

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**FENOTIPIA E GENOTIPIA DE *Streptococcus equi*  
ISOLADOS DE EQUINOS DA REGIÃO SUL DO  
BRASIL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Jackeline Karsten Kirinus**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2010**

**FENOTIPIA E GENOTIPIA DE *Streptococcus equi* ISOLADOS  
DE EQUINOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

**por**

**Jackeline Karsten Kirinus**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

**Orientador: Agueda Castagna de Vargas**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2010**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**FENOTIPIA E GENOTIPIA DE *Streptococcus equi* ISOLADOS DE  
EQUINOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

elaborada por  
**Jackeline Karsten Kirinus**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Agueda Castagna de Vargas, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Fábio Leivas Leite, Dr. (UFPEL)**

**Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 01 de abril de 2010.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e oportunidade de chegar até aqui, pelos meus pais, Glademar e Margareth e meu irmão Herison, que sempre se fizeram presentes, me apoiando em todas as etapas de minha vida, me ensinando a amar, ser paciente, ter fé e acreditar num futuro melhor.

Ao César, que foi o amigo, amor e conselheiro de todas as horas, que veio muitas vezes comigo na UFSM ao domingo, me acompanhando nesta jornada.

A toda a minha família e também aos meus amigos de coração (em especial a Michely Machado e Rafaella Seballos) que sempre respeitaram muitos sábados e domingos de trabalho, entendendo e compreendendo as muitas vezes que disse não aos mates e festinhas, sendo grandes amigas e companheiras.

A professora Agueda, minha orientadora, que foi um exemplo de pessoa e profissional, e quem despertou em mim o interesse pela pesquisa e principalmente pela docência.

A todos os amigos que adquiri durante mestrado e que fizeram parte dessa conquista contribuindo para o desenvolvimento dos meus experimentos, entre eles: Lizindra Jaqueline, Mariana Silva, Diego Zeni, Diego de Gaspari.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia de Santa Maria: Lilian, Rose Laura, Letícia, Rosângela, Carina, Fernando, Luana, Ângela, Cláudia, Gustavo Machado, Carol, Lisiane, Ale, Fabi e Tai, por todos os momentos vividos, de trabalho e de amizade.

Aos professores: Carina Moraes, Mateus Matiuzzi, Luciana Potter e Sônia Botton que foram excelentes amigos e professores, me ajudando e orientando em todas as etapas na execução deste trabalho.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **Fenotípi e genotípi de *Streptococcus equi* isolados de equinos da região sul do Brasil**

AUTORA: Jackeline Karsten Kirinus

ORIENTADOR: Agueda Palmira Castagna de Vargas

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 01 de abril de 2010.

As características fenotípicas [morfológicas, bioquímicas, susceptibilidade aos antimicrobianos, índice de resistência múltipla aos antimicrobianos - IRMA, concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) da benzilpenicilina] de 38 isolados de *Streptococcus equi* foram avaliadas neste estudo. A fenotípi demonstrou três padrões de colônias, três perfis de fermentação de carboidratos e variação de 0 a 0,4 no índice de resistência múltipla aos antimicrobianos. Todos os isolados de *S. equi* demonstraram sensibilidade à penicilina, tanto pelo método de disco difusão quanto pelo método de microdiluição. A CIM e CBM média de benzilpenicilina foi de 0,0095 µg/mL e 0,0267 µg/mL para *S. equi* subesp. *equi* e de 0,0128 µg/mL e 0,0380 µg/mL para *S. equi* subesp. *zooepidemicus*. As amostras de *S. equi* diferiram para valores de CIM e CBM ( $p < 0,05$ ). O diâmetro do halo de inibição de penicilina demonstrou relação com a CIM e a CBM para *S. equi* subesp. *equi*, entretanto para as amostras de *S. equi* subesp. *zooepidemicus* esta relação somente foi verificada para a CBM. A CIM de benzilpenicilina frente às amostras isoladas da região Central, Planalto e Sul do estado do Rio Grande do Sul foram estatisticamente semelhantes, mas diferiram do isolado do estado do Paraná, sugerindo o caráter atípico desta cepa. Todos os isolados de *S. equi* são sensíveis à penicilina e sulfazotrim, antimicrobianos de eleição para as afecções por este agente na clínica veterinária. Também foram analisadas as características genotípicas (sequenciamento parcial e análise do gene *hsp60*) de 20 isolados de *Streptococcus equi* oriundos de amostras clínicas de animais com adenite equina. A filogenia mostrou uma politomia entre os isolados, e indicou que este marcador (gene *hsp60*) não permite a diferenciação das subespécies de *S. equi*. Sugere-se a realização de novos estudos com a ampliação da região amostrada ou mesmo com a aplicação de outros marcadores, a fim de esclarecer os padrões evolutivos não-resolvidos e confirmar ou não a diferenciação genética real entre as subespécies.

Palavras chave: *Streptococcus equi*, Fenotípi, Susceptibilidade, Antimicrobianos, Filogenia

## ABSTRACT

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **Phenotypic and genotypic analysis of *Streptococcus equi* isolated from horses in Southern Brazil**

AUTHOR: Jackeline Karsten Kirinus  
ADVISER: Agueda Palmira Castagna de Vargas  
Data and place of the defense: April, 01th, 2010  
Santa Maria

The phenotypic characteristics [morphology, biochemical fermentation, antimicrobial susceptibility, index of multiple resistances to antimicrobials (MAR), minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of benzilpenicilin] of 38 *Streptococcus equi* isolates were evaluated in this study. The phenotypic analyses demonstrated three colony patterns, three carbohydrate fermentation patterns and variation from 0 to 0.4 in the index of multiple resistances to antimicrobials. All the isolates of *S. equi* demonstrated sensitivity to penicillin, both by the disc diffusion method and microdilution method. The average MIC and MBC for benzilpenincillin were of 0,0095 µg/mL and 0.0267 µg/mL for *S. equi* subsp. *equi* and of 0.0128 µg/mL and 0.0380 µg/mL for *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. The samples of *S. equi* differed in the values of MIC and MBC ( $p < 0,05$ ). The size of the penicillin inhibition halo demonstrated a relation with the MIC and MBC for *S. equi* subsp. *equi*, however for the samples of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* this relation was only verified with the MBC. The MIC of benzilpenincillin of the samples isolated from the Central, Planalto and South regions of Rio Grande do Sul were statistically similar, although different from the Paraná state sample, suggesting the atypical character of this strain. All *S. equi* isolates are sensitive to penicillin and sulfazotrim, confirming these as antibiotics of choice for the treatment of infections caused by this agent in the clinical veterinary practice. Genotypic characteristics were also analyzed (*hsp60* gene partial sequencing and analysis) in 20 isolates of *Streptococcus equi* from clinical samples of horses with strangles. The phylogenetic analysis showed a politomy among the isolates, suggesting that the *hsp60* gene does not allow the differentiation between *S. equi* subspecies. New studies are suggested with expansion of territory sampled or even with the application of other markers, in order to clarify the evolutionary patterns not resolved and to confirm or not the real genetic differences between subspecies.

Key-words: *Streptococcus equi*, Phenotypic characterization, Susceptibility, Antimicrobials, Phylogeny.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

TABELA 1 - Susceptibilidade antimicrobiana e índice de resistência múltipla a diferentes classes de antimicrobianos de *Streptococcus equi* pelo método de disco difusão ..... 38

### CAPÍTULO 2

TABLE 1 - Distance matrix at nucleotide level (below the diagonal line) and amino acid (above the diagonal line) between each pair of *Streptococcus* spp. samples..... 51

TABLE 2 - Identification, origin, source and phenotypic characteristics of the *Streptococcus* spp. samples..... 52

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1- Representação gráfica da relação entre CBM e o diâmetro do halo de inibição da penicilina em milímetros para as subespécies de *Streptococcus equi* ..... 40

FIGURA 2 - Relação entre a origem geográfica dos isolados de *Streptococcus equi* e os valores da concentração inibitória mínima - CIM de benzilpenicilina ( $p < 0,05$ )..... 41

FIGURA 3 - Distribuição de frequência da concentração inibitória mínima (CIM) da benzilpenicilina frente aos isolados de *Streptococcus equi* subesp. *equi* e *Streptococcus equi* subesp. *zooepidemicus* ..... 42

### CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Result of the Bayesian analysis and identification of main clades (A and B) of the phylogenetic analysis of *Streptococcus equi*. The values near the internal nodes represent the posterior probability of each clade and the branch sizes are proportional to the scale given as the mean number of substitutions per site..... 50



## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>CBM</b>	Concentração bactericida mínima
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>ESALQ</b>	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
<b><i>has</i></b>	Gene do ácido hialurônico
<b><i>hsp60</i></b>	<i>Heat shock protein</i> (proteínas do choque térmico)
<b>IRMA</b>	Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>MCT</b>	Ministério da Ciência e Tecnologia
<b>mL</b>	Mililitro
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
<b>PFGE</b>	Pulsed field gel electrophoresis (Eletroforese em campo pulsado)
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>RAPD</b>	Random amplification of polymorphic DNA (polimorfismo associado a fragmentos de restrição)
<b><i>RnpB</i></b>	Gene da endoribonuclease
<b>SEBRAE</b>	Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
<b><i>SeM</i></b>	Gene da proteína M
<b>TSA</b>	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos
<b>UI</b>	Unidades internacionais
<b>µg</b>	Micrograma

## LISTA DE APÊNDICES

<b>APÊNDICE 1 - Características fenotípicas das 38 amostras de <i>Streptococcus equi</i> oriundas de eqüinos com sinais clínicos de adenite eqüina .....</b>	<b>59</b>
<b>APÊNDICE 2 - Valores obtidos com os testes de susceptibilidade de penicilina das amostras de <i>Streptococcus equi</i> e referência pelos métodos de disco difusão e microdiluição.....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICE 3 - Valores relativos à CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub>, CBM<sub>50</sub> e CBM<sub>90</sub> de benzilpenicilina para as amostras de <i>Streptococcus equi</i>.....</b>	<b>61</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
<b>2.1 <i>Streptococcus equi</i></b> .....	15
<b>2.2 Métodos descritos para a identificação de <i>Streptococcus equi</i></b> .....	16
<b>2.3 Resistência aos antimicrobianos</b> .....	17
<b>3 CAPÍTULO 1</b> .....	20
<b>Perfil fenotípico e susceptibilidade antimicrobiana de <i>Streptococcus equi</i> isolados de equinos da região Sul do Brasil</b> .....	20
<b>ABSTRACT</b> .....	20
<b>RESUMO</b> .....	21
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
<b>RESULTADOS</b> .....	26
<b>DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>CONCLUSÃO</b> .....	32
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
<b>4 CAPÍTULO 2</b> .....	42
<b>Phylogenetic relationships in the <i>Streptococcus equi</i> subspecies based on partial <i>hsp60</i> gene sequences</b> .....	43
<b>Abstract</b> .....	43
<b>1 Introduction</b> .....	43
<b>2 Results</b> .....	44
<b>3 Discussion</b> .....	45

<b>4 Conclusion</b> .....	46
<b>5 Material and methods</b> .....	47
<b>6 Acknowledgements</b> .....	48
<b>7 References</b> .....	48
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	53
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54

# 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o terceiro maior rebanho equino do mundo, com um plantel de 8,4 milhões de animais (FAO, 2009). A equideocultura representa uma grande parcela do agronegócio brasileiro, principalmente nos setores ligados ao lazer, cultura e turismo, constituindo uma das cadeias produtivas que oferece mais oportunidades de trabalho, e conquistando posição de destaque na economia nacional. O complexo do agronegócio do cavalo no Brasil vem ganhando espaço a partir da Comissão Nacional do Cavalo, criada em 2003, com intuito de fundamentar parcerias com entidades como o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), MCT (Ministério da Ciência e Tecnologia), SEBRAE (Serviço de Apoio as Micro e Pequenas Empresas) e ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz). Por isso, qualquer processo que possa auxiliar na prevenção e no desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais eficazes para doenças infecciosas nesses rebanhos tem crucial importância, tanto do ponto de vista econômico quanto de saúde animal.

Ao longo da história, as doenças infecciosas têm sido uma grande ameaça à saúde animal e uma proeminente causa de morbidade e mortalidade. Dentre as enfermidades do trato respiratório dos eqüinos, destaca-se a adenite equina, também conhecida como garrotilho, causada por *Streptococcus equi* subespécie *equi* (*S. equi* subesp. *equi*), (TIMONEY, 1997). O termo garrotilho deve-se ao fato de que cavalos afetados apresentam aumento dos linfonodos retrofaríngeos e submandibulares, que obstruem a faringe (ANZAI et al., 1999), o que se parece com um garroteamento. A multiplicação bacteriana leva a formação de abscessos que eventualmente rompem drenando o material purulento para o trato respiratório superior ou supurando através da pele (WALLER & JOLLEY, 2007).

A conduta terapêutica e profilática recomendada inclui o uso de antimicrobianos eficientes e vacinas. No entanto, o tratamento é em geral dificultado pela resistência do agente aos antimicrobianos e pela baixa eficácia das vacinas disponíveis no mercado, que protegem em torno de 50% dos vacinados, apenas reduzindo a severidade da doença e a morbidade durante os surtos (HARRINGTON et al., 2002). A resistência antimicrobiana é uma consequência natural e inevitável da utilização de agentes antimicrobianos (FEARY, 2005). Por isso, avaliar a susceptibilidade bacteriana aos antimicrobianos dos isolados de

*Streptococcus equi* (*S. equi*) é muito importante, e constitui-se num dos objetivos deste estudo.

Tradicionalmente a diferenciação fenotípica entre as subespécies de *S. equi* é realizada pela fermentação de açúcares (KUWAMOTO et al., 2001). Entretanto, existem cepas de *S. equi* subesp. *equi* atípicas que apresentam fermentação de trealose, lactose ou ambos, dificultando sua diferenciação pelos métodos tradicionais de rotina (GRANT et al., 1993).

Devido aos problemas relacionados com a diferenciação fenotípica entre as subespécies de *S. equi*, os métodos moleculares de caracterização vêm conquistando espaço neste contexto. Dentre eles, podemos citar o sequenciamento parcial e análise do gene *hsp60* (*heat shock protein*) utilizado para identificação das subespécies do agente (SILVA et al., 2007).

A utilização de marcadores moleculares para a distinção e/ou estabelecimento das relações filogenéticas dessas subespécies constitui-se numa alternativa à caracterização fenotípica tradicional, que apresenta subjetividade nos resultados. Portanto, o outro objetivo deste estudo foi testar a utilidade do gene *hsp60* na identificação das subespécies de *S. equi* e avaliar os padrões evolutivos subjacentes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Streptococcus equi*

O gênero *Streptococcus* pertence ao grupo de bactérias Gram positivas e catalase negativa, morfológicamente constituído por cadeias ou pares. Podem ser aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, com requerimentos nutricionais complexos e homofermentadores, processo no qual o ácido láctico é o único produto da fermentação da glicose (QUINN et al., 1994). A temperatura ótima de incubação varia entre as espécies de *Streptococcus*, porém usualmente encontra-se em torno de 37°C (HARDIE, 1986). Muitas espécies produzem uma cápsula de ácido hialurônico durante a fase inicial de crescimento em cultivo bacteriano (LEVINSON & JAMETZ, 2000).

Um importante patógeno do gênero *Streptococcus* que vem sendo estudado nos eqüinos é o *Streptococcus equi* (*S. equi*), bactéria  $\beta$ -hemolítica pertencente ao grupo C de Lancefield. A espécie apresenta duas subespécies: *Streptococcus equi* subespécie *equi* (*S. equi* subesp. *equi*), agente causador da adenite equina; e o *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* (*S. equi* subesp. *zooepidemicus*), envolvido em doenças respiratórias e metrites (WELSH, 1984; TIMONEY, 1997; NEWTON et al., 2008). Há outro microrganismo relacionado geneticamente com os *S. equi*, o *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *equisimilis* (*S. dysgalactiae* subesp. *equisimilis*), que pertence ao mesmo grupo C de Lancefield, porém com potencial patogênico muito diferente e frequentemente isolado de amostras clínicas como contaminante secundário (TIMONEY, 2004). A partir de 2004, outra nova subespécie foi identificada e classificada como *S. equi* subesp. *ruminatorum*, isolado de casos de mastite em pequenos ruminantes. O agente foi classificado no grupo C de Lancefield e apresentou 98% de homologia de rRNA 16S com *Streptococcus equi* subesp. *equi*, sendo classificado como *Streptococcus equi* subesp. *ruminatorum* (FERNANDEZ et al., 2004).

Vários são os fatores de patogenicidade descritos por *S. equi*, entre eles a proteína M e a cápsula de ácido hialurônico, ambos componentes da parede celular bacteriana. A ação antifagocítica da proteína M ocorre pela inibição do fator H do complemento e pela ligação ao fibrinogênio, impedindo o reconhecimento da bactéria como estranha pelo sistema imune do hospedeiro. A ação antifagocítica do *S. equi* é muito similar à proteína M dos Estreptococos

do grupo A de Lancefield. A cápsula de ácido hialurônico está relacionada à aderência da bactéria, quanto maior a quantidade de cápsula, maior a adesão nas células epiteliais. Outros fatores de virulência como a hialuronidase, estreptolisinas, estreptoquinases também contribuem para a evasão do sistema imune e formação de abscessos (GALÁN & TIMONEY, 1987; LEVINSON & JAMETZ, 2000; HARRINGTON et al., 2002; HERWALD et al., 2004; HOLDEN et al., 2009).

## 2.2 Métodos descritos para a identificação de *Streptococcus equi*

*S. equi* subesp. *equi* é fenotipicamente e geneticamente relacionado com *S. equi* subesp. *zooepidemicus*, ambos considerados até 1984 espécies distintas (FACKLAM, 2002). Acredita-se que o *S. equi* subesp. *equi* possa ter evoluído do ancestral *S. equi* subesp. *zooepidemicus*, associado a doenças em equinos e outras espécies animais, incluindo o homem (HOLDEN et al., 2009).

A classificação sorológica do gênero *Streptococcus* nos grupos de Lancefield é baseada num polissacarídeo de composição variável, denominado carboidrato C, e designado por letras do alfabeto de A até V (TEIXEIRA & TRABULSI, 2004). Convencionalmente, os grupos são identificados pela utilização de testes bioquímicos de fermentação de carboidratos.

O grupo C de Lancefield é dividido em quatro subespécies, baseado na hemólise e capacidade de fermentação de trealose, sorbitol e lactose. *S. subesp. equi*, beta hemolítico, não fermenta nenhum dos carboidratos; *S. subesp. zooepidemicus*, beta hemolítico, fermenta sorbitol e lactose, e não fermenta trealose; e o *S. dysgalactiae* subesp. *equisimilis*, beta hemolítico, não fermenta sorbitol, fermenta trealose, e pode ser variável para lactose; *S. equi* subesp. *ruminatorum*, beta-hemolítico, não fermenta trealose e sorbitol e fermenta lactose (LANCEFIELD, 1933; QUINN et al., 1994; KUWAMOTO et al., 200; FERNANDEZ et al., 2004).

A utilização de Kits comerciais de fermentação de açúcares em microplaca, como o API 20 STREP (BioMérieux) também vem sendo utilizado como uma alternativa de alto poder discriminatório (ENSINK et al., 2005; MORAES, 2008). Entretanto, cepas atípicas de *S. equi* subesp. *equi* fermentam os referidos carboidratos, dificultando a identificação dessas subespécies (GRANT et al., 1993).



Devido à grande homologia entre as subespécies de *S. equi*, métodos genotípicos vem ganhando espaço nesse contexto de diferenciação, entre eles: a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) baseada na caracterização da região hipervariável da proteína M (WALKER & TIMONEY, 1998); o sequenciamento de regiões intergênicas do gene 16S-23S (CHANTER et al., 1997); polimorfismo de DNA associado à amplificação de fragmentos de produtos obtidos pela reação da polimerase em cadeia (RAPD-PCR) (DUARTE et al., 2004); eletroforese em campo pulsado (PFGE) de técnicas de RAPD (GONZALEZ-REY et al., 2003); duas reações de PCR, com uso de sete e oito *primers* simultaneamente, onde o tamanho de cada *amplicon* caracteriza uma espécie diferente de *Streptococcus* (KAWATA et al. 2004).

Também já foi descrita a técnica de PCR baseada na amplificação de genes *housekeeping* para identificação de *S. equi* subesp. *equi* (LADLOW et al., 2006) e o sequenciamento parcial e análise do gene *hsp60*(*heat shock protein*) para identificação das subespécies de *S. equi* (SILVA et al., 2007).

Com vistas ao diagnóstico, novas tecnologias vêm sendo aplicadas para estabelecer diferenças ou semelhanças através relações filogenéticas, podendo-se citar a utilização do gene *rnpB* (endoribonuclease) pelo método da máxima parcimônia descrito para discriminação das subespécies de *S. equi* (TÄPP, 2003). KELLY et al. (2006) empregou o *software* PAUP version 4.0, pelo método Maximum Likelihood, para estabelecer a relação entre 15 amostras de *S. equi*, com variação na sequência do gene da proteína M (*SeM*). BLANK et al. (2008) também utilizou a filogenia para verificar a evolução da síntese dos genes de expressão do ácido hialurônico (*has*) das subespécies de *S. equi* por meio do modelo evolucionário de Kimura dois parâmetros.

Entretanto, ressalta-se que variações na sequência de aminoácidos das proteínas de superfície podem interferir na análise correta das amostras (KELLY et al. 2006). Tendo em vista esse fato, um dos objetivos deste estudo foi testar a utilidade do gene *hsp60* na identificação das subespécies de *S. equi* e avaliar os padrões evolutivos subjacentes.

### **2.3 Resistência aos antimicrobianos**

As doenças infecciosas são uma grande ameaça à saúde humana e animal, sendo responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Por esse motivo, o uso de

antimicrobianos tem sido utilizado em larga escala, acarretando uma série de problemas, principalmente a resistência microbiana. O desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano vem acompanhado pela resistência dos microrganismos, e o crescente número de patógenos resistentes é uma ameaça constante ao desenvolvimento de novos fármacos (ANTUNES et al. 2006).

Em 1933, com a larga utilização das sulfonamidas, e em 1941 da penicilina (POOLE, 2005), constatou-se que a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos podia ser uma característica natural das espécies bacterianas ou ser adquirida por cepas individuais dentro de uma população sensível (TAVARES, 2000). Entretanto, logo foi observado que as bactérias podiam tornar-se resistentes aos antimicrobianos, e que as cepas resistentes emergiam após a introdução de novos fármacos (LI, 2000).

A resistência aos antimicrobianos se desenvolveu ao longo do tempo, antes da introdução dos agentes antimicrobianos na medicina humana e veterinária. Esta provavelmente ocorreu milhões de anos atrás em bactérias produtoras de antibióticos vivendo no solo, e foi subsequentemente transferida para espécies bacterianas de interesse médico. As bactérias têm desenvolvido vários mecanismos para neutralizar a ação dos agentes antimicrobianos. O mais comum é a inativação enzimática do fármaco, modificação ou substituição do alvo do fármaco, ativação do efluxo e redução da assimilação. A resistência pode ser intrínseca ou adquirida por conjugação, transformação ou transdução. Uma vez que distintos genes de resistência são freqüentemente agrupados, a transferência horizontal de um único elemento genético pode resultar em aquisição pelas bactérias receptoras de a múltipla resistência (TAVARES, 2000; TILLOTSON & WATSON, 2001; FEARY, 2005; FONG & DRLICA, 2008; GUARDABASSI et al., 2008).

Algumas espécies apresentam elevados graus de resistência, como é o caso do *Staphylococcus aureus*, enquanto que outras mantêm uma elevada sensibilidade aos fármacos ativos, como a sensibilidade apresentada pelos *S. pyogenes* frente às penicilinas (TAVARES, 2000).

Segundo o “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 1997), a susceptibilidade antimicrobiana pode ser avaliada pelo método de Kirby Bauer, muito utilizado na prática veterinária devido a simplicidade e rapidez, porém fornece apenas resultados qualitativos. Para a obtenção de dados quantitativos, utilizou-se a concentração inibitória mínima (CIM) (NIELSEN et al., 2007). Um grande número de trabalhos vêm utilizando a técnica de microdiluição para a determinação da CIM, que representa uma vantagem em possuir o detalhamento técnico bem definido dos dados analisados. É

conveniente realizar a concentração bactericida mínima (CBM), a qual irá fornecer os números exatos de células viáveis em cada diluição (NCCLS, 1997).

A comprovação da sensibilidade do teste de difusão em ágar para determinação do diâmetro da halo de inibição do antimicrobiano e o método de E-test para determinação da CIM de 191 isolados de eqüinos de *S. subesp. equi* e *S. subesp. zooepidemicus* foram descritos por TROLLDENIER e colaboradores (2000).

O uso prudente da terapia antimicrobiana é um componente crítico da medicina eqüina, a susceptibilidade *in vitro* a determinados agentes antimicrobianos é altamente previsível (GUARDABASSI et al., 2008). Por exemplo, os estreptococos beta-hemolíticos são quase sempre sensíveis às penicilinas e *Rhodococcus equi* é geralmente sensível à eritromicina, pelo menos com base em avaliações *in vitro*, sendo estes, consideradas fármacos de primeira escolha no tratamentos de infecções ocasionadas por esses patógenos (GUARDABASSI et al., 2008).

Um estudo realizado em pôneis sobre a aplicação clínica e profilática da administração de penicilina G mostrou eficácia para infecções locais, conseqüentemente, as penicilinas devem ser preferidas em relação à trimetropim/sulfazotrim para as infecções onde as bactérias residem em um lúmen com líquido, tal como um abscesso (ENSINK et al., 2005).

Entretanto, relatos de redução da susceptibilidade em bactérias do gênero *Streptococcus* frente à penicilina já foram descritas. Odenholt et al. (2003) realizou experimentos com diferentes concentrações de benzilpenicilina em modelo cinético *in vitro*. A relação do índice farmacocinética/farmacodinâmica em diferentes amostras pode estar atribuída as interações das proteínas que ligam a penicilina na bactéria, devido à afinidade do fármaco.

O aumento de resistência é um problema multifatorial e os regimes de dosagens ótimas são considerados fatores importantes para minimizar a emergência de amostras resistentes, como mostra o estudo realizado por Lister (2002).

Além dos trabalhos citados, muitos clínicos alegam que a penicilina, eleição para adenite equina, não é eficaz no tratamento (comunicação pessoal). Por isso, a determinação da susceptibilidade à penicilina, tanto pelo método de disco difusão quanto pelo método de microdiluição faz-se necessária para auxiliar no tratamento da enfermidade.

### 3 CAPÍTULO 1

#### **Perfil fenotípico e susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus equi* isolados de equinos da região Sul do Brasil<sup>1</sup>**

Jackeline K. Kirinus<sup>2</sup> Agueda P. C. Vargas<sup>2\*</sup>

A ser submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

**ABSTRACT.-** Kirinus J.K., Silva M.S. & Vargas A.P.C. 2010. [**Phenotypic profile and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus equi* isolated from horses in Southern Brazil**]. Perfil fenotípico e susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus equi* isolados de equinos da região Sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Bacteriologia (LABAC). Avenida Roraima, nº 1000, Sala 5137, Prédio 44, Camobi, Santa Maria, Brasil. E-mail: [agueda.vargas@gmail.com](mailto:agueda.vargas@gmail.com)

Phenotypic characteristics [morphology, biochemical fermentation, antimicrobial susceptibility, index of multiple resistances to antimicrobials (MAR), minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of benzilpenicillin] of 38 *Streptococcus equi* isolates from clinical samples of horses with strangles were the aim of this study. The phenotypic analyses demonstrated three colony patterns, three carbohydrate fermentation biotypes and IRMA variation from 0 to 0.4. All the isolates of *S. equi* demonstrated sensitivity to penicillin, both by the disc diffusion method and microdilution method. The average MIC and MBC for benzilpenincillin were of 0.0095 µg/mL and 0,0267 µg/mL for *S. equi* subsp. *equi* and of 0.0128 µg/mL and 0.0380 µg/mL for *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. The values of MIC and MBC differed between the subspecies (p<0.05). The diameter of penicillin inhibiton halo demonstrated a relation with the MIC ( $\hat{Y} = 0.03638 - 0.00072x$ ) for *Streptococcus equi* subsp. *equi*. A relation between the diameter of the

---

<sup>1</sup>Recebido em .....

Aceito para publicação em .....

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, nº 1000, Sala 5137, Prédio 44, Camobi, Santa Maria, Brasil. \*Autor para correspondência: [agueda.vargas@gmail.com](mailto:agueda.vargas@gmail.com)

inhibition halo of penicillin was also observed with the MBC for *S. equi* subsp. *equi* ( $\hat{Y} = 0,10931 - 0,00223x$ ). However for the samples of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* this relation was only verified with the MBC ( $\hat{Y} = 0,1322 - 0,00271x$ ). The MIC of benzilpenicillin of the samples isolated from the Central, Planalto and South regions of Rio Grande do Sul were statistically similar, although different from the Paraná state sample, suggesting the atypical character of this strain. All the *S. equi* isolates are sensitive to penicillin and sulfazotrim, confirming these as antibiotics of choice for the treatment of infections caused by this agent in the clinical veterinary practice. The results obtained do not discard the prudent use of antimicrobials.

INDEX TERMS: *Streptococcus equi*, strangles, phenotypic characterization, susceptibility, resistance.

**RESUMO.- [Perfil fenotípico e susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus equi* isolados de equinos da região Sul do Brasil.]** As características fenotípicas [morfológicas, bioquímicas, susceptibilidade aos antimicrobianos, índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da benzilpenicilina] de 38 isolados de *Streptococcus equi* oriundos de amostras clínicas de animais com adenite equina foram alvo deste estudo. A fenotipia demonstrou três padrões de colônias, três biotipos de fermentação de carboidratos e variação de 0 a 0,4 no IRMA. Todos os isolados de *S. equi* demonstraram sensibilidade à penicilina, tanto pelo método de disco difusão quanto pelo método de microdiluição. A CIM e CBM média de benzilpenicilina foi de 0,0095 µg/mL e 0,0267 µg/mL para *S. equi* subesp. *equi* e de 0,0128 µg/mL e 0,0380 µg/mL para *S. equi* subesp. *zooepidemicus*. Os valores de CIM e CBM diferiram entre as subespécies ( $p < 0,05$ ). O diâmetro do halo de inibição de penicilina demonstrou relação com a CIM ( $\hat{Y} = 0,03638 - 0,00072x$ ) para *S. equi* subesp. *equi*. Também foi demonstrada relação entre o diâmetro do halo de inibição de penicilina com a CBM para *S. equi* subesp. *equi* ( $\hat{Y} = 0,10931 - 0,00223x$ ). Entretanto para as amostras de *S. equi* subesp. *zooepidemicus* esta relação somente foi verificada para a CBM ( $\hat{Y} = 0,1322 - 0,00271x$ ). A CIM de benzilpenicilina frente às amostras isoladas da região Central, Planalto e Sul do estado do Rio Grande do Sul foram estatisticamente semelhantes, mas diferiram do isolado do estado do Paraná, sugerindo o caráter atípico desta cepa. Todos os isolados de *S. equi* são

sensíveis à penicilina e sulfazotrim, confirmando a eleição destes antimicrobianos para o tratamento das infecções por este agente na clínica veterinária. Os resultados obtidos não dispensam a utilização prudente dos antimicrobianos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Streptococcus equi*, garrotilho, fenotipia, susceptibilidade, resistência.

## INTRODUÇÃO

A adenite equina é uma enfermidade respiratória, causada por *Streptococcus equi* subespécie *equi*, cocos Gram positivos  $\beta$ -hemolíticos do grupo C de Lancefield, catalase negativa (Quinn et al. 1994). A doença é considerada altamente contagiosa entre os equídeos, afetando o trato respiratório superior com formação de abscessos nos linfonodos regionais que podem eventualmente romper, drenando o conteúdo purulento para o trato respiratório superior, ou supurar pela pele (Timoney 1997, Harrington et al. 2002, Quinn et al. 1994, Waller & Jolley 2007).

*S. equi* subesp. *equi* é fenotipicamente e geneticamente relacionado com *S. equi* subesp. *zoepidemicus*, ambos considerados até 1984 espécies distintas (Facklam 2002). Acredita-se que o *S. equi* subesp. *equi* possa ter evoluído do ancestral *S. equi* subesp. *zoepidemicus*, que é causador de doenças secundárias em equinos e também em outras espécies de animais, incluindo o homem (Holden et al. 2009).

A diferenciação entre os subtipos é realizada de forma rotineira pela utilização de técnicas fenotípicas, como a fermentação de açúcares (Timoney 2004). O grupo C de Lancefield, do qual faz parte o *S. equi*, apresenta três espécies, classificadas de acordo com a produção de hemólise e capacidade de fermentação de trealose, sorbitol e lactose (Lancefield 1933, Quinn et al. 1994, Kuwamoto et al. 2001). Apesar da larga utilização desses critérios fenotípicos, cepas atípicas de *S. equi* subesp. *equi* podem fermentar alguns dos carboidratos, induzindo a erros na interpretação dos resultados (Grant et al. 1993).

A partir do diagnóstico da enfermidade, a conduta terapêutica recomendada inclui o uso de antimicrobianos. Todavia, o tratamento pode ser dificultado pela resistência do *S. equi* aos antimicrobianos, o que se constitui numa consequência natural e inevitável (Harrington et

al. 2002, Feary 2005). Por outro lado, cabe ressaltar que estudos referentes à susceptibilidade de *S. equi* são muito escassos, tanto no Brasil, bem como na literatura internacional. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi analisar amostras clínicas oriundas de equinos com adenite equina, relacionando as características fenotípicas (morfológicas, bioquímicas, susceptibilidade aos antimicrobianos, índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da benzilpenicilina) dos isolados de *S. equi* com vistas à aplicação no diagnóstico e tratamento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Características fenotípicas

Morfologia das colônias de *Streptococcus* sp.

Foram analisadas 38 amostras de *Streptococcus equi*, isoladas de equinos das raças puro sangue inglês, crioulo e brasileiro de hipismo com sinais clínicos de garrotilho, obtidos da rotina de diagnóstico laboratorial (37 dos isolados do estado do Rio Grande do Sul: destes, 22 da região sul do estado; 14 da região central e um da região do planalto) e um isolado do estado do Paraná; distribuídos em 19 estabelecimentos de criação. O cultivo bacteriano primário foi realizado em base de ágar sangue (Himedia Laboratories<sup>®</sup>) acrescido com 5% de sangue ovino desfibrinado e incubado à 37°C por 48 horas. Foram observadas as características morfo-tintoriais dos isolados, bem como a produção de hemólise (Quinn et al. 1994). Colônias beta-hemolíticas de cocos gram positivos, catalase negativas, foram repicadas em base de ágar sangue acrescida com 5% de sangue ovino desfibrinado e incubadas à 37°C por 48 horas e após caracterizadas morfologicamente (Koneman et al. 2001) através da margem, cor, densidade, superfície, hemólise e tamanho das colônias.

Amostras de referência de *S. equi* subesp. *equi*\_ATCC 39506, *Staphylococcus aureus*\_ATCC 25923 e *Escherichia coli*\_ATCC 25922 foram utilizadas como controle de qualidade tanto para o método de disco difusão, como para o método de microdiluição.

### Caracterização bioquímica

As colônias morfológicamente caracterizadas como *Streptococcus equi* foram suspensas em solução salina em turvação equivalente a escala cinco de McFarland, para a inoculação dos testes bioquímicos de fermentação de carboidratos: trealose, sorbitol e lactose (Quinn et al. 1994; Grant et al. 1993).

### Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) – método de disco difusão

Para avaliação da suscetibilidade antimicrobiana *in vitro*, utilizou-se o método de Kirby Bauer Modificado (NCCLS 1999). Foram testados os seguintes antimicrobianos pertencentes às classes: 1) aminoglicosídeos - amicacina (30 µg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg) e neomicina (30 µg); 2) beta-lactâmicos - amoxicilina (10 µg), ampicilina (10 µg), cefalexina (30 µg), cefalotina (30 µg), imipenem (10 µg), oxacilina (01 µg) e penicilina (10 UI); 3) fluoroquinolonas – enrofloxacin (05µg); 4) lincosamidas – lincomicina (02 µg); 5) propanodiol - cloranfenicol (30 µg); 6) macrolídeos - azitromicina (15 µg) e eritromicina (15 µg); 7) polimixinas – polimixina B (300 UI); 8) rifamicinas - rifampicina (05 µg); 9) sulfamidas – sulfazotrim (25 µg) e 10) tetraciclina - tetraciclina (30 µg);

Os resultados foram interpretados de acordo com o padrão estabelecido pelo NCCLS (1999), e os diâmetros dos halos de inibição da penicilina foram anotados para correlacionar com os resultados da CIM e CBM.

O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) foi calculado conforme metodologia descrita por Krumperman (1983), através da razão entre o número de classes antimicrobianas contra as quais cada isolado é resistente e o número total de classes antimicrobianas testadas.

### Determinação da CIM e CBM de benzilpenicilina – método de microdiluição

A atividade antimicrobiana foi determinada para a benzilpenicilina (Novafarma, indústria farmacêutica<sup>®</sup>) utilizando o método de microdiluição, baseado no documento M7-A6 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2003). Este método requer o uso de 200µL de caldo Mueller Hinton (Himedia Laboratories<sup>®</sup>) distribuídos em placas de poliestireno retangulares com 96 poços de fundo chato, estéreis.



A solução estoque de benzilpenicilina (1,20 µg/mL) foi diluída na razão de 2 para os demais poços. Assim, foram testadas 12 concentrações (1,20 a 0,00058 µg/mL).

Anteriormente à realização do teste, os isolados bacterianos (*S. equi* subesp. *equi* e *S. equi* subesp. *zooepidemicus*) foram cultivadas em base de ágar sangue ovino 5%. O inóculo bacteriano foi preparado com turbidez idêntica à solução padrão da escala 0,5 de McFarland ( $1-2 \times 10^8$  UFC/mL). Esta suspensão foi diluída em solução salina e utilizada nos ensaios até 15 minutos após o preparo, de maneira que cada poço contivesse aproximadamente  $1-9 \times 10^5$  UFC/mL. As placas foram incubadas por 24 horas a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

Após o período de incubação, a CIM foi determinada como a menor concentração que inibiu efetivamente o crescimento bacteriano nos poços de microdiluição. Para esta determinação foi adicionado 20 µL de solução a 1% do corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (Vetec®), a fim de auxiliar na revelação da CIM (Murari et al. 2008). A CBM, menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir 99,9% do crescimento destas culturas foi determinada através do plaqueamento de 50 µL de cada poço em ágar sangue ovino 5% em placas de petri de 60 X 15 mm (Prolab®). O ensaio de cada amostra foi realizado em triplicata, também foram realizados controles positivos e negativos para cada ensaio.

#### Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, distribuição de frequência, análise de variância e análise não paramétrica de Kruskal-Wallis. Foi realizado teste de correlação e comparação de médias em nível de 5% de significância. Também foram submetidos à análise de regressão, na qual a escolha dos modelos baseou-se na significância dos coeficientes linear, quadrático e cúbico, utilizando-se o teste “t”, de Student, em 5% de probabilidade (SAS, 2001).

Para estabelecer relação entre CIM, CBM e o diâmetro do halo de inibição da penicilina em milímetros (mm) foi aplicada a análise de regressão linear.

A sensibilidade das amostras de *Streptococcus equi* frente aos antimicrobianos foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis. Foram atribuídos valores para as respostas ao teste de sensibilidade (sensível = 2; intermediário = 1 e resistente = 0). Quando identificadas diferenças aplicou-se o teste de Duncan para comparar as médias. As análises foram realizadas pelo programa estatístico SAS (2001).

## RESULTADOS

Todos os 38 isolados bacterianos beta-hemolíticos do gênero *Streptococcus* apresentaram colônias de densidade translúcida, superfície brilhante e tamanho de 0,5-1,0 mm. A margem e a cor das colônias analisadas tiveram três padrões entre os isolados. Assim 16 isolados demonstraram margem inteira e cor amarela (padrão A), dois isolados com margem inteira e cor branca (padrão B) e 20 isolados com margem ondulada e cor branca (padrão C).

A análise bioquímica classificou os 38 isolados em três biotipos. Vinte isolados do biotipo I (*S. equi* subesp. *equi*), não fermentadores dos carboidratos trealose, sorbitol e lactose; 16 isolados do biotipo II (*S. equi* subesp. *zooepidemicus*), fermentadores de lactose e sorbitol e dois isolados do biotipo III, considerados como *S. equi* subesp. *equi* atípicos, somente fermentadores de lactose.

As 38 amostras de *S. equi* analisadas demonstraram 100% de sensibilidade a azitromicina, cefalexina, cloranfenicol, imipenem, lincomicina, penicilina, polimixina B e sulfazotrim; 97% de sensibilidade à ampicilina, cefalotina e eritromicina; 95% à gentamicina e neomicina; 92% à amoxicilina e oxacilina; 87% à enrofloxacina e estreptomicina; 85% à rifampicina; 79% à tetraciclina e 76% à amicacina (Tab.1).

Entre as classes de antimicrobianos testados, ocorreu maior resistência no grupo dos aminoglicosídeos 42% (16/38 isolados), 11 dos quais são *S. equi* subesp. *equi* e cinco *S. equi* subesp. *zooepidemicus*. Seis isolados de *S. equi* subesp. *equi* foram resistentes à classe dos beta-lactâmicos. Foi observado 8% (3/38) e 8% (3/38) dos isolados resistentes à oxacilina e amoxicilina, respectivamente. Já no grupo das fluoroquinolonas, observou-se que 13% (5/38) das amostras eram resistentes, novamente um maior número nas amostras classificadas como *S. equi* subesp. *equi* (4/22). Entretanto, na classe das tetraciclinas o maior número de resistências ocorreu nas amostras de *S. equi* subesp. *zooepidemicus* (6/16) do que nas amostras de *S. equi* subesp. *equi* (2/22). A análise estatística comprovou que os grupos das tetraciclinas e das fluoroquinolonas diferiram entre as subespécies de *S. equi* ( $p < 0,05$ ).

Dos 38 isolados, seis foram susceptíveis aos 20 antimicrobianos das 10 classes testadas e 15 tiveram IRMA 0,0. O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) dos isolados de *S. equi* variou de 0 a 0,4 (resistência a 6 classes de antimicrobianos). Porém,

cinco (13%) dos 38 isolados clínicos demonstraram IRMA acima de 0,2. O maior número de isolados com resistência múltipla aos antimicrobianos ocorreu em *S. equi* subesp. *equi*. O IRMA médio foi de 0,13 para *S. equi* subesp. *equi* e de 0,07 para *S. equi* subesp. *zooepidemicus*, respectivamente.

O diâmetro médio do halo de inibição da penicilina para os isolados de *S. equi* subesp. *equi* foi de 37,00 mm (variação entre 27 a 50 mm) e de *S. equi* subesp. *zooepidemicus* foi de 34,75 mm (variação entre 25 a 50 mm). As amostras de qualidade *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. equi* subesp. *equi* demonstraram diâmetro do halo de inibição da penicilina de 20, 30 e 34 mm, respectivamente.

A CIM e CBM média de benzilpenicilina foram de 0,0095 µg/mL e 0,0267 µg/mL para *S. equi* subesp. *equi* e de 0,0128 µg/mL e 0,0380 µg/mL para *S. equi* subesp. *zooepidemicus*. A análise de regressão linear ( $\hat{Y} = -0,00012 + 2,94849x$ ) estabeleceu relação entre a CIM e CBM nas 22 amostras classificadas fenotipicamente como *S. equi* subesp. *equi* ( $p < 0,05$ ;  $R^2 = 78,9\%$ ). A CIM e o diâmetro do halo de inibição da penicilina em milímetros (mm) tiveram relação nas amostras de *S. equi* subesp. *equi* ( $\hat{Y} = 0,03638 - 0,00072x$ ) ( $p < 0,05$ ;  $R^2 = 59,2\%$ ).

Desta mesma forma, a CBM e o diâmetro do halo de inibição da penicilina em mm relacionaram-se para as duas subespécies de *S. equi*. Pode-se inferir que na equação de regressão linear, a cada um mm de aumento no diâmetro do halo de inibição da penicilina, reduz a CBM em 0,00223 µg/mL e 0,00271 µg/mL para *S. equi* subesp. *equi* e *S. equi* subesp. *zooepidemicus*, respectivamente (Fig.1).

A origem geográfica das amostras diferiu para valores da CIM de benzilpenicilina, e mostrou que os isolados da região Central, Planalto e Sul do estado do Rio Grande do Sul foram semelhantes, aproximadamente 0,010 µg/mL, mas diferentes quando comparados à amostra oriunda do estado do Paraná, 0,075 µg/mL (Fig.2).

A CIM<sub>50</sub> de benzilpenicilina foi de 0,0093 µg/mL tanto para as amostras de *S. equi* subesp. *equi*, quanto para *S. equi* subesp. *zooepidemicus*. A CBM<sub>50</sub> de benzilpenicilina foi de 0,0187 µg/mL e 0,0375 µg/mL para *S. equi* subesp. *equi* e *S. equi* subesp. *zooepidemicus*, respectivamente. A CIM<sub>90</sub> de benzilpenicilina e a CBM<sub>90</sub> de benzilpenicilina foram de 0,0187 µg/mL e 0,0750 µg/mL, respectivamente para as duas subespécies de *S. equi*. A distribuição de frequência mostrou diferença para valores de CIM de benzilpenicilina em *S. equi* subesp. *equi* e *S. equi* subesp. *zooepidemicus* (Fig.3).

A CIM e CBM das amostras utilizadas como controle de qualidade foram respectivamente 0,60 µg/mL e 1,20 µg/mL para *Escherichia coli*; 0,0187 µg/mL e 0,0750 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e 0,0046 µg/mL e 0,0046 µg/mL *S. equi* subesp. *equi*.

A análise estatística não demonstrou relação entre as raças dos animais, o IRMA, a procedência dos estabelecimentos e os biotipos das amostras estudadas.

## DISCUSSÃO

De acordo com a classificação das colônias, o padrão C das colônias de *S. equi* subesp. *zooepidemicus* foi uniforme. No entanto, para os isolados de *S. equi* subesp. *equi*, o padrão de colônias foi variável, o que confirma que esta característica fenotípica não pode ser utilizada para diferenciar estas subespécies (Timoney 2004).

Lindsay et al. (2009) relataram a relação entre a lise do ácido hialurônico com bacteriófagos carreadores de genes integrados ao cromossoma das bactérias em amostras de *S. equi* subesp. *zooepidemicus*. Chanter et al. (1999) e Holden et al. (2009) sugeriram que *S. equi* subesp. *zooepidemicus*, *in vitro*, têm baixo nível de expressão do gene codificador da cápsula de ácido hialurônico, o que pode justificar porque os isolados de *S. equi* subesp. *zooepidemicus* apresentaram o padrão de colônias mais secas e espalhadas.

A variação do perfil fermentativo em cepas de *S. equi* mostra limitações da caracterização fenotípica (Grant et al. 1993), o que justifica a classificação de duas cepas de *S. equi* como atípicas, pois eram fermentadoras de lactose.

Os estudos sobre a susceptibilidade antimicrobiana de bactérias patogênicas a equinos são clinicamente relevantes. A coleta de dados locais sobre a susceptibilidade aos antimicrobianos é o primeiro passo para a utilização antimicrobiana prudente (Weese et al. 2008). No entanto, no Brasil, bem como na literatura internacional são raros os dados disponíveis para discussão, o que limitou a comparação dos resultados obtidos neste trabalho, apenas com dados disponíveis de outras espécies de *Streptococcus*.

Os resultados obtidos para o IRMA são relevantes, pois segundo Krumperman (1983) índices acima de 0,2 podem ser potencial fonte de transmissão de genes de resistência. Uma vez que distintos genes de resistência são frequentemente agrupados, a transferência

horizontal de um único elemento genético pode resultar em aquisição pelas bactérias receptoras de múltipla resistência (Poole 2005,). A resistência a múltiplos antimicrobianos em bactérias isoladas de eqüinos aumenta o risco de falhas terapêuticas, além disso, os custos para os proprietários de cavalos tornam-se elevados devido à prolongada hospitalização e uso de antimicrobianos caros (Weese et al. 2008).

A classe dos aminoglicosídeos é comumente usada no tratamento de infecções bacterianas (Mckenzie 2004), entretanto, a resistência bacteriana a esta classe é relativamente comum devido à transferência por plasmídeos (Spinosa, 2006). Embora na teoria os aminoglicosídeos possam ser utilizados, a maior resistência de *S. equi* observada às classes de antimicrobianos que apresentam elementos móveis pode estar atribuída ao desenvolvimento de vários mecanismos para neutralizar a ação dos agentes antimicrobianos (Sweeney et al 2005). O mais comum é a inativação enzimática do fármaco, modificação ou substituição deste, ativação do efluxo e redução da assimilação. A resistência natural dos *S. equi* subesp. *equi* frente aos aminoglicosídeos pode ser explicada pela natureza microaerófila deste microrganismo, uma vez que a entrada deste antimicrobiano na parede bacteriana é dependente de oxigênio (Prescott & Baggot 1994).

A sensibilidade à penicilina encontrada em todos dos isolados do presente estudo, tanto no método de disco difusão quanto no método de microdiluição corroboraram o estudo realizado por Trolldenier et al. (2000) e Sweeney et al. (2005) que demonstraram a sensibilidade aos antimicrobianos pertencentes à classe dos beta-lactâmicos (benzilpenicilina, ampicilina, oxacilina e cefotaxime) em 100% dos 191 isolados de *S. equi*, oriundos de eqüinos. Também um estudo realizado na Escola Veterinária de Ontario, no Canadá, mostrou que 97% dos isolados clínicas de *S. equi* foram sensíveis a penicilina (Weese et al. 2008). Penicilina e sulfazotrim são usualmente utilizadas como fármacos de primeira escolha para o tratamento de infecções por *S. equi* em eqüinos (Luque et al. 2006). Também foi observada sensibilidade  $\geq 90\%$  em um estudo sobre o tratamento de sinusites e infecções das bolsas guturais em eqüinos (Clark et al. 2008), o que ratifica o resultado encontrado no presente trabalho. Este dado é contrastante com as declarações dos médicos veterinários clínicos de falhas nos tratamentos de adenite equina (comunicação pessoal) quando utilizam penicilina, antimicrobiano de eleição. Isto pode ser atribuído às considerações de Yelle (1987) de que a utilização da terapia antimicrobiana após a formação dos abscessos nos linfonodos dos eqüinos pode prolongar o curso da infecção e dificultar a cura. Também as concentrações da penicilina em produtos comerciais bem como condutas terapêuticas inapropriadas, podem

justificar as discrepâncias dos resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* frente às amostras de *S. equi*.

Ainda na classe dos beta-lactâmicos, pode-se observar que ocorreu uma resistência de 8% a oxacilina e amoxicilina, este fato pode estar relacionado ao espectro de ação desses antimicrobianos. Prescott (2004) relata que a combinação de espectro, fármacos inibidores de beta-lactamases e o aumento da eficiência podem estar relacionados à resistência adquirida a estes antimicrobianos.

Alerta-se que possam ocorrer interações entre antimicrobianos, principalmente de natureza farmacodinâmica, por exemplo, o efeito sinérgico derivado da combinação das penicilinas e aminoglicosídeos (Saraiva et al. 1997, Lopardo 2007). Por isso, é importante que o médico veterinário respeite os parâmetros como a susceptibilidade do agente infectante, propriedades farmacocinéticas do medicamento e toxicidade potencial antes da administração de antimicrobianos, o que pode justificar falhas nos tratamentos (Prescott 2004).

A resistência das subespécies de *S. equi* à classe das fluorquinolonas foi inferior a observada nos isolados clínicos deste gênero bacteriano da Escola Veterinária de Ontario, no Canadá (33%) e pelo Instituto Nacional de Veterinária de Uppsala na Suécia (100%) (Weese et al. 2008). Este fato pode ser explicado pelas diferenças nas populações estudadas. Ressalta-se a menor relevância destes resultados na terapia de infecções produzidas por *S. equi*, uma vez que a enrofloxacin deve ser evitada em potros devido aos efeitos adversos, como artropatias, nessa faixa etária bem como atividade limitada para esse gênero bacteriano (Yoon et al. 2004).

A maior frequência dos isolados resistentes à tetraciclina ocorreu no grupo do *S. equi* subesp. *zooepidemicus*; este resultado foi ao encontro dos obtidos por Clark et al. (2008) no Canadá, onde observaram que 26,7% dos isolados de *S. equi* subesp. *zooepidemicus* eram resistentes a tetraciclina. Lopardo (2007) observou resistência de 72,4% de amostras de *S. agalactiae* isoladas de humanos frente à tetraciclina num trabalho realizado na Argentina. A utilização das tetraciclinas em eqüinos tem sido evitada devido à tendência de supressão da microbiota intestinal normal e à superinfecção com *Salmonella* ou *Clostridium difficile* (Prescott 2004).

A CIM e CBM são parâmetros amplamente utilizados na avaliação da susceptibilidade antimicrobiana, normalmente estão relacionadas com a farmacocinética e estimativa de dosagem do fármaco para avaliação dos organismos resistentes ou susceptíveis aos antimicrobianos (Prescott & Yielding 1990).

Segundo o CLSI não existe um número de *breakpoints* para a interpretação de CIM e CBM de benzilpenicilina para *S. equi*. De acordo com o CLSI (2009), valores de CIM  $\leq 0,12$   $\mu\text{g/mL}$  para estreptococos beta-hemolítico os classifica como sensíveis à penicilina. Portanto, os resultados obtidos através do método de disco difusão foram confirmados pela CIM de benzilpenicilina, assegurando a correlação dos resultados. Em outro estudo, Tracy et al. (2001) avaliaram a susceptibilidade de 44 isolados de *S. milleri* frente à penicilina; CIM  $\leq 0,12$   $\mu\text{g/mL}$  confirmaram a sensibilidade desta espécie a este antimicrobiano. No entanto, Heffelfinger et al. (2000) interpreta como sensível quando a CIM for  $\leq 1,00$   $\mu\text{g/mL}$  de penicilina para *Streptococcus pneumoniae*. Pesquisa envolvendo *Enterococcus faecalis*, demonstrou sensibilidade à penicilina para valores entre 1,2 - 4,8  $\mu\text{g/mL}$  (Zimmermann et al. 1971). Os valores de benzilpenicilina na CIM<sub>50</sub> = 0,0093  $\mu\text{g/mL}$  foram aproximadamente três vezes inferior às concentrações relatadas por Breiman & Silverblatt (1986), onde um isolado humano de *S. equi* requereu uma CIM = 0,025  $\mu\text{g/mL}$  para penicilina. Portanto, constatou-se que os valores CIM e CBM de benzilpenicilina para *S. equi* foram inferiores quando comparados aos outros estudos.

Cabe ressaltar que os níveis de resistência são sempre definidos em relação às concentrações do soro baseados nos *breakpoints* propostos pelo NCCLS, contudo não dizem respeito a concentrações do antimicrobiano no sítio da infecção (Fong & Drlica 2008). Segundo Firth et al. (1986) as concentração plasmáticas máximas e mínimas de penicilina variaram de 1,86 a 0,4  $\mu\text{g/mL}$ , também variando com a via de aplicação e tempo após administração (valores 200 e 45 vezes superiores) aos obtidos na CIM média de benzilpenicilina para *S. equi* neste estudo.

Dados de resistência que não se referam a hospital/estabelecimento de criação devem ser interpretados com cautela. Uma vez que a cultura e teste de susceptibilidade não são normalmente realizados, antes de um tratamento inicial; os dados publicados na literatura científica são em geral baseados em infecções refratárias previamente tratadas com um ou mais antimicrobianos. Além disso, a maioria dos estudos é baseada em cavalos que estão sendo assistidos em hospitais, o que torna mais provável que tenham recebido tratamento antimicrobiano e, portanto, transportem bactérias resistentes. Estes viéses de seleção tendem a sobrevalorizar os níveis reais de resistência antimicrobiana e têm de ser considerados para uma interpretação correta dos dados sobre a prevalência da resistência. Diferenças metodológicas (métodos e critérios utilizados para a medição e definição de resistência) também devem ser consideradas quando se comparam os resultados comunicados por diferentes laboratórios. Da mesma forma, é importante analisar, sobretudo a partir de

diferentes países, como tais diferenças podem ser avaliadas a partir das variações observadas (Weese et al. 2008).

Por fim, a utilização prudente e racional dos antimicrobianos deve ser considerada como uma importante questão ética na profissão veterinária, principalmente relacionada aos regimes de dosagens e administração adequada de cada fármaco. A abordagem global e os princípios básicos preconizados por organizações internacionais para minimizar o possível impacto do uso de antimicrobianos em animais sobre saúde pública são: a prevenção de doenças como uma ferramenta para reduzir o uso de antimicrobianos; diagnóstico preciso e teste de susceptibilidade antimicrobiana; justificativa para o uso de antimicrobianos; escolha de um produto antimicrobiano e via de administração adequados; posologia adequada; aspectos éticos relacionados à prescrição e fornecimento de medicamentos antimicrobianos (Guardabassi & Kruse. 2008).

## CONCLUSÃO

Os caracteres fenotípicos convencionais demonstram limitação para discriminar entre as subespécies dos isolados.

A resistência múltipla aos antimicrobianos dos isolados representa um risco potencial para a saúde dos animais, pois pode dificultar o tratamento e uma ameaça à saúde pública.

Todos os isolados de *S. equi* foram sensíveis à penicilina e sulfazotrim.

Foi possível estabelecer relação entre a concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima e o diâmetro do halo de inibição da penicilina para isolados de *S. equi*.

**Agradecimentos.-** A CAPES e CNPq, pela bolsa concedida e suporte financeiro; aos colaboradores do LABAC/UFSM, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho; a Doutora Mariana Sá e Silva, pelo auxílio com o manuscrito e a Doutora Luciana Pötter, pelo suprimento com as análises estatísticas.



## REFERÊNCIAS

- Clinical and laboratory standards institute (CLSI) - Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S19. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement. Wayne. 77p.
- Breiman R.F. & Silverblatt F.J. 1986. Systemic *Streptococcus equi* Infection in a Horse Handler - A Case of Human Strangles. West J. Med. 145:385-386.
- Chanter N., Ward C.L., Talbot N.C., Flanagan J.A., Binns M., Houghton S.B., Smith K.C. & Mumford J.A. 1999. Recombinant hyaluronate associated protein as a protective immunogen against *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus* challenge in mice. Microb. Patho. 27:133-143.
- Clark C., Greenwood S., Boison J.O., Trejo M.C. & Dowling P.M. 2008. Bacterial isolates from equine infections in Western Canadá (1998–2003). Can. Vet. J. 49:153–160.
- Clinical and laboratory standards institute (CLSI). 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, document M7-A6. Approved Standard. 6th ed. Wayne. 53p.
- Facklam R. 2002. What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin. Microb. Rev. 15:613-630.
- Feary D.J., Hyatt D., Traub J.D., Roach S., Jones R.L, Wu C.C. & Morley P.S. 2005. Investigation of falsely reported resistance of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolates from horses to trimethoprim–sulfamethoxazole. J. Vet. Diagn. Invest. 17:483-486.
- Firth E.C., Nouws J.F., Driessens F., Schmaetz P., Peperkamp K., Klein W.R. 1986. Effect of the injection site on the pharmacokinetics of procaine penicilin G in horse. Am. J. Vet. Res. 47:2380-2384.
- Frong I.W. & Drlica K. 2008. Antimicrobial resistance and implications for the twenty-first century. Springer, New York. 407p.

- Grant S.T., Efstratiou A. & Chanter N. 1993. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. Vet. Rec. 133:215-216.
- Guardabassi L., Jensen L.B., & Kruse H. 2008. Guide to antimicrobial use in animals. Blackwell Publishing. Oxford. 223p.
- Harrington D.J., Sutcliffe I.C. & Chanter N. 2002. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. Microbes. Infec. 4:501-510.
- Heffelfinger J.D., Dowell S.F., Jorgensen J.H., Klugman K.P., Mabry L.R., Musher D.M., Plouffe J.F., Rakowsky A., Schuchat A. & Whitney CG. 2000. Management of community-acquired pneumonia in the era of pneumococcal resistance: a report from the Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. Arch. Intern. Med. 160:1399-1408.
- Holden M.T., Heather Z., Paillot R., Steward K.F., Webb K., Ainslie F., Jourdan T., Bason N.C., Holroyd N.E., Mungall K., Quail M.A., Sanders M., Simmonds M., Willey D., Brooks K., Aanensen D.M., Spratt B.G., Jolley K.A., Maiden M.C., Kehoe M., Chanter N., Bentley S.D., Robinson C., Maskell D.J., Parkhill J. & Waller A.S. 2009. Genomic Evidence for the Evolution of *Streptococcus equi*: Host Restriction, Increased Virulence, and Genetic Exchange with Human Pathogens. PLoS. Pathog. 5(3)e1000346. Epub.
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. & Winn Jr. W.C. 2001. Diagnóstico microbiológico. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1465p.
- Kuwamoto Y., Anzay T. & Wada R. 2001. Microplate sugar-fermentation assay distinguishes *Streptococcus equi* from other streptococci of Lancefield's group C. J. Equine Vet. Scie. 12:47-49.
- Krumperman P.H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Appl. Environ. Microbiol. 46:165-70.
- Lancefield R.C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J. Experiment. Med., 57:571-595.
- Lindsay A.M., Zhang M., Mitchell Z., Holden M.T., Waller A.S., Sutcliffe I.C. & Black G.W. 2009. The *Streptococcus equi* prophage-encoded protein SEQ2045 is a hyaluronan-specific hyaluronate lyase that is produced during equine infection. Microbiology. 155:443-9.

- Lopardo H. 2007. Antimicrobial resistance in  $\beta$ -hemolytic streptococci in Argentina. *Commun. Curr. Res. Educat. Top. Tre. Appl. Microbiol.* 2:794-798.
- Luque I., Fernández-Garrayzabal JF., Blume V., Maldonado A., Astorga R., Tarradas C. 2006. Molecular typing and anti-microbial susceptibility of clinical isolates of *Streptococcus equi* spp. *zooepidemicus* from equine bacterial endometritis. *J. Vet. Med. B.* 53:451-454.
- McKenzie H.C. & Murray M.J. 2004. Concentrations of gentamicin in serum and bronchial lavage fluid after once-daily aerosol administration to horses for seven days. *Am. J. Vet. Res.* 65:173-178.
- Murari A.L, Carvalho F.H. & Heinzmann B.M. 2008. Composição e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Senecio crassiflorus* var. *crassifloru*. *Quim. Nova.* 31:1081-1084.
- National committee for clinical laboratory standarts (NCCLS). 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Ninth Informational Supplement M100-S9. 19:104.
- Prescott J.F. 2004. Antimicrobial Chemoterapy, p.26-43. In: Hirsh D.C., MacLachalan N.J. & Walker R.L. *Veterinary Microbiology*. 2th ed. Backwell Pubblishing, Iowa.
- Prescott J.F. & Baggot J. D. 1994. *Antimicrobial therapy in medicine veterinary*. 2th ed. Blackwell, Iowa. 612p.
- Prescott J.F. & Yieldin K.M. 1990. In vitro Susceptibility of Selected Veterinary Bacterial Pathogens to Ciprofloxacin, Enrofloxacin and Norfloxacin. *Can. J. Vet. Res.* 54:195-197.
- Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemotherapy.* 56:20-51.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. & Carter G.R. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, London. 648p.

- Saraiva I.H., Jones R.N., Erwin M. & Sader H.S. 1997. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de 87 amostras clínicas de enterococos resistentes à vancomicina. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 43:217-222.
- Statistical analysis system user's guide: statistics, version 8.2. (SAS). 2001. Statistical Analysis System Institute, Cary. 1686p.
- Spinosa H.S., Górnaiak S.L., Bernardi M.M. 2006. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 4th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 897p.
- Sweeney C.R., Timoney J.F., Newton J.R., Hines M.T. 2005. *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. *J. Vet. Intern. Med.* 19:123-134.
- Timoney J.F., Artiushin S.C. & Boschwitz J.S. 1997. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-Like SeM and SzPSe. *Infect. Immunv.* 65:3600-3605.
- Timoney J.F. 2004. The pathogenic equine streptococci. *Vet. Res.* 35:397-409.
- Tracy M., Wanahita A., Shuhatovich Y., Goldsmith E.A., Clarridge J.E. & Musher D.M. 2001. Antibiotic susceptibilities of genetically characterized *Streptococcus milleri* group strains. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45:1511-1514.
- Trolldenier H., Klarmann D., Krabisch P., Rohde J., Steiner A. & Verspohl J. 2000. Sensitivity of bovine and equine streptococci to beta-lactam antibiotics (benzylpenicillin, ampicillin, oxacillin, cefotaxime) in the agar diffusion and E-test. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 113:234-245.
- Yelle M.T. 1987. Clinical aspects of *Streptococcus equi* infection. *Equine Vet. J.* 19:158-162.
- Yoon J.H., Brooks Jr. R.L., Khan A., Pan H., Bryan J., Zhang J., Budsberg S.C., Mueller P.O.E., Halper J. 2004. The effect of enrofloxacin on cell proliferation and proteoglycans in horses tendon cells. *Cell. Biol. Toxicol.* 20:41-54.
- Waller A.S. & Jolley K.A. 2007. Getting a grip on strangles: recent progress towards improved diagnostics and vaccines. *Vet. J.* 173:492-501.

Wess J.S., Baptiste K. E., Baverude V. & Toutain P.L. 2008. Guidelines for antimicrobial use in horses. p. 161-182. In: Guardanassi L., B., Kruse H. Guide to antimicrobial use in animals. Blackwell Publishing, Oxford.

Zimmermann R.A., Moellering Jr. R.C. & Weinberg A.N. 1971. Mechanism of resistance to antibiotic synergism in enterococci. *J. Bacteriol.* 105:873-879.



AMOST	BETA - LAC.							AMINOGL.				FLU	LIN	PRO	MAC		POL	RIF	SUT	TET	IRMA
	A	A	C	C	I	P	O	A	E	G	N	ENO	LIN	CLO	ERI	AZI	POL*	RIF	SUT	TET	
	M	M	F	F	M	E	X	M	S	E	E										
40 <sup>b</sup>	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,10
41 <sup>c</sup>	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	0,20

Legenda: AMOST = amostra; <sup>e</sup> = 1 ao 22 (*S. equi* subesp. *equi*); <sup>z</sup> = 23 ao 38 (*S. equi* subesp. *zooepidemicus*); <sup>a</sup> = *Escherichia coli*\_ATCC 25922; <sup>b</sup> = *Staphylococcus aureus*\_ATCC 25923; <sup>c</sup> = *S. equi* subesp. *equi*\_ATCC 39506; BETA – LAC = beta-lactâmicos; AMINOGL.= aminoglicósidos; FLU = fluoroquinolonas; LIN = lincosamidas; PRO = propanodiol; MAC = macrolídeos; POL = polimixinas; RIF = rifamicinas; SUT = sulfamidas; TET = tetraciclina; IRMA = índice de resistência múltipla aos antimicrobianos; AMO = amoxicilina; AMP = ampicilina; CFE = cefalexina; CFL = cefalotina; IMP = imipenem; OXA = oxacilina; PEN = penicilina; AMI = amicacina; EST = estreptomicina; GEN = gentamicina; NEO = neomicina; ENO = enrofloxacina; LIN = lincomicina; CLO = cloranfenicol; ERI = eritromicina; AZI = azitromicina; POL\* = polimixina B; RIF = rifampicina; SUT = sulfazotrim; TET = tetraciclina; R = resistente; I = intermediário, S = sensível.

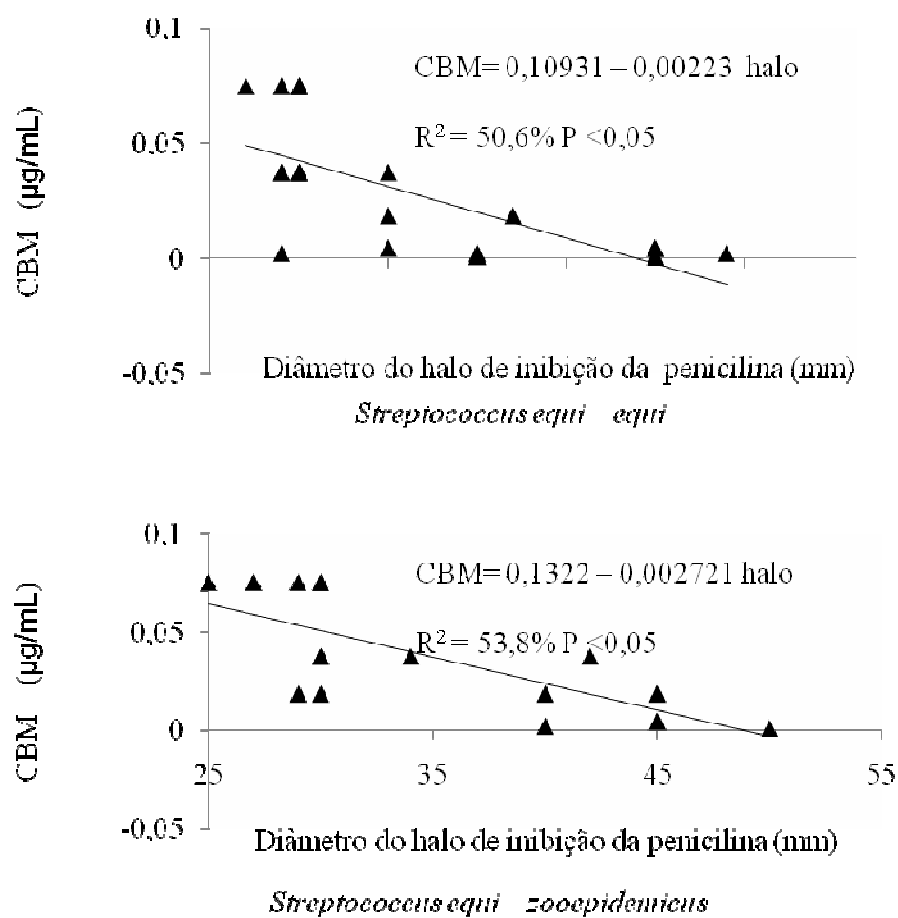


Figura 1 - Representação gráfica da relação entre CBM e o diâmetro do halo de inibição da penicilina em milímetros para as subespécies de *Streptococcus equi*.



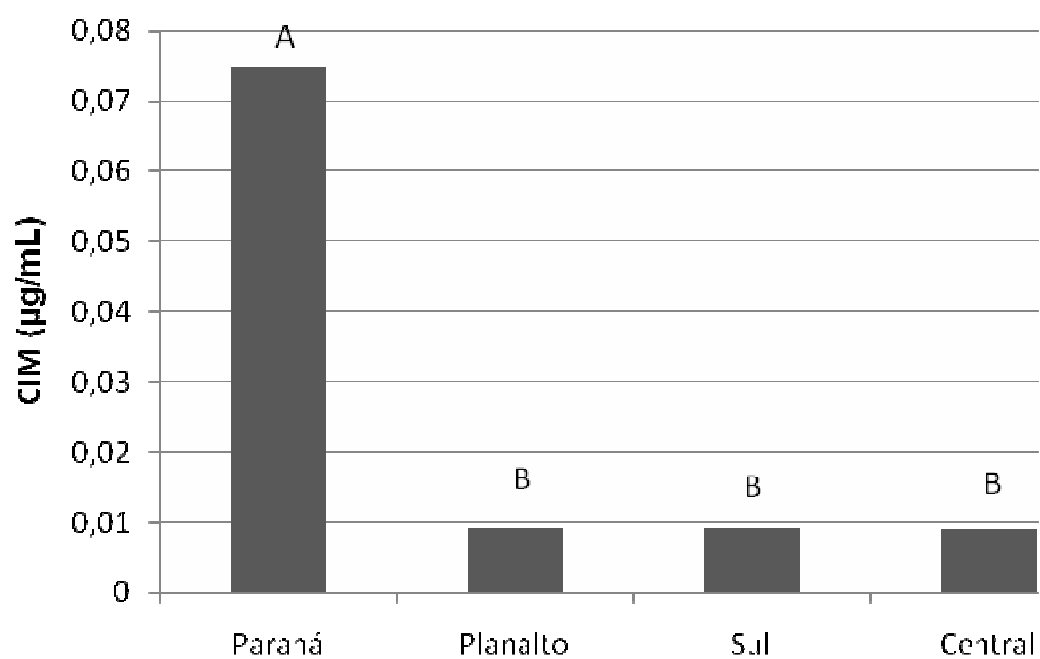
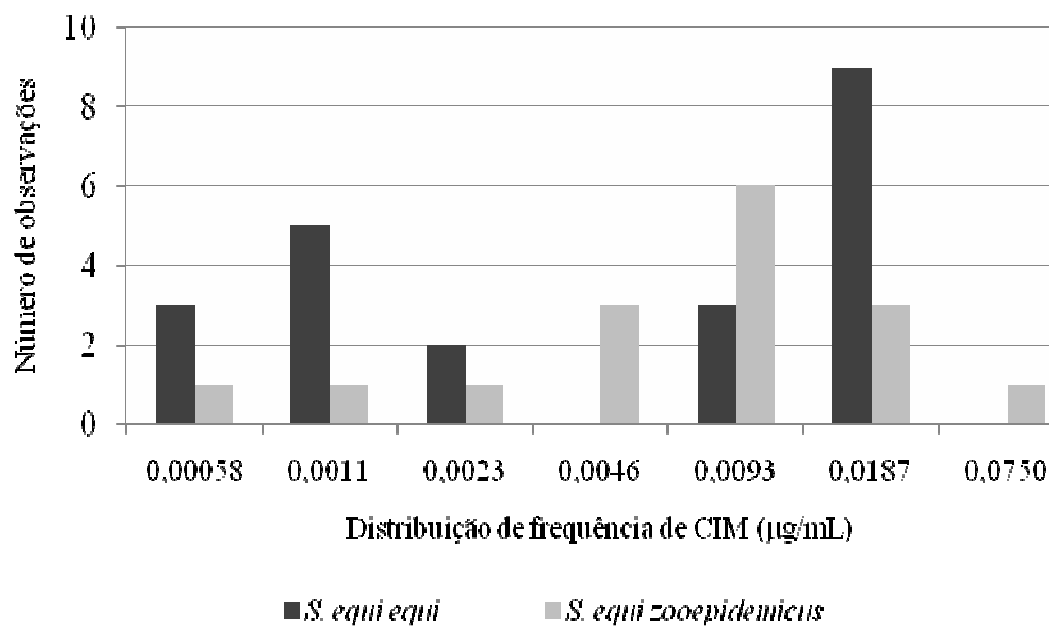


Figura 2 - Relação entre a origem geográfica dos isolados de *Streptococcus equi* e os valores da concentração inibitória mínima - CIM de benzilpenicilina ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3 - Distribuição de frequência da concentração inibitória mínima (CIM) da benzilpenicilina frente aos isolados de *Streptococcus equi* subesp. *equi* e *Streptococcus equi* subesp. *zooepidemicus*.**

## 4 CAPÍTULO 2

### Phylogenetic relationships in the *Streptococcus equi* subspecies based on partial *hsp60* gene sequences

Kirinus JK<sup>1</sup> & Vargas APC<sup>1\*</sup>

#### Abstract

The species *Streptococcus equi* is taxonomically subdivided in two subspecies, *Streptococcus equi equi* and *S. equi zooepidemicus*. The use of molecular markers to differentiate and/or establish the phylogenetic relationships between these two subspecies is an alternative to the traditional phenotypic characterization by biochemical methods, whose results are not always reliable. Thus, this study tests the applicability of the *hsp60* gene sequences in the identification of the *S. equi* subspecies and evaluates underlying evolutionary patterns. In general, the two subspecies were not revealed to be reciprocally monophyletic, and some isolates belonging to each of them presented highly differentiated sequences. Thus, although *hsp60* partial sequences were not effective in differentiating *S. equi* subspecies, it raised the question if these lineages are monophyletic at all.

**Keywords:** Phylogeny; *Streptococcus equi*; *hsp60*; gene; Bayesian analysis.

#### 1. Introduction

The genus *Streptococcus* belongs to the family Microcaceae and is important from the clinical veterinary standpoint [1]. *Streptococcus equi* subspecies *equi* is the causative agent of equine strangles, a highly contagious respiratory disease in equines [2].

---

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, nº 1000, Sala 5137, Prédio 44, Camobi, Santa Maria, Brasil. \*Autor para correspondência: [agueda.vargas@gmail.com](mailto:agueda.vargas@gmail.com)

*Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* is an opportunistic commensal that may produce equine disease only in stress situations [3]. Rapid differentiation between these subspecies is thus greatly required to prevent death of the infected animals and spreading of the disease. On the other hand, the establishment of the phylogenetic relationships between these lineages is important to provide clues about molecular synapomorphies shared by them, which is a fundamental step for the development of multifunctional vaccine strategies.

*Streptococcus equi* subsp. *equi* is phenotypically and genetically related to *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, although these were considered different species until 1984 [4]. Nowadays, *S. equi* subsp. *equi* is believed to have evolved from a *S. equi* subsp. *zooepidemicus* ancestral [5]. Another microorganism related to *S. equi* is *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, a secondary contaminant often isolated from clinical samples [3].

Due to the problems related to the phenotypical differentiation between the *S. equi* subspecies [6], molecular methods of characterization have been increasingly used [7,8,9]. In this context, the partial sequencing and analysis of the chaperonin gene *hsp60* (60 kDa *heat shock protein*) has been proved effective for identification of enteric pathogens [10], whereas the rRNA16S and *rnpB* markers have been employed to characterize the phylogenetic relationships in the genus *Streptococcus* [11].

The present study utilized *hsp60* partial sequences with the aim of assisting in the development of diagnosis protocols while characterizing the evolutionary relationships between both *S. equi* subspecies. Although the marker has not been proved to be effective in differentiating the subspecific samples, it revealed interesting evolutionary patterns.

## 2. Results

The phylogeny resulting from the Bayesian analysis conducted based on the sequences of the *hsp60* gene showed two main clades, A and B (Figure 1), both with significant statistical support. Clade A showed a basal polytomy in which 11 *S. equi equi* isolates presented unresolved relationships with three *S. equi zooepidemicus* isolates. In clade A, a cluster grouping eight *S. equi zooepidemicus* isolates was also formed (PP = 1.00). At contrast, clade B evidenced an unexpected phylogenetic affinity between sequences obtained for two *S. equi* samples (one *S. equi equi* and another *S. equi zooepidemicus*) and the *S. dysgalactiae* sequences.

The distance analysis (Table 1) revealed that the *S. equi zooepidemicus* sequences grouped in clade A1 presented nucleotide distances that varied between 0.00 and 0.02 among each other. Small nucleotide divergence values were also found between the basal polytomic sequences, which were essentially similar with the main exceptions of *S. equi zooepidemicus* sample 1 and *S. equi equi* samples 3 and 10. However, for clade A as a whole, nucleotide distances varied from 0.00 to 0.06. This pattern contrasts with the high levels of divergence observed in the comparisons involving the two main clades (A versus B). In this case, the *S. equi zooepidemicus* sample 6 presented a mean nucleotide distance of 0.18 against clade A, while for sample *S. equi equi* 7 this value reached 0.35. On the other hand, *S. equi zooepidemicus* sample 6 was highly similar to *S. dysgalactiae*, with mean divergence values of 0.02 and 0.00 at nucleotide and amino acid levels, respectively.

### 3. Discussion

Since the publication of the paper by Woese (1987) [12], the 16S RNA has become the most utilized molecule in the establishment of phylogenetic relationships between microorganisms. However, some authors have underlined this gene's limitations as a tool in phylogenetic and taxonomic analysis, since it generally evolves through slow evolutionary rates [11] and may present several copy variants in the genomes of different microorganisms [13.9].

In an attempt to find other markers that may be used in the phylogenetic analysis and in the diagnosis protocols of microorganisms, chaperonins have been considered an effective alternative [14]. Chaperonins are conserved proteins responsible for the maintenance of essential cell functions such as protein packaging, occurring in practically all organisms [15]. Among the different chaperonins identified to date, HSP60 is a heat shock protein associated to stress [10]. Wong & Chow (2002) [10] showed that *hsp60* could be highly discriminatory for enteric pathogen species identification, whereas Mikkonen et al. (2004) [14] demonstrated the usefulness of this gene as a marker to the phylogenetic reconstruction of samples of the *Helicobacter* genus.

Nevertheless, in the present study the variation levels of the *hsp60* gene were not afford to greatly clarify the evolutionary history of some *Streptococcus* samples, since a great deal of the isolates did not present effectively resolved relationships given their high

similarity values. In fact, some sequences obtained from both subspecies present mainly overlapping genetic distances at the intra and inter-subspecific level, which may be indicative of a recent divergence event. Related to this, the phylogeny obtained did not allow clear differentiation of the two subspecies. Nevertheless, the marker was able to cluster eight of the 12 *S. equi zooepidemicus* isolates, with statistical confidence, whereas other three *S. equi zooepidemicus* isolates were essentially similar to *S. equi equi* sequences. This finding allows hypothesizing that the accrual of new regions of the gene may perhaps lead to higher resolution levels, since the present study examined only a 500-bp interval of the of the *hsp60* gene coding region. However, the possibility that these subspecies are not highly differentiated at molecular level or even that they may not perform reciprocally monophyletic lineages should not be left aside. In this sense, the subdivision of *S. equi zooepidemicus* into distinct genogroups, one of which was almost identical with *S. equi equi* strains, was also previously reported for the 16S and the *sodA* markers [9].

On the other hand, the *hsp60* phylogenetic patterns revealed the presence of two *S. equi* isolates belonging to both subspecies that clustered to *S. dysgalactiae* sequences. As previously reported [9], samples with *S. dysgalactiae equisimilis* can be co-infected with *S. equi equi* or *S. equi zooepidemicus*. The concomitant infection by different combinations of these three pathogens allied to the possibility of genetic exchange provides plausible explanations as regards the obtained results, although the occurrence of convergent phenotypic patterns in the *Streptococcus* species should also be taken into account. In this sense, this study raises the question if these subspecies are monophyletic at all.

#### **4. Conclusion**

The present paper evaluates the applicability of the *hsp60* gene as a tool for the taxonomical and phylogenetic discrimination of *S. equi* isolates. In spite of the occurrence of members of the Micrococcaceae family that are genetically and phenotypically very similar, the development of efficient differentiation methods regarding this family is a tool of fundamental importance in clinical veterinary practice. The results here obtained indicate the need for more studies in order to analyze a larger region or even to assess the applicability of other markers so as to shed new light on the non-resolved evolutionary patterns, which would confirm or not the actual degree of genetic differentiation between these subspecies.

## 5. Material and methods

### 5.1. Identification of isolates

Twenty clinical isolates collected between 1993 and 2008 in the southern region of Brazil were used. Each isolate was identified according to the fermentation biotype of lactose, sorbitol and trehalose [6] (Table 2). Isolates identified as *S. equi equi* did not ferment none of these carbohydrates (biotype I), whereas those identified as *S. equi zooepidemicus* fermented sorbitol and lactose (biotype II). Additionally, there were some atypical samples of *S. equi equi* that fermented only lactose (biotype III).

### 5.2. DNA analysis

Genomic DNA was extracted according to the glass pearl protocol from *S. equi* cultures grown in BHI (Brain Heart Infusion Broth) [16].

The PCR used to amplify a 600-bp fragment of the *hsp60* gene followed the protocol described in Silva et al. (2007) [17]. The amplicons obtained were purified using polyethylene glycol (PEG-800) and sequenced in an automatic MEGABACE500 sequencer.

### 5.3. Sequence analysis

The obtained chromatograms were assembled and analyzed using the Staden Package [18]. These contigs were further joined to previously available GenBank (NCBI) sequences of *S. dysgalactiae equisimilis*, *S. dysgalactiae dysgalactiae* and *S. pyogenes* (Table 2), and the multiple alignment of the matrix was carried out using the ClustalW algorithm as implemented in the MEGA 4.1 software [19]. *S. pyogenes* was used as the outgroup [17].

The pairwise distances between the sequences were obtained using Kimura's two-parameter model [20]. The phylogenetic relationships between sequences were reconstructed using a Bayesian analysis carried out in the MrBayes 3.1.2 program [21] using the model indicated by the AIC test [22] conducted in MrModeltest 2.2 [23]. In this case, 20,000,000 generations were evaluated, with samplings every 1,000 and burning the first 25% of samples. Confidence of each clade was assessed according to the respective posterior probability.

## 6. Acknowledgements

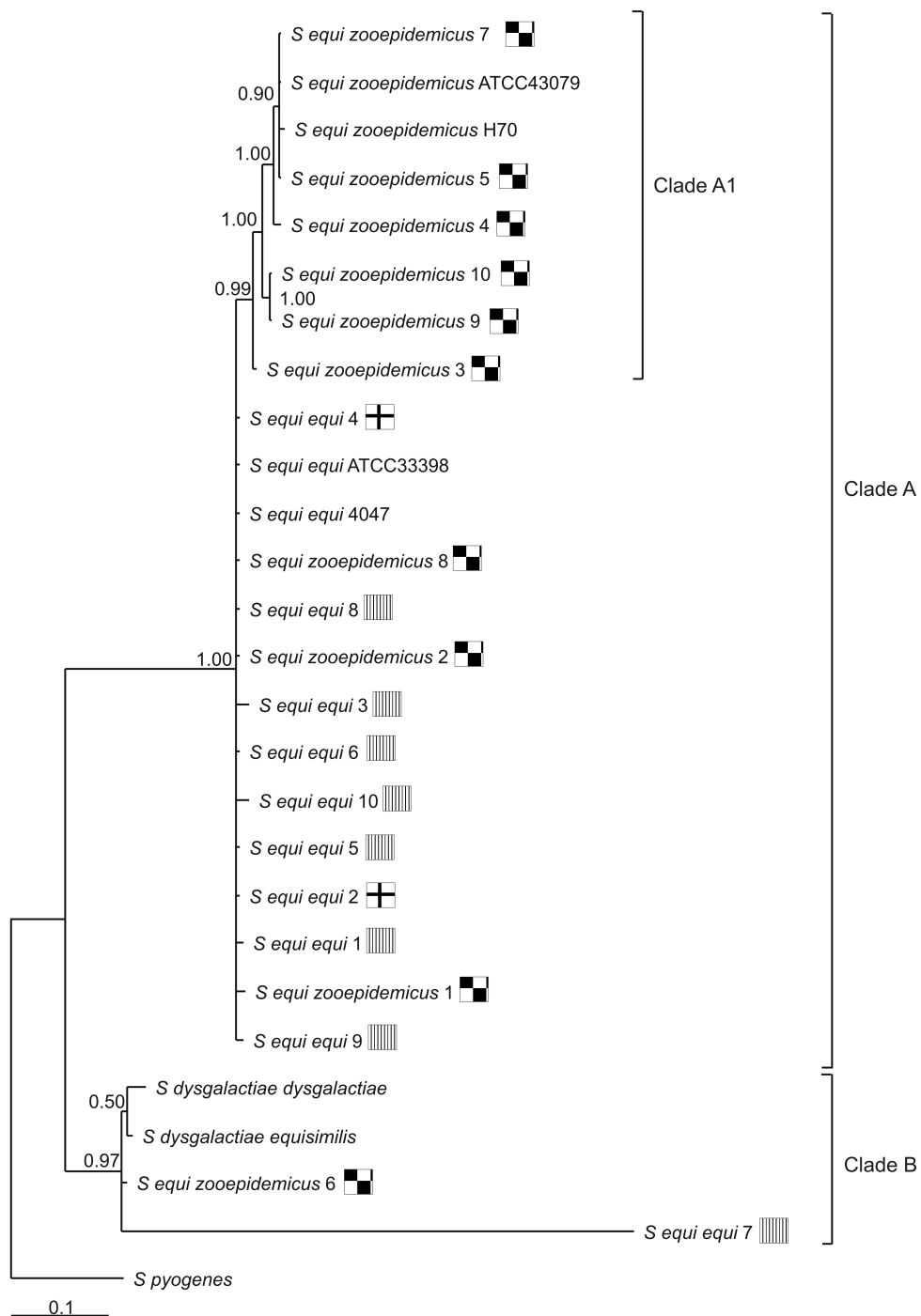
The authors thank the team at the Laboratory of Bacteriology - UFSM, RS, Brazil. This study was supported by grants provided by the Brazilian Agencies CAPES and CNPq.

## 7. References

- [1] Quinn PJ et al. Clinical Veterinary Microbiology. Spain: Wolfe; 1994.
- [2] Timoney JF. Artiushin SC. Boschwitz JS. Comparison of the Sequences and Functions of *Streptococcus equi* M-Like SeM and SzPSe. Infect Immun 1997; 65(9):3600-05.
- [3] Timoney JF. The pathogenic equine streptococci. Vet Res 2004; 35:397-409.
- [4] Facklam R. What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev 2002; 15(4):613-30.
- [5] Holden MTG et al. Genomic Evidence for the Evolution of *Streptococcus equi*: Host Restriction, Increased Virulence, and Genetic Exchange with Human Pathogens. PLoS Pathog 2009; 5(3). Epub 2009 Mar 27.
- [6] Grant ST et al. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. Vet Rec 1993; 133(9):215-16.
- [7] Ladlow J. Scase T. Waller A. Canine Strangles Case Reveals a New Host Susceptible to Infection with *Streptococcus equi*. J Clin Microbiol 2006; 44(7):2664-65.
- [8] Kelly C et al. Sequence Variation of the SeM Gene of *Streptococcus equi* Allows Discrimination of the Source of Strangles Outbreaks. J Clin Microbiol 2006; 44(2):480-86.
- [9] Baverud V. Johansson SK. Aspan A. Real-time PCR for detection and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Vet. Microbiol. 2007; 124:219-229.
- [10] Wong RSY. Chow AW. Identification of enteric pathogens by heat shock protein 60kDa (HSP60) gene sequences. FEMS Microbiol Lett 2002; 206:107-13.
- [11] Täpp J. Thollesson M. Herrmann B. Phylogenetic relationships and genotyping of the genus *Streptococcus* by sequence determination of the RNase P RNA gene. rnpB. Int J Syst Evol Microbiol 2003; 53:1861–71.
- [12] Woese CR. The universal ancestor. PNAS 1998; 95(12): 6854–59.



- [13] Vianez Jr JLSG. Avaliação criteriosa das seqüências dos genes *rrn*, *rpob* e *gyrb* como ferramentas em taxonomia microbiana. Dissertation. Brasil: UFRJ; 2005. 67f.
- [14] Mikkonen TP. Kärenlampi RI. Hänninen ML. Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54:753-58.
- [15] Goh SH. Potter S. Wood JO. Hemmingsen SM. Reynolds RP. Chow AW. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: Studies with coagulase-negative *Staphylococci*. *J Clin Microb* 1996; 34(4):818-23.
- [16] Sambrook R. Russel DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001. 3v.
- [17] Silva MS et al. Phenotypical assays and parcial sequencing of the *hsp60* gene for identification of *Streptococcus equi*. *Curr Microbiol* 2007; 54:331-34.
- [18] Staden R. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnology* 1996; 5:233-41.
- [19] Tamura K. Dudley J. Nei M. Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24:1596-99.
- [20] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16:111-20.
- [21] Huelsenbeck JP. Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2001; 17:754-55.
- [22] Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automat Contr* 1974; 19: 716-23.
- [23] Nylander JAA. MrModeltest - Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center. Uppsala University. 2004.



**Figure 1 - Result of the Bayesian analysis and identification of main clades (A and B) of the phylogenetic analysis of *Streptococcus equi*. The values near the internal nodes represent the posterior probability of each clade and the branch sizes are proportional to the scale given as the mean number of substitutions per site.**

**Table 1 - Distance matrix at nucleotide level (below the diagonal line) and amino acid (above the diagonal line) between each pair of *Streptococcus* spp. samples.**

	Sez7	SezATCC	SezH70	Sez5	Sez4	Sez10	Sez9	Sez3	Sez1	See2	See4	SeeATCC	See4047	Sez8	See8	Sez2	See3	See6	See10	See5	See1	See9	See7	Sez6	Sdd	Sde	Sp
Sez7		0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,22	0,04	0,04	0,04	0,05
SezATCC	0,00		0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,22	0,04	0,04	0,04	0,05
SezH70	0,00	0,00		0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,22	0,04	0,04	0,04	0,04
Sez5	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	0,02	0,02	0,23	0,04	0,04	0,04	0,05
Sez4	0,01	0,01	0,01	0,01		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	0,01	0,02	0,24	0,04	0,04	0,04	0,05
Sez10	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,22	0,04	0,04	0,04	0,05
Sez9	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,22	0,04	0,04	0,04	0,05
Sez3	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,02	0,02	0,24	0,04	0,04	0,04	0,04
Sez1	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,22	0,04	0,04	0,04	0,05
See2	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,22	0,04	0,04	0,04	0,05
See4	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,22	0,04	0,04	0,04	0,05
SeeATCC	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,22	0,04	0,04	0,04	0,05
See4047	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,22	0,04	0,04	0,04	0,05
Sez8	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,22	0,04	0,04	0,04	0,05
See8	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,22	0,04	0,04	0,04	0,05
Sez2	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,22	0,04	0,04	0,04	0,05
See3	0,04	0,04	0,05	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01		0,01	0,04	0,01	0,03	0,03	0,27	0,07	0,07	0,07	0,07
See6	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01		0,09	0,00	0,01	0,00	0,26	0,05	0,05	0,05	0,06
See10	0,05	0,05	0,05	0,04	0,06	0,04	0,04	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03		0,02	0,04	0,04	0,17	0,05	0,05	0,05	0,05
See5	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01		0,01	0,01	0,22	0,04	0,04	0,04	0,05
See1	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00		0,03	0,26	0,06	0,06	0,06	0,06
See9	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01		0,25	0,06	0,06	0,06	0,06
See7	0,34	0,34	0,34	0,36	0,35	0,36	0,36	0,37	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,39	0,37	0,31	0,35	0,37	0,36		0,22	0,22	0,22	0,23
Sez6	0,18	0,18	0,18	0,17	0,19	0,18	0,18	0,19	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,18	0,17	0,17	0,18	0,18	0,30		0,00	0,00	0,01
Sdd	0,18	0,18	0,18	0,18	0,19	0,19	0,19	0,18	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,18	0,16	0,17	0,18	0,18	0,31	0,02		0,00	0,01
Sde	0,19	0,19	0,19	0,18	0,20	0,19	0,19	0,19	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,19	0,18	0,18	0,19	0,19	0,30	0,01	0,02		0,01
Sp	0,21	0,21	0,21	0,20	0,22	0,20	0,21	0,21	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,19	0,22	0,20	0,20	0,20	0,35	0,14	0,14	0,14	

Note: See = *S. equi equi*; Sez = *S. equi zooepidemicus*; Sdd = *S. dysgalactiae dysgalactiae*; Sde = *S. dysgalactiae equisimilis*; Sp = *S. pyogenes*.

**Table 2 - Identification, origin, source and phenotypic characteristics of the *Streptococcus* spp. samples.**

SAMPLE	GENBANK ACCESSION NUMBER	RACE <sup>a</sup>	CREATION ESTABLISHMENTS	DATE <sup>b</sup>	BIO <sup>c</sup>
<i>S. equi equi</i> 1	HM031573	C	Estabelecimento 1	07/03/03	I
<i>S. equi equi</i> 2	HM031574	C	Estabelecimento 1	23/06/08	III
<i>S. equi equi</i> 3	HM031575	PSI	Estabelecimento 2	25/06/08	I
<i>S. equi equi</i> 4	HM031576	PSI	Estabelecimento 3	21/08/2008	III
<i>S. equi equi</i> 5	HM031577	PSI	Estabelecimento 4	21/05/02	I
<i>S. equi equi</i> 6	HM031578	PSI	Estabelecimento 5	10/08/07	I
<i>S. equi equi</i> 7	HM031579	PSI	Estabelecimento 4	04/07/94	I
<i>S. equi equi</i> 8	HM031580	PSI	Estabelecimento 4	18/08/94	I
<i>S. equi equi</i> 9	HM031581	BH	Estabelecimento 5	16/04/03	I
<i>S. equi equi</i> 10	HM031582	C	Estabelecimento 6	24/11/94	I
<i>S. equi zooepidemicus</i> 1	HM031583	PSI	Estabelecimento 4	24/01/94	II
<i>S. equi zooepidemicus</i> 2	HM031584	C	Estabelecimento 7	19/06/08	II
<i>S. equi zooepidemicus</i> 3	HM031585	PSI	Estabelecimento 2	28/05/03	II
<i>S. equi zooepidemicus</i> 4	HM031586	PSI	Estabelecimento 4	18/05/93	II
<i>S. equi zooepidemicus</i> 5	HM031587	PSI	Estabelecimento 8	07/91/91	II
<i>S. equi zooepidemicus</i> 6	HM031588	C	Estabelecimento 9	14/06/93	II
<i>S. equi zooepidemicus</i> 7	HM031589	PSI	Estabelecimento 10	1/07/94	II
<i>S. equi zooepidemicus</i> 8	HM031590	PSI	Estabelecimento 4	21/06/00	II
<i>S. equi zooepidemicus</i> 9	HM031591	C	Estabelecimento 1	24/03/05	II
<i>S. equi zooepidemicus</i> 10	HM031592	C	Estabelecimento 1	10/06/05	II
<i>S. equi equi</i> _ ATCC 3339	AY123646	-	-	-	-
<i>S. equi zooepidemicus</i> _ ATCC 43079	AY123645	-	-	-	-
<i>S. equi equi</i> _4047	FM 204883	-	-	-	-
<i>S. equi zooepidemicus</i> _H70	FM 204884	-	-	-	-
<i>S. dysgalactiae equisimilis</i>	AP 010935	-	-	-	-
<i>S. dysgalactiae dysgalactiae</i>	AY121363	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i>	AE004092	-	-	-	-

Notes: <sup>a</sup> Brazilian race horse; C = Native breed horse; PSI = English pure-blood horse; <sup>b</sup> Date bacteria were isolated; <sup>c</sup> Biotype of carbohydrate fermentation (Grant et al., 1999); I = *S. equi* subsp. *equi*, does not ferment trehalose, sorbitol and lactose; II = *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, does not ferment lactose and sorbitol; III = *S. equi* subsp. *equi*, atypical biochemical fermentation; (\*) Samples to be sent to GenBank (NCBI); (-) Not available.

## 5 CONCLUSÕES

Os testes fenotípicos convencionais (morfológicos e bioquímicos) induzem a erros no diagnóstico, principalmente porque as subespécies de *S. equi* são ancestralmente semelhantes.

Foi confirmada a susceptibilidade de todos os isolados de *S. equi* à penicilina e sulfazotrim, antimicrobianos de eleição para as infecções.

A resistência múltipla aos antimicrobianos dos isolados representa um risco potencial para a saúde dos animais, pois pode dificultar o tratamento e uma ameaça a saúde pública.

É possível estabelecer relação entre a concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima e o diâmetro do halo de inibição da penicilina para isolados de *S. equi*.

A seqüência parcial do gene *hsp60* não foi efetiva na discriminação entre as subespécies de *S. equi*.

Faz-se necessário buscar tecnologias mais rápidas e precisas para a determinação dos testes de diagnóstico e susceptibilidade, tendo em vista a necessidade de interferir com um diagnóstico correto e tratamento adequado em animais de alto valor zootécnico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, R. M. P. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.

ANZAI, T. et al. In vivo pathogenicity and resistance to phagocytosis of *Streptococcus equi* strains with different levels of capsule expression. **Veterinary Microbiology**, v. 67, p. 277-286, 1999.

BLANK, L. M.; HUGENHOLTZ, P.; NIELSEN, L. K. Evolution of the Hyaluronic Acid Synthesis (has) Operon in *Streptococcus zooepidemicus* and Other Pathogenic Streptococci. **The Journal of Molecular Evolution**, v. 67, p. 13-22, 2008.

CHANTER, N. et al. Characterization of the Lancefield group C *Streptococcus* 16S-23S RNA gene intergenic spacer and its potential for identification and sub-specific typing. **Epidemiology and Infection**, v. 118, n. 2, p. 125-135, 1997.

DUARTE, R. S. et al. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4214-4222, 2004.

ENSINK, J. M.; BOSCH, G.; VAN DUIJKEREN, E. Clinical efficacy of prophylactic administration of trimethoprim/sulfadiazine in a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infection model in ponies. **Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics**, v. 28, p. 45-49, 2005.

FAO. Food And Agriculture Organization Of The United Ations. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 23 out. 2009.

FACKLAM, R. What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 613-630, 2002.

FEARY, D.; J. Investigation of falsely reported resistance of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolates from horses to trimethoprim-sulfamethoxazole. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 483-486, 2005.

FERNANDEZ, E. et al. *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* subsp. nov., isolated from mastitis in small ruminants. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2291-2296, 2004.

FRONG, I. W.; DRLICA, K. Antimicrobial resistance and implications for the twenty-first century. New York: Springer, 2008. 407 p.

GALÁN, J. E.; TIMONEY, J. F. Molecular analysis of the M protein of *Streptococcus equi* and cloning and expression of the M protein gene in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 12, p. 3181-3187, 1987.

GONZALEZ-REY, C. et al. RAPD-PCR and PFGE as tools in the investigation of an outbreak of beta-haemolytic *Streptococcus* group A in a Swedish hospital. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v. 26, n. 1, p. 25-35, 2003.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guide to antimicrobial use in animals**. Oxford: Blackwell publishing, 2008. 223 p.

GRANT, S. T. et al. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. **Veterinary Record**, v. 133, n. 9, p. 215-216, 1993.

HARDIE, J. M. Genus *Streptococcus*. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p. 1043-1056.

HARRINGTON, D. J. et al. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p. 501-510, 2002.

HERWALD, H. et al. M protein, a classical bacterial virulence determinant, forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage. **Cell Press**, v. 116, n. 3, p. 367-79, 2004.

HOLDEN, M. T. G. et al. Genomic Evidence for the Evolution of *Streptococcus equi*: Host Restriction, Increased Virulence, and Genetic Exchange with Human Pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 3, 2009. Epub.

KAWATA, K. et al. Simple and rapid PCR method for identification of streptococcal species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, n. 1, p. 57-64, 2004.

KELLY, C. et al. Sequence Variation of the SeM Gene of *Streptococcus equi* Allows Discrimination of the Source of Strangles Outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 480-486, 2006.

KUWAMOTO, Y.; ANZAY, T.; WADA, R. Microplate sugar-fermentation assay distinguishes *Streptococcus equi* from other Streptococci of Lancefield's group C. **Equine Veterinary Science**, v. 12, n. 2, p. 47-49, 2001.

LADLOW, J.; SCASE, T.; WALLER, A. Canine strangles case reveals a new host susceptible to infection with *Streptococcus equi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2664-2665, 2006.

LANCEFIELD, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 57, p. 571-595, 1933.

LEVINSON, W.; JAWETZ E. A. Cocos Gram-positivos. **Microbiologia Médica**. 7 ed. São Paulo: Artmed, 2000. p.103-114.

LI, R. C. New pharmacodynamic parameters for antimicrobial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 229-235, 2000.

LISTER, P. D. Pharmacodynamics of Gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacokinetic model: impact of area under the curve/MIC ratios on eradication. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 69-74, 2002.

MORAES, C.M. **Produção e avaliação de proteína SeM recombinante para o controle de Adenite Equina**. 2008. 78 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARD (NCCLS document M7-A4). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. Vollanova: Approved standard. 1997. 414 p.

NEWTON, J. R. et al. Molecular epidemiology of *Streptococcus zooepidemicus* infection in naturally occurring equine respiratory disease. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 338-345, 2008.

NIELSEN, E. I. Semimechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model for assessment of activity of antibacterial agents from time-kill curve experiments. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 128-136, 2007.



ODENHOLT, I. et al. Suboptimal antibiotic dosage as a risk factor for selection of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: in vitro kinetic model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 518-23, 2003.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 20-51, 2005.

QUINN, P. J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**, Spain:Wolfe, 1994. 648 p.

SILVA, M. S. et al. Phenotypical assays and parcial sequencing of the *hsp60* gene for identification of *Streptococcus equi*. **Current Microbiology**, v. 54, p. 331-334, 2007.

TÄPP, J.; THOLLESSON, M.; HERRMANN, B. Phylogenetic relationships and genotyping of the genus *Streptococcus* by sequence determination of the RNase P RNA gene, *rnpB*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1861-1871, 2003.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TEIXEIRA, L. M.; TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 189-193.

TILLOTSON, G. S.; WATSON, S. J. Antimicrobial resistance mechanisms: what's hot and what's not in respiratory pathogens. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 16, n. 3, p. 155-68, 2001.

TIMONEY, J. F.; ARTIUSHIN, S. C.; BOSCHWITZ, J. S. Comparison of the Sequences and Functions of *Streptococcus equi* M-Like SeM and SzPSe. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3600-3605, 1997.

TIMONEY, J. F. The pathogenic equine streptococci. **Veterinary Research**, v. 35, p. 397-409, 2004.

TROLLDENIER, H. et al. Sensitivity of bovine and equine streptococci to beta-lactam antibiotics (benzylpenicillin, ampicillin, oxacillin, cefotaxime) in the agar diffusion and E-test. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 113, n. 6, p. 234-245, 2000.

WALKER, J. A.; TIMONEY, J. F. Molecular basis of variation in protective SzP proteins of *Streptococcus zooepidemicus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 1129-1133, 1998.

WALLER, A. S.; JOLLEY, K. A. Getting a grip on strangles: recent progress towards improved diagnostics and vaccines. **The Veterinary Journal**, v. 173, p. 492–501, 2007.

WELSH, R. D. The significance of *Streptococcus zooepidemicus* in the horse. **Equine Practice**, v. 6, p. 6-16, 1984.

**APÊNDICE 1 - Características fenotípicas das 38 amostras de *Streptococcus equi* oriundas de equinos com sinais clínicos de adenite equina.**

Número <sup>a</sup>	Amostra	Raça	Estabelecimentos de criação	Origem	Padrão de colônias	Biotipo
1	99/94	PSI	Estabelecimento 1	S	C	I
2	161/94	PSI	Estabelecimento 1	S	C	I
3	291/94	C	Estabelecimento 2	CT	C	I
4	204/02	PSI	Estabelecimento 1	CT	A	I
5	78/03	C	Estabelecimento 3	CT	A	I
6	126/03	BH	Estabelecimento 4	CT	A	I
7	566/05	C	Estabelecimento 3	CT	A	I
8	702/06	PSI	Estabelecimento 5	CT	A	I
9	732/06	PSI	Estabelecimento 1	S	A	I
10	008/07	PSI	Estabelecimento 6	S	A	I
11	171/07	C	Estabelecimento 7	CT	A	I
12	246/07	PSI	Estabelecimento 8	S	A	I
13	37/08	C	Estabelecimento 9	S	A	I
14	47/08	PSI	Estabelecimento 10	S	A	I
15	53/08	C	Estabelecimento 11	S	A	I
16	122/08	C	Estabelecimento 3	CT	B	III
17	128/08 n	PSI	Estabelecimento 12	S	A	I
18	128/08 z	PSI	Estabelecimento 12	S	C	I
19	128/08 b	PSI	Estabelecimento 12	S	B	I
20	162/08	C	Estabelecimento 13	S	A	I
21	152/08	C	Estabelecimento 14	S	A	I
22	172/08	PSI	Estabelecimento 15	S	A	III
23	17/91	PSI	Estabelecimento 16	PR	C	II
24	112/93	C	Estabelecimento 17	CT	C	II
25	96/93	PSI	Estabelecimento 1	S	C	II
26	14/94	PSI	Estabelecimento 1	S	C	II
27	97/94	PSI	Estabelecimento 18	CT	C	II
28	256/00	PSI	Estabelecimento 1	S	C	II
29	203/03	PSI	Estabelecimento 12	S	C	II
30	104/05	C	Estabelecimento 3	CT	C	II
31	169/05	C	Estabelecimento 3	CT	C	II
32	271/05	C	Estabelecimento 3	CT	C	II
33	464/05	PSI	Estabelecimento 12	S	C	II
34	554/05	PSI	Estabelecimento 15	S	C	II
35	119/08	C	Estabelecimento 19	PT	C	II
36	128/08 m	PSI	Estabelecimento 12	S	C	II
37	165/08	PSI	Estabelecimento 15	S	C	II
38	015/10	BH	Estabelecimento 18	CT	C	II

Legenda: <sup>a</sup> = número correspondente a cada amostra; PSI = cavalo puro sangue inglês; C = cavalo crioulo; BH = cavalo brasileiro de hipismo; CT = região central, PT = região planalto; S = região sul; PR = região Paraná; A = padrão A, margem inteira e cor amarela; B = padrão B, margem inteira e cor branca; C = padrão C, margem ondulada e cor branca; I = *S. equi* subesp. *equi*, não fermentador dos carboidratos trealose, sorbitol e lactose; II = *S. equi* subesp. *zooepidemicus*, fermentador de lactose e sorbitol; III = *S. equi* subesp. *equi* atípico, fermentador de lactose.

**APÊNDICE 2 - Valores obtidos com os testes de susceptibilidade de penicilina das amostras de *Streptococcus equi* e referência pelos métodos de disco difusão e microdiluição.**

Amostra	Diâmetro do halo de inibição da penicilina em mm <sup>a</sup>	CIM ug/mL	CBM ug/mL
99/94	29	0,0187	0,0750
161/94	27	0,0187	0,0750
291/94	40	0,00058	0,0011
204/02	30	0,0187	0,0750
78/03	30	0,0093	0,0375
126/03	30	0,0187	0,0750
566/05	40	0,0011	0,0011
702/06	35	0,0023	0,0046
732/06	50	0,0011	0,0046
008/07	29	0,0023	0,0023
171/07	54	0,0011	0,0023
246/07	50	0,0011	0,0046
37/08	40	0,0011	0,0023
47/08	35	0,0187	0,0375
53/08	50	0,00058	0,00058
122/08	30	0,0187	0,0375
128/08 n	29	0,0187	0,0375
128/08 z	29	0,0187	0,0375
128/08 b	30	0,0187	0,0375
162/08	35	0,0093	0,0187
152/08	50	0,00058	0,0011
172/08	42	0,0093	0,0187
17/91	30	0,0750	0,0750
112/93	30	0,0187	0,0375
96/93	40	0,0093	0,0187
14/94	25	0,0187	0,0750
97/94	29	0,0046	0,0750
256/00	27	0,0093	0,0750
203/03	45	0,0046	0,0187
104/05	42	0,0093	0,0375
169/05	30	0,0093	0,0375
271/05	34	0,0046	0,0375
464/05	50	0,00058	0,0011
554/05	30	0,0187	0,0750
119/08	29	0,0093	0,0187
128/08 m	30	0,0093	0,0187
165/08	40	0,0011	0,0023
015/10	45	0,0023	0,0046
ATCC_25922	20	0,60	1,20
ATCC_25923	39	0,0187	0,0750
ATCC_39506	34	0,0046	0,0046

Legenda: <sup>a</sup> = milímetros; CIM = concentração inibitória de benzilpenicilina; CBM = concentração bactericida de benzilpenicilina; ATCC\_25922 = *Escherichia coli*; ATCC\_25923 = *Staphylococcus aureus*; ATCC\_39506 = *S. equi* subesp. *equi*.

