloodstream survival. This distinguishes the GBS MprF from the well-known *Staphylococcus aureus* MprF, which synthesizes only Lys-PG [16,17]. Rather, GBS MprF contributes specifically to meningitis and penetration of the blood–brain barrier (BBB). These results greatly expand our knowledge of naturally occurring cationic lipids and MprF functionality and reveal insights into the pathogenesis of meningitis caused by GBS.

# Results

## Identification of Lys-Glc-DAG, a novel cationic glycolipid in GBS

The membrane lipids of 4 GBS clinical isolates of representative serotypes were characterized: COH1 [<u>18</u>], A909 [<u>19</u>], CNCTC 10/84, and CJB111 [<u>20</u>] (serotypes III, 1a, and V, respectively). Common gram-positive bacterial lipids were identified by normal phase LC coupled with negative ion ESI/MS/MS, including diacylglycerol (DAG), monohexosyldiacylglycerol (MHDAG), dihexosyldiacylglycerol (DHDAG), PG, and Lys-PG, as shown by the negative total ion chromatogram (TIC) (<u>Fig 1A</u>).

GBS MprF synthesizes a novel glycolipid that contributes to meningitis



**Fig 1. Lipidomic profiling of GBS and identification of Lys-Glc-DAG synthesized by MprF.** TIC of LC/MS in (**A**) negative ion mode and (**B**) positive ion mode shows a major unknown lipid eluting at approximately 25 to 29 minutes. (**C**) Positive ESI/MS showing the [M+H]<sup>+</sup> ions of the unknown lipid. (**D**) Positive ion MS/MS spectrum of [M+H]<sup>+</sup> at *m/z* 883.6 of the unknown lipid. (**F**) Lys-Glc-DAG (16:0/18:1) is proposed as the structure of the unknown lipid. (**G**) TIC showing loss of Lys-Glc-DAG and Lys-PG in COH1*AmprF*, which is present when *mprF* is complemented in trans. (**H**) Lys-Glc-DAG and Lys-PG in Streptococcus mitis when expressing GBS *mprF* compared to Lys-PG only when expressing *Enterococcus faecium mprF*.<sup>46,47</sup> a denotes methylcarbamate of Lys-Glc-DAG, an extraction artifact due to the use of chloroform. (**I**) Biosynthetic pathways involving MprF. DAG, diacylglycerol; DHDAG, dihexosyldiacylglycerol; ESI, electrospray ionization; GBS, Group B *Streptococcus*, L/2/MS, liquid chromatography/mass spectrometry; Lys-Glc-DAG, lysyl-glucosyl-diacylglycerol; Lys-PG, L/2/MS, liquid chromatography/mass spectrometry; MS/MS, tandem MS; TIC, total ion chromatogram.

https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001555.g001

Surprisingly, the positive TIC (Fig 1B, S1 Fig) shows highly abundant peaks of unknown identity at the retention time approximately 25 to 29 minutes. The mass spectra (Fig 1C) and LC retention times of this lipid do not match with any other bacterial lipids we have analyzed or exact masses in lipidomic databases [21,22]. Tandem MS (MS/MS) in the positive ion mode (Fig 1D), negative ion mode (Fig 1E), and high-resolution mass measurement (Fig 1C) allowed us to propose Lys-Glc-DAG (Fig 1F) as the structure of this unknown lipid. Observed and exact masses of Lys-Glc-DAG are shown in <u>S1 Table</u>. The assignment of glucose was based on

the observation that glucosyl-diacylglycerol (Glc-DAG) is a major membrane component of GBS and other streptococci [14] and results from an isotopic labeling experiment using <sup>13</sup>C-labeled glucose (Glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>). The assignment of lysine modification was supported by an isotopic labeling experiment with deuterated lysine (lysine-*d4*). The expected mass shifts (+4 Da) were observed in both molecular ions and MS/MS product ions (S2 Fig). Comparison of both MS/MS spectra of labeled (Glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) and unlabeled Lys-Glc-DAG indicates the lysine residue is linked to the 6-position of glucose (S2 Fig). Lys-Glc-DAG consists of several molecular species with different fatty acyl compositions resulting in different retention times and multiple, unresolved TIC peaks (approximately 25 to 29 minutes).

### GBS MprF synthesizes Lys-Glc-DAG

The enzyme MprF (multiple peptide resistance factor) catalyzes the aminoacylation of PG with lysine in some gram-positive pathogens [16,23]. We determined that GBS MprF is responsible and sufficient for synthesizing Lys-Glc-DAG as well as Lys-PG. Deletion of *mprF* from both COH1 and CJB111 abolishes Lys-Glc-DAG and Lys-PG synthesis, which are restored by complementation (Fig 1G, S3 Fig). Deletion of GBS *mprF* does not confer a growth defect in Todd Hewitt Broth (THB) or tissue culture medium. The oral colonizer *Streptococcus mitis* does not encode *mprF* or synthesize Lys-PG but synthesizes Glc-DAG and PG [2,3]. Heterologous expression of GBS *mprF* in *S. mitis* results in Lys-Glc-DAG and Lys-PG production (Fig 1H), while expression of *Enterococcus faecium mprF* results in only Lys-PG production (Fig 1H), as expected [1]. Biosynthetic pathways involving MprF are shown in Fig 1I.

# MprF contributes to GBS pathogenesis

We investigated whether MprF contributes to GBS invasion into brain endothelial cells and development of meningitis. To mimic the human BBB, we utilized the human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3. In vitro assays for adhesion and invasion were performed as described previously [14,24,25]. There was no significant difference in the ability of  $\Delta mprF$  compared to wild-type (WT) and complement cells to attach to hCMEC/D3 cells (Fig 2A). However, we observed a significant decrease in the amount of  $\Delta mprF$  recovered from the intracellular compartment of hCMEC/D3 cells (Fig 2A). The reduced invasion phenotype was confirmed in the hypervirulent serotype V strain, CJB111 [26,27] (S4 Fig). Intracellular survival requires GBS to survive low pH conditions in lysosomes (pH 4.5 to 5.5) [28], and  $\Delta mprF$  is unable to survive low pH conditions (Fig 2B). This suggests that MprF promotes GBS invasion and possibly intracellular survival in brain endothelial cells.

We hypothesized that these in vitro phenotypes of  $\Delta mprF$  would translate into a diminished ability to penetrate the BBB and produce meningitis in vivo. Using our standard model of GBS hematogenous meningitis [14,24], mice were challenged with either WT GBS or  $\Delta mprF$ . Mice were sacrificed at 72 hours to determine bacterial loads in blood and brain tissue. We recovered significantly less colony-forming unit (CFU) in the brains of  $\Delta mprF$ -infected mice compared to the WT infected mice (Fig 2C). However, there was no significant difference in CFU recovered from the bloodstream or the lung (Fig 2D and 2E), demonstrating that  $\Delta mprF$  does not have a general defect in bloodstream survival or tissue invasion in vivo. Furthermore, mice challenged with WT GBS had significantly more meningeal thickening and neutrophil chemokine, KC, in brain homogenates compared to  $\Delta mprF$  mutant-infected animals (Fig 2 F–H). Taken together, *mprF* contributes to GBS penetration into the brain and to the pathogenesis of meningitis in vivo.

GBS MprF synthesizes a novel glycolipid that contributes to meningitis



**Fig 2. Contribution of lysine lipids to meningitis pathogenesis.** (A) In vitro assays for adherence and invasion of hCMEC cells indicates *mprF* contributes to invasion but not adherence to brain endothelium (the mean of each biological replicate is displayed, comprised of 4 replicate wells per biological replicate, mean and SEM.) (B) pH-adjusted medium growth indicates *AmprF* cannot survive in low pH conditions, mean and SD. Groups of CD-1 mice were injected intravenously with COH1 WT or COH1 $\Delta mprF$  strains and bacterial counts were assessed in the (C) brain, (D) blood, and (E) lung after 72 hours. Representative data from 2 independent experiments are shown (WT, *n* = 20; *AmprF*, *n* = 19). (F) Hematoxylin–eosin–stained brain sections from representative mice infected with WT (top) or  $\Delta mprF$  mutant (bottom); arrows indicate meningeal thickening and leukocyte infiltration. (G) Quantification of meningeal thickening using Image]. (H) KC chemokine production measured by ELISA. Panels C, D, E, G, and H median indicated. Statistical analyses performed using GraphPad Prism: (A) One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test; (C, D, G) unpaired two-tailed *t* test; (E, H) Mann–Whitney U test; *p*-values indicated; ns, no significance (*p*-value > 0.05). The numerical data underlying the graphs shown in this figure are provided in <u>S1 Data</u>.

https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001555.g002

# Discussion

Here, we report that GBS MprF uniquely synthesizes a novel cationic glycolipid Lys-Glc-DAG in high abundance which plays a role in the invasion of human endothelial cells. This work establishes that GBS capitalizes on MprF to modulate charges of both glycolipids and phospholipids at the membrane, which is unprecedented.

Previously, MprF has been shown to catalyze the aminoacylation of the anionic phospholipid PG in a range of Gram-positive and Gram-negative bacteria [16,23]. MprF is a membrane-bound enzyme comprised of a N-terminal lipid flippase domain [29] and a carboxylterminal catalytic domain that catalyzes the aminoacylation of the glycerol group of PG by using aminoacyl-tRNAs as the amino acid donors [30–32]. An important function of PG aminoacylation is proposed to decrease the net negative charge of the cellular envelope to confer protection from cationic antimicrobial peptides (CAMPs) produced by host immune systems and bacteriocins produced by competitor bacteria [16,23]. However, a previous study observed no contribution of mprF to GBS in vitro susceptibility to commonly studied CAMPs, which is unlike the well-characterized S. aureus mprF [33], thus highlighting the unique differences between the extracellular surfaces of these bacteria.

Based on our tissue culture and mouse infection experiments, we propose that GBS have an MprF enzyme and corresponding cellular lipid properties that are adapted for efficient invasion of mammalian cells. Deletion of *mprF* impacts the ability of GBS to enter the brain and promote meningitis in vivo. This suggests that MprF plays a role in BBB penetration and not invasion into the lung; however, additional studies are warranted to examine other tissue sites. It is unknown how lysinylated lipids in the GBS membrane, which is covered by a layer of peptidoglycan, mechanistically impact invasion. Because Lys-Glc-DAG is abundantly synthesized by GBS MprF, with Lys-PG a comparatively minor product, it is likely that Lys-Glc-DAG is the most relevant lipid for meningitis pathogenesis. Speculatively, Lys-Glc-DAG may contribute to membrane vesicle (MV) formation by GBS. MVs have previously been shown to be proinflammatory and result in preterm birth and fetal death in mice [34], but have not been studied during meningitis progression. In future studies, it will be key to investigate this, as well as the specific host inflammatory and signaling responses to the GBS *mprF* mutant.

Our identification of the novel Lys-Glc-DAG glycolipid rationalizes further study of the lipidomes of human pathogens. First, lipids contribute to virulence, and understanding these virulence mechanisms and the mechanisms for lipid synthesis may identify novel antimicrobial drug targets. The decreased in vivo pathogenicity of the  $\Delta mprF$  mutant identifies GBS MprF as a candidate for targeting by antimicrobial strategies. Moreover, Lys-Glc-DAG could be utilized as a specific molecular biomarker for GBS diagnostics. In addition, engineered cationic lipids are utilized in lipid nanoparticles for mRNA vaccine and drug delivery and are required for uptake of particles into cells [35,36]. Substantial effort has been dedicated to the synthesis of cationic lipids with low toxicity and efficient delivery properties. Lys-Glc-DAG is a naturally occurring, strongly cationic lipid with potential for use in lipid nanoparticles for vaccine and drug delivery. Importantly, our discovery suggests that lipidome analysis of human pathogens is likely to reveal novel lipids of biotechnological utility.

# Materials and methods

# Bacterial strains, media, and growth conditions

See <u>S2 Table</u> for strains used in this study. GBS strains were grown statically at 37°C in THB and *S. mitis* strains were grown statically at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, unless otherwise stated. Streptococcal chemically defined medium [<u>37</u>] was diluted from stock as described [<u>38</u>] with 1% w/v glucose (referred to as DM), slightly modified from [<u>39</u>], unless otherwise stated. *Escherichia coli* strains were grown in Lysogeny Broth (LB) at 37°C with rotation at 225 rpm. Kanamycin and erythromycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were supplemented to media at 50 µg/mL and 300 µg/mL for *E. coli*, respectively, or 300 µg/mL and 5 µg/mL, respectively, for streptococcal strains.

# Routine molecular biology techniques

All PCR reactions utilized Phusion polymerase (Thermo Fisher, Waltham, MA). PCR products and restriction digest products were purified using GeneJET PCR purification kit (Thermo Fisher) per manufacturer protocols. See <u>S3 Table</u> for primers. Plasmids were extracted using GeneJET plasmid miniprep kit (Thermo Fisher) per manufacturer protocols. Restriction enzyme digests utilized XbaI, XhoI, and PstI (New England Biolabs, Ipswich, MA) for 3 hours at 37°C in a water bath. Ligations utilized T4 DNA ligase (New England Biolabs) at 16°C overnight or Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs) per manufacturer protocols where stated. All plasmid constructs were sequence confirmed by Sanger sequencing (Massachusetts General Hospital DNA Core, Cambridge, MA or CU Anschutz Molecular Biology Core, Aurora, CO).

# Deuterated lysine and <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-D-glucose isotope tracking

A GBS COH1 colony was inoculated into 15 mL of DM containing 450  $\mu$ M lysine-*d4* (Cambridge Isotopes Laboratories, Tewksbury, MA) or a single COH1 colony was inoculated into 10-mL DM supplemented with 0.5% w/v  $^{13}$ C<sub>6</sub>D-glucose (U-13C6, Cambridge Isotopes Laboratories) for overnight growth for lipidomic analysis described below.

# Construction of MprF expression plasmids

Genomic DNA was isolated using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Germantown, MD) per the manufacturer's protocol with the exception that cells were pretreated with 180  $\mu$ L 50 mg/mL lysozyme, 25  $\mu$ L 2500 U/mL mutanolysin, and 15  $\mu$ L 20 mg/mL preboiled RNase A and incubated at 37 °C for 2 hours. The *mprF* genes from GBS COH1, (GBSCOH1\_1931), GBS CJB111 (ID870\_10050), and *E. faecium* 1,231,410 (EFTG\_00601) were amplified and either Gibson ligated into pABG5 $\Delta$ *phoZ* [40] or ligated into pDCErm [41]. Plasmid constructs were transformed into chemical competent *E. coli*. Briefly, chemically competent cells were incubated for 10 minutes on ice with 5  $\mu$ L of Gibson reaction before heat shock at 42 °C for 70 seconds, then placed on ice for 2 minutes before 900  $\mu$ L of cold SOC medium was added. Outgrowth was performed at 37 °C, with shaking at 225 rpm, for 1 hour. Cultures were plated on LB agar plates containing 50  $\mu$ g/mL kanamycin. Colonies were screened by PCR for presence of the *mprF* insert.

# Expression of mprF in S. mitis

Natural transformation was performed as previously described [3]. Briefly, precultures were thawed at room temperature, diluted in 900  $\mu$ L of THB, further diluted 1:50 in prewarmed 5-mL THB and incubated for 45 minutes at 37 °C. Moreover, 500  $\mu$ L of culture was then aliquoted with 1  $\mu$ L of 1 mg/ml competence-stimulating peptide (EIRQTHNIFFNFFKRR) and 1  $\mu$ g/mL plasmid. Transformation reaction mixtures were cultured for 2 hours at 37 °C in microcentrifuge tubes before being plated on THB agar supplemented with 300  $\mu$ g/mL kanamycin. Single transformant colonies were cultured in 15-mL THB overnight. PCR was used to confirm the presence of the *mprF* insert on the plasmid. Plasmids were extracted and sequence confirmed as described above. Lipidomics was performed as described below in biological triplicate.

### Construction of mprF deletion plasmids

Regions approximately 2-kb upstream and downstream of the GBS COH1 *mprF* (GBSCOH1\_1931) or CJB111 (ID870\_10050) were amplified using PCR. Plasmid, pMBSacB [42], and the PCR products were digested using appropriate restriction enzymes and ligated overnight. A total of 7  $\mu$ L of the ligation reaction was transformed into chemically competent *E. coli* DH5 $\alpha$  as described above, except that outgrowth was performed at 28°C with shaking at 225 rpm for 90 minutes prior to plating on LB agar supplemented with 300  $\mu$ g/mL erythromycin. Plates were incubated at 28°C for 72 hours. Colonies were screened by PCR for correct plasmid construction. Positive colonies were inoculated into 50-mL LB media containing antibiotic and incubated at 28°C with rotation at 225 rpm for 72 hours. Cultures were pelleted using a Sorvall RC6+ centrifuge at 4,280 × *g* for 6 minutes at room temperature. Plasmid was extracted as described above except the cell pellet was split into 5 columns to prevent overloading and serial eluted into 50  $\mu$ L. Plasmid construction was confirmed via restriction digest using XhoI and XbaI, and the insert was PCR amplified and sequence verified.

## Generation of electrocompetent GBS cells for mprF knockout

Electrocompetent cells were generated as described [42] with minor modifications. Briefly, a GBS COH1 or CJB111 colony was inoculated in 5 mL M17 medium (BD Bacto) with 0.5% glucose and grown overnight at 37°C. The 5 mL was used to inoculate a second overnight culture of 50 mL prewarmed filter-sterilized M17 medium containing 0.5% glucose, 0.6% glycine, and 25% PEG 8000. The second overnight was added to 130 mL of the same medium and grown for 1 hour at 37°C. Cells were pelleted at  $3,200 \times g$  in a Sorvall RC6+ at 4°C for 10 minutes. Cells were washed twice with 25-mL cold filter-sterilized GBS wash buffer containing 25% PEG 8000 and 10% glycerol in water, and pelleted as above. Cell pellets were resuspended in 1 mL GBS wash buffer and either used immediately for transformation or stored in 100-µL aliquots at  $-80^{\circ}$ C until use.

# Deletion of GBS COH1 and CJB111 mprF

Electrocompetent cells were generated as described [42] with minor modifications. The double crossover homologous recombination knockout strategy was performed as described previously [25,42,43] with minor modifications. A total of 1 µg of plasmid was added to electrocompetent GBS cells and transferred to a cold 1 mm cuvette (Fisher or Bio-Rad, Hercules, CA). Electroporation was carried out at 2.5 kV on an Eppendorf eporator. Moreover, 1 mL of THB containing 12.5% PEG 8000, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, and 2 mM CaCl<sub>2</sub> was immediately added, and then the entire reaction was transferred to a glass culture tube. Outgrowth was at 28°C for 2 hours followed by plating on THB agar supplemented with 5 µg/mL erythromycin. Plates were incubated for 48 hours at 28°C. A single colony was cultured overnight in 5-mL THB with 5 µg/mL erythromycin at 28°C. The culture was screened via PCR for the plasmid insert with the initial denaturing step extended to 10 minutes. The overnight culture was diluted 1:1,000 THB containing 5 µg/mL erythromycin and incubated overnight at 37°C to promote single cross over events. The culture was then serial diluted and plated on THB agar plates with antibiotic and incubated at 37°C overnight. Colonies were screened for single crossover events by PCR. Single crossover colonies were inoculated in 5-mL THB at 28°C to promote double crossover events. Overnight cultures were diluted 1:1,000 into 5-mL THB containing sterile 0.75 M sucrose and incubated at 37°C. Overnight cultures were serial diluted and plated on THB agar and incubated at 37°C overnight. Colonies were patched onto THB agar with and without 5 µg/mL erythromycin to confirm loss of plasmid. Colonies were also screened by PCR for the loss of mprF. Colonies positive for the loss of mprF were inoculated into 5-mL THB at 37°C. Cultures were stocked and gDNA extracted as described above, with minor modifications. Sequence confirmation of the mprF knockout was done via Sanger sequencing (Massachusetts General Hospital DNA Core or CU Anschutz Molecular Biology Core). The mutant was grown overnight in 15-mL THB at 37°C and pelleted at 6,150 × g for 5 minutes in a Sorvall RC6+ centrifuge at room temperature for lipid extraction as described. Genomic DNA of COH1 $\Delta$ *mprF* was isolated as described above, and whole genome sequencing was performed in paired-end reads (2 by 150 bp) on the Illumina NextSeq 550 platform at the Microbial Genome Sequencing Center (Pittsburgh, Pennsylvania). Illumina sequence reads are deposited in the Sequence Read Archive, accession PRJNA675025.

#### Complementation of *mprF* in COH1 $\Delta$ *mprF* and CJB111 $\Delta$ *mprF*

Electrocompetent GBS strains were generated as previously described [44]. Briefly, GBS $\Delta mprF$  was inoculated into 5-mL THB with 0.6% glycine and grown overnight. The culture was expanded to 50 mL in prewarmed THB with 0.6% glycine and grown to an OD<sub>600</sub> nm of 0.3 and pelleted for 10 minutes at 3,200 × g at 4°C in a Sorvall RC6+ floor centrifuge. The pellet

was kept on ice through the remainder of the protocol. The pellet was washed twice with 25 mL and once with 10 mL of cold 0.625 M sucrose and pelleted as above. The cell pellet was resuspended in 400  $\mu$ L of cold 20% glycerol, aliquoted in 50  $\mu$ L aliquots, and used immediately or stored at  $-80^{\circ}$ C until use. Electroporation was performed as described above, with recovery in THB supplemented with 0.25 M sucrose, and plated on THB agar with kanamycin at 300  $\mu$ g/mL.

# Acidic Bligh-Dyer lipid extractions

Centrifugation was performed using a Sorvall RC6+ centrifuge. Cultures were pelleted at 4,280 × g for 5 minutes at room temperature unless otherwise stated. The supernatants were removed, and cell pellets were stored at  $-80^{\circ}$ C until acidic Bligh–Dyer lipid extractions were performed as described [3]. Briefly, cell pellets were resuspended in 1X PBS (Sigma-Aldrich) and transferred to Corning Pyrex glass tubes with PTFR-lined caps (VWR, Radnor, PA), followed by 1:2 vol:vol chloroform:methanol addition. Single phase extractions were vortexed periodically and incubated at room temperature for 15 minutes before 500 × g centrifugation for 10 minutes. A 2-phase Bligh–Dyer was achieved by addition of 100 µL 37% HCl, 1 mL CHCl<sub>3</sub>, and 900 µl of 1X PBS, which was then vortexed and centrifuged for 5 minutes at 500 × g. The lower phase was removed to a new tube and dried under nitrogen before being stored at  $-80^{\circ}$ C prior to lipidomic analysis.

# Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry

Normal phase LC was performed on an Agilent 1200 quaternary LC system equipped with an Ascentis silica HPLC column (5 µm; 25 cm by 2.1 mm; Sigma-Aldrich) as described previously [45,46]. Briefly, mobile phase A consisted of chloroform-methanol-aqueous ammonium hydroxide (800:195:5, vol/vol), mobile phase B consisted of chloroform-methanol-water-aqueous ammonium hydroxide (600:340:50:5, vol/vol), and mobile phase C consisted of chloroform-methanol-water-aqueous ammonium hydroxide (450:450:95:5, vol/vol). The elution program consisted of the following: 100% mobile phase A was held isocratically for 2 minutes, then linearly increased to 100% mobile phase B over 14 minutes, and held at 100% mobile phase B for 11 minutes. The LC gradient was then changed to 100% mobile phase C over 3 minutes, held at 100% mobile phase C for 3 minutes, and, finally, returned to 100% mobile phase A over 0.5 minutes and held at 100% mobile phase A for 5 minutes. The LC eluent (with a total flow rate of 300 µl/min) was introduced into the ESI source of a high-resolution Triple-TOF5600 mass spectrometer (Sciex, Framingham, Massachusetts). Instrumental settings for negative-ion ESI and MS/MS analysis of lipid species were IS = -4,500 V, CUR = 20 psi, GSI = 20 psi, DP = -55 V, and FP = -150 V. Settings for positive-ion ESI and MS/MS analysis were IS = +5,000 V, CUR = 20 psi, GSI = 20 psi, DP = +55 V, and FP = +50V. The MS/MS analysis used nitrogen as the collision gas. Data analysis was performed using Analyst TF1.5 software (Sciex).

# pH-adjusted THB growth

Approximately 30 mL of fresh THB were adjusted to different pH values, measured using a Mettler Toledo FiveEasy pH/MV meter, and sterile-filtered using 0.22  $\mu$ M syringe filters. A final volume of 200  $\mu$ L culture medium was aliquoted per well in a flat-bottom 96-well plate (Corning, Corning, NY); culture media were not supplemented with antibiotics. Overnight cultures of GBS strains were used to inoculate the wells to a starting OD<sub>600nm</sub> 0.02 per well. Plates were incubated for 24 hours at 37°C before OD<sub>600nm</sub> was read using a BioTek MX Synergy 2 plate reader. This experiment was performed in biological triplicate.

#### hCMEC cell adherence and invasion assays

Human Cerebral Microvascular Endothelial cells hCMEC/D3 (obtained from Millipore) were grown in EndoGRO-MV complete media (Millipore (St. Louis, MO), SCME004) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and 1 ng/ml fibroblast growth factor-2 (FGF-2; Millipore). Cells were grown in tissue culture treated 24-well plates and 5% CO<sub>2</sub> at 37° C.

Assays to determine the total number of bacteria adhered to host cells or intracellular bacteria were performed as described previously [24,25]. Briefly, bacteria were grown to mid log phase (OD<sub>600nm</sub> 0.4 to 0.5) and normalized to  $1 \times 10^8$  to infect cell monolayers at a multiplicity of infection (MOI) of  $1 (1 \times 10^5$  CFU per well). The total cell-associated GBS were recovered after 30-minute incubation. Cells were washed slowly 5 times with 500 µL 1X PBS (Sigma-Aldrich) and detached by addition of 100 µL of 0.25% trypsin-EDTA solution (Gibco, Waltham, MA) and incubation for 5 minutes before lysing the eukaryotic cells with the addition of 400 µL of 0.025% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and vigorous pipetting. The lysates were then serially diluted and plated on THB agar and incubated overnight to determine CFU. Bacterial invasion assays were performed as described above except infection plates were incubated for 2 hours before incubation with 100-µg gentamicin (Sigma-Aldrich) and 5-µg penicillin (Sigma-Aldrich) supplemented media for an additional 2 hours to kill all extracellular bacteria, prior to being trypsinized, lysed, and plated as described. Experiments were performed in biological triplicate with 4 technical replicates per experiment.

## Murine model of GBS hematogenous meningitis

All animal experiments were conducted under the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee (#00316) at the University of Colorado Anschutz Medical Campus and performed using accepted veterinary standards. The murine meningitis model was performed as previously described [25,47,48]. Briefly, 7-week-old male CD1 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) mice were challenged intravenously with  $1 \times 10^9$  CFU of WT COH1 or the isogenic  $\Delta mprF$  mutant. At 72 hours postinfection, mice were euthanized and blood, lung and brain tissue were harvested, homogenized, and serially diluted on THB agar plates to determine bacterial CFU.

## Histology and ELISA

Mouse brain tissue was frozen in OCT compound (Sakura, Torrance, CA) and sectioned using a CM1950 cryostat (Leica, Buffalo Grove, IL). Sections were stained using hematoxylin–eosin (Sigma-Aldrich), and images were taken using a BZ-X710 microscope (Keyence, Itasca, IL). Images were analyzed using ImageJ software. Meningeal thickening was quantified from sections taken from 3 different mice per group, and 6 images per slide. Meningeal thickening was quantified across 2 points per image. KC protein from mouse brain homogenates was detected by enzyme-linked immunosorbent assay according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN).

# **Ethics statement**

Animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at University of Colorado Anschutz Medical Campus protocol #00316 and were performed using accepted veterinary standards. The University of Colorado Anschutz Medical Campus is AAALAC accredited, and its facilities meet and adhere to the standards in the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals."

# Supporting information

S1 Fig. Detection of Lys-PG and Lys-Glc-DAG in *S. agalactiae* A909 and *S. agalactiae* CNCTC 10/84. Positive TICs (left panels) showing the presence of Lys-PG and Lys-Glc-DAG in *S. agalactiae* A909 and *S. agalactiae* CNCTC 10/84. Mass spectra (right panels) show the [M +H]<sup>+</sup> ions of Lys-Glc-DAG. Lys-Glc-DAG, lysyl-glucosyl-diacylglycerol; Lys-PG, lysyl-phos-phatidylglycerol; TIC, total ion chromatogram. (TIFF)

S2 Fig. Isotopic incorporation of deuterated lysine and <sup>13</sup>C-labeled glucose into Lys-Glc-DAG and Lys-PG. The lipid extracts of S. agalactiae COH1 cultured in DM, DM supplemented with 450 µM L-lysine-d4 (4,4,5,5-D4), or in DM containing 0.5% w/v D-Glucose  $(U^{-13}C_6)$  were analyzed by LC-ESI/MS in the positive ion mode. (A) Negative ESI/MS of [M-H]<sup>-</sup> ions of major Lys-Glc-DAG species in S. agalactiae COH1 when cultured in DM supplemented with lysine-d4. The incorporation of lysine-d4 into Lys-Glc-DAG is evidenced by an upward m/z shift of 4 Da of the [M-H]<sup>-</sup> ion (from m/z 883 to m/z 887). (B) MS/MS of  $[M-H]^-$  at m/z 883.6 produces a deprotonated lysine residue at m/z 145. (C) MS/MS of  $[M-H]^-$  at m/z 887.6 produces a deprotonated lysine-d4 residue at m/z 149. (D)  $[M+H]^+$  ions of major Lys-PG species in S. agalactiae COH1 cultured in DM supplemented with lysine-d4. The incorporation of lysine-d4 in Lys-PG is evidenced by an upward m/z shift of 4 Da from unlabeled Lys-PG (blue dot) to labeled Lys-PG (red dot). (E) MS/MS of 885.6. A major product ion at m/z 291.1 is derived from glucose-lysine residue. (F) MS/MS of m/z 900.7 (containing 15  $^{13}$ C atoms). The presence of m/z 297.1 (with 6-Da shift) is consistent with glucose in Lys-Glc-DAG is replaced with D-Glucose (U-13C6). The other 9 13C atoms are incorporated into the DAG portion of Lys-Glc-DAG. Furthermore, MS/MS data indicate that lysine is linked to the C6 position of glucose by the fragmentation schemes for forming m/z 189 ion from the unlabeled Lys-Glc-DAG and m/z 191 ion from the <sup>13</sup>C-labeled Lys-Glc-DAG. Lys-Glc-DAG, lysyl-glucosyl-diacylglycerol; Lys-PG, lysyl-phosphatidylglycerol; MS/MS, tandem MS.

(PDF)

S3 Fig. Positive ion mass spectra of retention time 27 to 29 minutes of hypervirulent CJB111 strain. Lys-Glc-DAG is present in the membrane of WT CJB111 (A). Deletion of *mprF* from CJB111 genome results in loss of Lys-Glc-DAG from the membrane (B). *MprF* complemented in trans reestablishes Lys-Glc-DAG back into the membrane (C). Lys-Glc-DAG, lysyl-glucosyl-diacylglycerol; WT, wild-type. (PDF)

**S4 Fig. In vitro hCMEC adhesion and invasion of CJB111 strains.** In vitro assays for adherence and invasion of hCMEC cells indicates *mprF* contributes to invasion but not adherence to brain endothelium. Data indicate the percentage of the initial inoculum that was recovered. Experiments were performed 3 times with each condition in quadruplicate. Data from one representative experiment are shown, mean and standard deviation indicated. One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons statistical test was used. P-values indicated; ns, not significant. The numerical data underlying the graphs shown in this figure are provided in <u>S1 Data</u>. (PDF)

**S1 Table. Observed and calculated exact masses of the** [M+H]<sup>+</sup> **ions of Lys-Glc-DAG molecular species in** *S. agalactiae* **COH1.** Lys-Glc-DAG, lysyl-glucosyl-diacylglycerol. (DOCX) S2 Table. Strains and plasmids used in this study. (DOCX)S3 Table. Primers used in this study. (DOCX)

**S1 Data. Numerical data points underlying presented graphs.** (XLSX)

# Acknowledgments

We thank Kathryn Patras at the University of California San Diego for the CNCTC 10/84 strain and Moutusee Islam in Kelli Palmer's lab at The University of Texas at Dallas for *E. fae-cium* 1,231,410 DNA.

# Author Contributions

Conceptualization: Luke R. Joyce, Kelly S. Doran, Kelli L. Palmer, Ziqiang Guan.

- Data curation: Luke R. Joyce, Haider S. Manzer, Jéssica da C. Mendonça, Ricardo Villarreal, Ziqiang Guan.
- Formal analysis: Luke R. Joyce, Haider S. Manzer, Jéssica da C. Mendonça, Ricardo Villarreal, Ziqiang Guan.

Funding acquisition: Prescilla E. Nagao, Kelly S. Doran, Kelli L. Palmer, Ziqiang Guan.

Investigation: Luke R. Joyce.

Methodology: Luke R. Joyce, Ziqiang Guan.

Project administration: Kelli L. Palmer.

Resources: Kelly S. Doran, Kelli L. Palmer.

Supervision: Prescilla E. Nagao, Kelly S. Doran, Kelli L. Palmer.

Validation: Luke R. Joyce, Kelli L. Palmer.

Writing - original draft: Luke R. Joyce.

Writing – review & editing: Luke R. Joyce, Haider S. Manzer, Jéssica da C. Mendonça, Ricardo Villarreal, Kelly S. Doran, Kelli L. Palmer, Ziqiang Guan.

### References

- 1. Roy H. Tuning the properties of the bacterial membrane with aminoacylated phosphatidylglycerol. IUBMB Life. 2009; 61:940–53. https://doi.org/10.1002/iub.240 PMID: <u>19787708</u>
- Adams HM, Joyce LR, Guan Z, Akins RL, Palmer KL. Streptococcus mitis and S. oralis Lack a Requirement for CdsA, the Enzyme Required for Synthesis of Major Membrane Phospholipids in Bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61:e02552–16. <u>https://doi.org/10.1128/AAC.02552-16</u> PMID: 28223392
- Joyce LR, Guan Z, Palmer KL. Phosphatidylcholine Biosynthesis in Mitis Group Streptococci via Host Metabolite Scavenging. J Bacteriol. 2019; 201:e00495–19. <u>https://doi.org/10.1128/JB.00495-19</u> PMID: <u>31501281</u>
- Wilkinson HW. Group B Streptococcal Infection in Humans. Annu Rev Microbiol. 1978; 32:41–57. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.32.100178.000353 PMID: 360972
- Doran KS, Nizet V. Molecular pathogenesis of neonatal Group B Streptococcal infection: No longer in its infancy. Mol Microbiol. 2004; 54:23–31. <u>https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04266.x</u> PMID: <u>15458402</u>

- Hall J, Adams NH, Bartlett L, Seale AC, Lamagni T, Bianchi-Jassir F, et al. Maternal Disease With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. Clin Infect Dis. 2017; 65:S112–S24. <u>https://doi.org/10.1093/cid/cix660</u> PMID: <u>29117328</u>
- Schuchat A. Epidemiology of Group B Streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. Clin Microbiol Rev. 1998; 11:497–513. https://doi.org/10.1128/CMR.11.3.497 PMID: <u>9665980</u>
- Edwards MS, Rench MA, Haffar AA, Murphy MA, Desmond MM, Baker CJ. Long-term sequelae of Group B Streptococcal meningitis in infants. J Pediatr. 1985; 106:717–22. <u>https://doi.org/10.1016/ s0022-3476(85)80342-5</u> PMID: <u>3889248</u>
- Ohlsson A, Shah VS. Intrapartum antibiotics for known maternal Group B Streptococcal colonization. Cochrane Database Syst Rev. 2014:CD007467. <u>https://doi.org/10.1002/14651858.CD007467.pub4</u> PMID: <u>24915629</u>
- Armistead B, Oler E, Adams Waldorf K, Rajagopal L. The Double Life of Group B Streptococcus: Asymptomatic Colonizer and Potent Pathogen. J Mol Biol. 2019; 431:2914–31. <u>https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.01.035</u> PMID: <u>30711542</u>
- Curtis J, Kim G, Wehr NB, Levine RL. Group B Streptococcal phospholipid causes pulmonary hypertension. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100:5087–90. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0931493100</u> PMID: <u>12702761</u>
- Fischer W. The polar lipids of Group B Streptococci. II. Composition and positional distribution of fatty acids. Biochim Biophys Acta. 1977; 487:89–104. <u>https://doi.org/10.1016/0005-2760(77)90046-7</u> PMID: 870060
- Joyce LR, Guan Z, Palmer KL. Streptococcus pneumoniae, S. pyogenes and S. agalactiae membrane phospholipid remodelling in response to human serum. Microbiology (Reading). 2021; 167(5). <u>https:// doi.org/10.1099/mic.0.001048</u> PMID: <u>33983874</u>
- Doran KS, Engelson EJ, Khosravi A, Maisey HC, Fedtke I, Equils O, et al. Blood-brain barrier invasion by Group B *Streptococcus* depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. J Clin Invest. 2005; 115:2499–507. <u>https://doi.org/10.1172/JCl23829</u> PMID: <u>16138192</u>
- Slavetinsky C, Kuhn S, Peschel A. Bacterial aminoacyl phospholipids—Biosynthesis and role in basic cellular processes and pathogenicity. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2017; 1862:1310–8. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.11.013 PMID: 27940309
- Peschel A, Jack RW, Otto M, Collins LV, Staubitz P, Nicholson G, et al. Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. J Exp Med. 2001; 193:1067–76. <u>https://doi.org/10.1084/jem.193.9.1067 PMID: 11342591</u>
- Weidenmaier C, Peschel A, Kempf VA, Lucindo N, Yeaman MR, Bayer AS. DltABCD- and MprF-mediated cell envelope modifications of *Staphylococcus aureus* confer resistance to platelet microbicidal proteins and contribute to virulence in a rabbit endocarditis model. Infect Immun. 2005; 73(12):8033–8. <u>https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8033-8038.2005</u> PMID: <u>16299297</u>
- Kuypers JM, Heggen LM, Rubens CE. Molecular analysis of a region of the Group B Streptococcus chromosome involved in type III capsule expression. Infect Immun. 1989; 57:3058–65. <u>https://doi.org/ 10.1128/iai.57.10.3058-3065.1989</u> PMID: 2550369
- Lancefield RC, McCarty M, Everly WN. Multiple mouse-protective antibodies directed against Group B Streptococci. Special reference to antibodies effective against protein antigens. J Exp Med. 1975; 142:165–79. https://doi.org/10.1084/jem.142.1.165 PMID: 1097573
- Wilkinson HW. Nontypable Group B Streptococci isolated from human sources. J Clin Microbiol. 1977; 6:183–4. https://doi.org/10.1128/jcm.6.2.183-184.1977 PMID: 408376
- Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, et al. METLIN: a metabolite mass spectral database. Ther Drug Monit. 2005; 27(6):747–51. <u>https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000179845.</u> 53213.39 PMID: <u>16404815</u>
- Sud M, Fahy E, Cotter D, Brown A, Dennis EA, Glass CK, et al. LMSD: LIPID MAPS structure database. Nucleic Acids Res. 2007; 35(Database issue):D527–32. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkl838</u> PMID: 17098933
- Roy H, Ibba M. RNA-dependent lipid remodeling by bacterial multiple peptide resistance factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105:4667–72. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0800006105</u> PMID: <u>18305156</u>
- Deng L, Spencer BL, Holmes JA, Mu R, Rego S, Weston TA, et al. The Group B Streptococcal surface antigen I/II protein, BspC, interacts with host vimentin to promote adherence to brain endothelium and inflammation during the pathogenesis of meningitis. PLoS Pathog. 2019; 15:e1007848. <u>https://doi.org/ 10.1371/journal.ppat.1007848</u> PMID: <u>31181121</u>

- Spencer BL, Deng L, Patras KA, Burcham ZM, Sanches GF, Nagao PE, et al. Cas9 contributes to Group B Streptococcal colonization and disease. Front Microbiol. 2019; 10:1–15. <u>https://doi.org/10. 3389/fmicb.2019.00001</u> PMID: <u>30728808</u>
- Faralla C, Metruccio MM, De Chiara M, Mu R, Patras KA, Muzzi A, et al. Analysis of two-component systems in Group B *Streptococcus* shows that RgfAC and the novel FspSR modulate virulence and bacterial fitness. MBio. 2014; 5(3):e00870–14. <u>https://doi.org/10.1128/mBio.00870-14</u> PMID: 24846376
- Spencer BL, Chatterjee A, Duerkop BA, Baker CJ, Doran KS. Complete Genome Sequence of Neonatal Clinical Group B Streptococcal Isolate CJB111. Microbiology resource announcements. 2021; 10.
- Mu R, Cutting AS, Del Rosario Y, Villarino N, Stewart L, Weston TA, et al. Identification of CiaR Regulated Genes That Promote Group B Streptococcal Virulence and Interaction with Brain Endothelial Cells. PLoS ONE. 2016; 11(4):e0153891. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153891</u> PMID: 27100296
- Ernst CM, Kuhn S, Slavetinsky CJ, Krismer BB, Heilbronner S, Gekeler C, et al. The Lipid-Modifying Multiple Peptide Resistance Factor Is an Oligomer Consisting of Distinct Interacting Synthase and Flippase subunits. MBio. 2015; 6:1–9. <u>https://doi.org/10.1128/mBio.02340-14</u> PMID: <u>25626904</u>
- Roy H, Ibba M. Broad range amino acid specificity of RNA-dependent lipid remodeling by multiple peptide resistance factors. J Biol Chem. 2009; 284:29677–83. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M109.046367</u> PMID: <u>19734140</u>
- Hebecker S, Krausze J, Hasenkampf T, Schneider J, Groenewold M, Reichelt J, et al. Structures of two bacterial resistance factors mediating tRNA-dependent aminoacylation of phosphatidylglycerol with lysine or alanine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015; 112:10691–6. <u>https://doi.org/10.1073/pnas. 1511167112</u> PMID: <u>26261323</u>
- Lennarz WJ, Nesbitt JA, Reiss J. The participation of sRNA in the enzymatic synthesis of O-L-lysyl phosphatidylgylcerol in *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1966; 55:934–41. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.55.4.934</u> PMID: <u>5219701</u>
- Saar-Dover R, Bitler A, Nezer R, Shmuel-Galia L, Firon A, Shimoni E, et al. D-alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in Group B *Streptococcus* by increasing the cell wall density. PLoS Pathog. 2012; 8:e1002891. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002891 PMID: 22969424
- Surve MV, Anil A, Kamath KG, Bhutda S, Sthanam LK, Pradhan A, et al. Membrane Vesicles of Group B Streptococcus Disrupt Feto-Maternal Barrier Leading to Preterm Birth. PLoS Pathog. 2016; 12: e1005816. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005816 PMID: 27583406
- Reichmuth AM, Oberli MA, Jaklenec A, Langer R, Blankschtein D. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. Ther Deliv. 2016; 7(5):319–34. <u>https://doi.org/10.4155/tde-2016-0006</u> PMID: 27075952
- Hafez IM, Maurer N, Cullis PR. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. Gene Ther. 2001; 8(15):1188–96. <u>https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301506</u> PMID: <u>11509950</u>
- Van De Rijn I, Kessler RE. Growth characteristics of Group A Streptococci in a new chemically defined medium. Infect Immun. 1980; 27:444–8. <u>https://doi.org/10.1128/iai.27.2.444-448.1980</u> PMID: 6991416
- Chang JC, LaSarre B, Jimenez JC, Aggarwal C, Federle MJ. Two Group A Streptococcal peptide pheromones act through opposing rgg regulators to control biofilm development. PLoS Pathog. 2011; 7: e1002190. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002190</u> PMID: <u>21829369</u>
- Gupta R, Shah P, Swiatlo E. Differential gene expression in *Streptococcus pneumoniae* in response to various iron sources. Microb Pathog. 2009; 47:101–9. <u>https://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.05.003</u> PMID: <u>19464356</u>
- Granok AB, Parsonage D, Ross RP, Caparon MG. The RofA binding site in *Streptococcus pyogenes* is utilized in multiple transcriptional pathways. J Bacteriol. 2000; 182:1529–40. <u>https://doi.org/10.1128/JB. 182.6.1529-1540.2000</u> PMID: <u>10692357</u>
- Jeng A, Sakota V, Li Z, Datta V, Beall B, Nizet V. Molecular genetic analysis of a Group A Streptococcus operon encoding serum opacity factor and a novel fibronectin-binding protein, SfbX. J Bacteriol. 2003; 185(4):1208–17. https://doi.org/10.1128/JB.185.4.1208-1217.2003 PMID: 12562790
- Hooven TA, Bonakdar M, Chamby AB, Ratner AJ. A Counterselectable Sucrose Sensitivity Marker Permits Efficient and Flexible Mutagenesis in *Streptococcus agalactiae*. Appl Environ Microbiol. 2019; 85:1–13. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.03009-18</u> PMID: <u>30658970</u>
- Holo H, Nes IF. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris grown with glycine in osmotically stabilized media. Appl Environ Microbiol. 1989; 55:3119–23. <u>https://doi.org/10.1128/aem.55.12.3119-3123.1989</u> PMID: <u>16348073</u>
- Framson PE, Nittayajarn A, Merry J, Youngman P, Rubens CE. New genetic techniques for Group B Streptococci: High-efficiency transformation, maintenance of temperature-sensitive pWV01 plasmids,

and mutagenesis with Tn917. Appl Environ Microbiol. 1997; 63:3539–47. <u>https://doi.org/10.1128/aem.</u> 63.9.3539-3547.1997 PMID: 9293004

- 45. Tan BK, Bogdanov M, Zhao J, Dowhan W, Raetz CRH, Guan Z. Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates. Proc Natl Acad Sci. 2012; 109:16504–9. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1212797109</u> PMID: <u>22988102</u>
- 46. Li C, Tan BK, Zhao J, Guan Z. In vivo and in vitro synthesis of phosphatidylglycerol by an *Escherichia coli* cardiolipin synthase. J Biol Chem. 2016; 291:25144–53. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M116.762070</u> PMID: <u>27760827</u>
- Kim BJ, Hancock BM, Bermudez A, Del Cid N, Reyes E, van Sorge NM, et al. Bacterial induction of Snail1 contributes to blood-brain barrier disruption. J Clin Invest. 2015; 125:2473–83. <u>https://doi.org/10. 1172/JCI74159</u> PMID: <u>25961453</u>
- Banerjee A, Kim BJ, Carmona EM, Cutting AS, Gurney MA, Carlos C, et al. Bacterial Pili exploit integrin machinery to promote immune activation and efficient blood-brain barrier penetration. Nat Commun. 2011; 2:462. https://doi.org/10.1038/ncomms1474 PMID: 21897373