

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

**COMPARAÇÃO ENTRE TESTES BIOQUÍMICOS E
ANÁLISE DA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE *hsp60*
PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE
*Streptococcus equi***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariana Sá e Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2005**

**COMPARAÇÃO ENTRE TESTES BIOQUÍMICOS E ANÁLISE
DA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE *hsp60* PARA A
IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Streptococcus equi***

por

Mariana Sá e Silva

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
2005**

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

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

**Comparação entre testes bioquímicos e análise da seqüência parcial do gene
hsp60 para a identificação de isolados de *Streptococcus equi***

Elaborada por
Mariana Sá e Silva

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Eduardo Furtado Flores, PhD. (UFSM)

Odir Antônio Dellagostin, Dr. (UFPEL)

Santa Maria, 29 de agosto 2005.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ademar e Olirdes e minha irmã Caro e minha sobrinha Marina, que apesar da enorme distância sempre se fizeram presentes, me apoiando em todas as etapas de minha vida.

A professora Agueda, que foi muito mais que orientadora desta dissertação, foi também um exemplo de pessoa e profissional, e quem despertou em mim o interesse pela pesquisa.

A todos os professores do mestrado, Rudi, Eduardo, Bayard, Agueda, que foram essenciais para minha formação e aprendizado nesta etapa importante da vida profissional.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia de Santa Maria: Dani, Niura, Lissa, Chica, Dalile, Angela, Angelo, Rodrigo, Denis, Lu, Sil, Fran, Soninha e as Super Ana e Cris, por todos os momentos vividos, de trabalho e de amizade.

Ao Mateus, que foi um excelente amigo e professor, me ajudando e orientando em todas as etapas na execução deste trabalho.

A Dani, Posse e Marcelo, que muito mais que colegas de Pós-graduação, foram amigos de todas as horas, fundamentais para enfrentar todos os problemas e foram o incentivo crucial nos momentos de desânimo.

Ao Dan, que foi o amigo, companheiro, meu amor e conselheiro de todas as horas, servindo de apoio e auxílio para todos os momentos da minha vida.

RESUMO

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

COMPARAÇÃO ENTRE TESTES BIOQUÍMICOS E ANÁLISE DA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE *hsp60* PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Streptococcus equi*

AUTOR: MARIANA SÁ E SILVA

ORIENTADOR: AGUEDA CASTAGNA DE VARGAS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de agosto de 2005.

Streptococcus equi subesp. *equi* é o agente etiológico da adenite equina. Outros agentes pertencentes ao mesmo grupo, como *S. equi* subesp. *zooepidemicus* são frequentemente isolados de animais com sinais de adenite, podendo originar diagnósticos equivocados. As diferenças bioquímicas são pequenas para as subespécies de *S. equi*, enquanto o potencial virulento é muito diferenciado, havendo, portanto, necessidade de uma correta diferenciação entre os isolados. O presente trabalho teve como objetivo realizar a comparação fenotípica e molecular de isolados de *S. equi*, obtidos de casos de adenite equina, pela análise de seqüências parciais do gene *hsp60*. De 26 amostras de *Streptococcus* sp. analisadas, 18 foram bioquimicamente identificadas como *S. equi* subesp. *equi*, cinco como *S. equi* subesp. *zooepidemicus*, dois isolados *S. dysgalactiae* subesp. *equisimilis* e para um isolado não foi possível determinar a espécie. Pela análise das seqüências, 21 isolados foram identificados como *S. equi* subesp. *equi* e cinco como *S. equi* subesp. *zooepidemicus*. Dentre os isolados utilizados, quatro apresentaram divergência entre os métodos utilizados. A análise de seqüências do gene *hsp60* possui um bom poder discriminatório e pode ser um importante método auxiliar na diferenciação de isolados de *Streptococcus equi*, especialmente para isolados com padrão atípico de fermentação de açúcares.

Palavras-chave: *Streptococcus equi*, *hsp60*, caracterização, identificação.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Postgraduate Program in Veterinary Medicine
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

A COMPARISON BETWEEN BIOCHEMICAL TEST AND THE PARTIAL ANALYSIS OF SEQUENCES OF THE HSP60 GENE FOR THE IDENTIFICATION OF *Streptococcus equi* ISOLATES

AUTHOR: Mariana Sá e Silva

ADVISER: Agueda Palmira Castagna de Vargas

Data and place of the defense: August, 29th, 2005, Santa Maria

Streptococcus equi is the etiological agent of strangles. Opportunistic agents from the same group are frequently isolated from horses with strangles and may induce mistake diagnostic. Among the subspecies of *S. equi* the phenotypic characteristics are almost undistinguishable; however the pathogenic potential is widely differentiated. The objective of this study was to determine the phenotypic and molecular characteristics of *S. equi* isolates obtained from samples of clinical cases of strangles by sequencing the *hsp60* gene. By phenotypical assays 26 strains of *Streptococcus* sp. were identified, 18 were characterized as *S. equi* subsp. *equi*, five as *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, two as *S. dysgalactiae* subsp., *equisimilis*, and one as *Streptococcus* sp.; However using molecular characterization, 21 isolates were identified as *S. equi* subsp. *equi* and five as *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. The analysis of the *hsp60* sequence is a good discriminatory tool and can be useful as a method of differentiation, principally for the characterization of atypical isolates.

Key-words: *Streptococcus equi*, *hsp60*, characterization, identification

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Celsius
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Mistura de desoxirribonucleotídeos (A, C, G e T)
Kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
nmol	nanomolar
M	Molar
min	minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pb	pares de base
pH	Potencial de hidrogênio
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Unidade
v	Volume
µg	Micrograma
µl	Microlitro

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	Fatores de virulência e patogenicidade de <i>Streptococcus</i> sp. do grupo C de Lancefield em animais	45
ANEXO B	Características fenotípicas de <i>Streptococcus</i> sp. do grupo C de Lancefield	46
ANEXO C	Alinhamento das seqüências de <i>hsp60</i> de <i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i> e <i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i> obtidas no GenBank	47

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	7
LISTA DE ANEXOS	8
SUMÁRIO	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. Revisão de Literatura	13
2.1 - <i>Streptococcus</i> sp.	13
2.1.1 - <i>Streptococcus equi</i> subesp. <i>equi</i>	14
2.1.2 - <i>Streptococcus equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	16
2.1.3 - <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subesp. <i>equisimilis</i>	17
2.1.4 - <i>Streptococcus equi</i> subesp. <i>ruminatorum</i>	17
2.2 - Adenite eqüina	18
2.3 - Chaperonina HSP60	21
2.4 - Métodos descritos para a identificação de <i>S. equi</i>	22
3. Capítulo 1 - A comparison between biochemical test and the partial analysis of sequences of the <i>hsp60</i> gene for the identification of <i>Streptococcus equi</i>	25
Abstract.....	27
Introduction.....	28
Materials and Methods.....	29
Bacterial isolates.....	29
Phenotypic characterization.....	29
Molecular characterization.....	29
Results and Discussion.....	30
Acknowledgements.....	32
Reference.....	32
TABLE 1	36
4. CONCLUSÃO	37

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
6. ANEXOS.....	45

1. INTRODUÇÃO

A criação de eqüinos no Brasil é uma atividade em crescimento constante, apresentando um plantel de 5,9 milhões de animais (FAO, 2002), que gera empregos e renda para a população. O elevado número de animais, associado à necessidade de produção crescente, gera um aumento no número de enfermidades, levando a prejuízos econômicos significativos para a atividade.

Dentre as enfermidades que afetam eqüinos, o segundo grupo com maior prevalência são as associadas ao trato respiratório, que afetam animais de diversas habilidades, implicando em importantes perdas no rendimento, gastos com o tratamento, e em alguns casos, morte. Entre as enfermidades respiratórias que afetam eqüinos, as mais freqüentes são causadas por agentes bacterianos, como a adenite eqüina, responsável por aproximadamente 30% das notificações de enfermidades em eqüinos em todo o mundo (CHANTER et al., 1997a).

A adenite eqüina é uma doença infecto-contagiosa aguda caracterizada por inflamação mucopurulenta do trato respiratório superior dos eqüinos (SCHILD et al., 2001). É causada pela bactéria β -hemolítica *Streptococcus equi* subesp. *equi* do grupo C Lancefield. Também pertencem a esse grupo, o *S. equi* subesp. *zooepidemicus* e *S. dysgalactiae* subesp. *equisimilis*, microrganismos relacionados geneticamente, porém com potencial patogênico muito diferenciado e freqüentemente isolados de amostras clínicas como contaminantes secundários (TIMONEY, 2004).

A diferenciação fenotípica entre essas subespécies é pequena e tradicionalmente realizada através de testes de fermentação de açúcares como lactose, trealose e sorbitol (KUWAMOTO et al., 2001; QUINN et al., 1994). Entretanto, relatos da existência de cepas de *S. equi* subesp. *equi* atípicas com diferentes padrões de fermentação podem gerar diagnósticos errôneos (GRANT et al., 1993). Devido aos problemas relacionados com a diferenciação fenotípica dessas subespécies, são conhecidos vários métodos moleculares de caracterização, como seqüenciamento de regiões intergênicas do gene 16S-23S (CHANTER et al., 1997b), polimorfismo de DNA através de RAPD-PCR (DUARTE et al., 2004) e eletroforese em campo pulsado (PFGE) associada a técnicas de RAPD (GONZALEZ-REY et

al., 2003), entre outros. Considerando que os métodos citados nem sempre apresentam um grau de diferenciação satisfatória entre as subespécies, o seqüenciamento parcial do gene da chaperonina HSP60 (WONG, et al., 2002) é uma alternativa importante a ser estudada para a realização do diagnóstico diferencial entre subespécies de *S. equi*.

As chaperoninas são famílias de proteínas conservadas, responsáveis pela manutenção de funções celulares essenciais a vida, como o empacotamento protéico. As chaperoninas da família HSP, como as Hsp60 utilizadas neste trabalho, são proteínas de choque térmico associadas ao estresse, também conhecidas como “heat shock proteins” (FINK, 1999).

Com base na semelhança fenotípica e genotípica das subespécies de *S. equi* e suas importantes diferenças na patogenicidade, este trabalho teve por objetivo relatar a utilização da análise da seqüência parcial do gene *hsp60* na caracterização de isolados identificados bioquimicamente como *Streptococcus equi*. A técnica de análise da seqüência parcial do gene *hsp60* pode permitir o diagnóstico seguro, a fim de orientar a adoção de medidas eficazes para o controle e prevenção da enfermidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Streptococcus* sp.

O *Streptococcus* sp. e *Enterococcus* sp. abrangem os cocos gram-positivos catalase negativos mais importantes em medicina humana e animal. São heterogêneos quanto ao ambiente que são isolados, pois estão presentes na flora normal do corpo humano e animal, principalmente nas vias aéreas superiores e aparelho digestivo (BROOKS et al., 2000). Esses agentes possuem metabolismo fermentativo que gera como produto final o ácido lático a partir de glicose. São classificados sorologicamente através de características antigênicas de um polissacarídeo de composição variável, denominado carboidrato C, detectável por técnicas imunológicas. A classificação sorológica de *Streptococcus* spp. nos grupos de Lancefield se baseia nesse polissacarídeo e é designado por letras do alfabeto de A até V (TEIXEIRA & TRABULSI, 2004). O grupo C de Lancefield é dividido em três espécies, baseado na hemólise e capacidade de fermentação de sorbitol e trealose. *Streptococcus dysgalactiae* subesp. *equisimilis*, beta hemolítico, não fermenta sorbitol e fermenta trealose; *Streptococcus equi*, beta hemolítico, não fermenta sorbitol nem trealose; e *Streptococcus zooepidemicus*, beta hemolítico, fermenta sorbitol e não fermenta trealose.

Os componentes do grupo C de Lancefield produzem uma cápsula de ácido hialurônico, mais evidente em culturas jovens, com objetivo de impedir a fagocitose. A parede celular contém antígenos M, T, R, carboidratos específicos para cada grupo sorológico, e peptidoglicanos. Muitos possuem fímbrias compostas em parte por proteína M e recobertas por ácido lipoteicoico, com função de fixação (BROOKS et al., 2000).

O carboidrato grupo-específico da parede celular é responsável pelo agrupamento dos *Streptococcus* spp. em grupos sorológicos de Lancefield. A especificidade sorológica do carboidrato é determinada por um amino açúcar, que para *Streptococcus* spp. do grupo C é ramnose-N acetilgalactosamina (BROOKS et al., 2000).

As bactérias do gênero *Streptococcus* patogênicas para equinos incluem *S. equi* subesp. *equi*, o agente da adenite equina, *S. equi* subesp. *zooepidemicus*, importante agente

causador de metrite e doenças respiratórias, e o *S. dysgalactiae* subesp. *equisimilis*, agente pouco freqüente, causador de linfadenite e placentite. Todos estes microrganismos pertencem ao grupo C de Lancefield (TIMONEY, 2004).

2.1.1. *Streptococcus equi* subesp. *equi*

O *Streptococcus equi* subesp. *equi*, é um agente β -hemolítico pertencente ao grupo C Lancefield, envolvido nos casos de adenite eqüina. É fenotipicamente e geneticamente relacionado com *S. equi* subesp. *zooepidemicus*, sendo até 1984 considerados espécies distintas. Entretanto, após estudos de homologia de DNA, demonstrou-se sua semelhança genética e fenotípica e as espécies forma reclassificadas formando *S. equi* subesp. *equi* e *S. equi* subesp. *zooepidemicus* (FACKLAM et al., 2002; EUZÉBY, 2005). A análise de regiões intergênicas do rRNA entre 16S-23S sugere que *S. equi* subesp. *equi* seja um biovar originado de *S. equi* subesp. *zooepidemicus* (CHANTER et al., 1997b; FACKLAM et al., 2002; TIMONEY, 2004).

O *S. equi* subesp. *equi* causa doença somente em membros da família *Equidae*, nunca tendo sido relatado casos de infecções em humanos. Por este fato, a distribuição do agente e da enfermidade está relacionada à população de eqüinos (TIMONEY et al., 1993b). Além dos casos típicos de adenite, foram relatados casos de encefalites em eqüinos causadas por infecções disseminadas de *S. equi* subesp. *equi* (GOEHRING et al., 2005).

Esse agente possui fatores de virulência que auxiliam na patogenia da enfermidade, como a cápsula de ácido hialurônico, hialuronidase, estreptolisinas, estreptoquinases e a proteína M antifagocítica (HARRINGTON et al., 2002).

A cápsula de ácido hialurônico é um polímero de alta massa molecular, formado por resíduos de N-acetilglucosamina e ácido glicurônico, conferindo o aspecto mucoso às colônias produtoras dessa estrutura, e um maior potencial de virulência a isolados que a produzem (TIMONEY 1993a; TIMONEY, 2004). Culturas jovens de *S. equi* subesp. *equi* têm uma maior quantidade de cápsula e são mais virulentas que culturas velhas, nas quais a cápsula não está presente em grandes quantidades, demonstrando o potencial virulento dessa estrutura (ANZAI et al., 1999; HARRINGTON et al., 2002). A hialuronidase é uma enzima com aproximadamente 55 kDa de massa molecular, com atividade na penetração nas mucosas do hospedeiro e difusão tecidual (HARRINGTON et al., 2002).

A proteína M antifagocítica é uma molécula ácido-resistente com aspecto de fímbria que se projeta a partir da parede celular bacteriana. Apresenta entre 50 e 60 nm de comprimento (TIMONEY 1993a) foi clonada e expressa em *Escherichia coli* em 1987 por Galan & Timoney.

A estreptolisina O, produzida por agentes dos grupos A, C e G de Lancefield, é uma proteína de 53 kDa altamente antigênica (TIMONEY, 1993a). É o peptídeo responsável pela hemólise beta produzida por *S. equi* subesp. *equi* e *S. equi* subesp. *zooepidemicus*. A ligação da estreptolisina O nos eritrócitos leva à formação de poros na membrana, produzindo lise osmótica celular (FLANAGAN et al., 1998; TIMONEY, 2004). Além da ação hemolítica em eritrócitos, a estreptolisina O é tóxica para outras células como polimorfonucleares, células do miocárdio e plaquetas (TIMONEY 1993a).

A estreptoquinase produzida pelo *S. equi* subesp. *equi* interage com o plasminogênio equino para formar plasmina ativa, que hidrolisa fibrina. A ação de lise da fibrina auxilia a disseminação e invasão tecidual pelo agente (TIMONEY, 2004).

O peptidoglicano que forma a parede celular tem atividade pirógena pela indução de citocinas pirogênicas como interleucina 6 e o fator de necrose tumoral de leucócitos, sendo o responsável pelos sinais de hipertermia observados em animais com sinais clínicos de adenite equina. Esse componente age ainda como ativador da rota alternativa do complemento, levando às alterações patológicas encontradas na enfermidade (TIMONEY, 1993a).

A enzima superóxido dismutase (SOD), que converte ânions superóxido em peróxido de hidrogênio e água, foi identificada em *S. equi*. Esse processo de detoxificação contribui para a habilidade do microrganismo em sobreviver dentro de células fagocíticas (POYART et al., 1998).

A aquisição de nutrientes por *S. equi* é realizada por um conjunto de enzimas como as fosfatases ácidas, que hidrolisam fosfomonoésteres em pH ácido, e outras enzimas extracelulares, capazes de degradar diferentes substratos como fibrinogênio, gelatina e caseína. Além das enzimas, *S. equi* apresenta um sistema de transportadores ABC (ATP-binding cassette) que são sistemas de busca de nutrientes para a bactéria (HARRINGTON et al., 2002).

Uma nova proteína chamada CNE (collagen-binding protein), que pode ser um novo fator de virulência para *S. equi*, foi descrita, tendo sido encontrada em isolados de *S. equi* subesp. *equi* e *S. equi* subesp. *zooepidemicus*. Essa proteína possui a capacidade de se ligar ao colágeno em soluções de forma específica (LANNERGARD et al., 2003).

2.1.2. *Streptococcus equi* subesp. *zooepidemicus*

Apesar da grande homologia de DNA entre *S. equi* subesp. *equi* e *S. equi* subesp. *zooepidemicus*, existem grandes diferenças quanto à patogenicidade. O *S. equi* subesp. *zooepidemicus* é um importante agente zoonótico para humanos que são eventualmente infectados através do contato com eqüinos portadores (TIMONEY, 2004). Esse agente é freqüentemente isolado de eqüinos saudáveis, causando pneumonias e outras enfermidades leves do trato respiratório superior. *S. equi* subesp. *equi* possui um maior impacto econômico por seu maior potencial patogênico para eqüinos (WELSH, 1984; KOWALSKI, et al., 2000). O agente já foi isolado de suínos e macacos na Indonésia causando poliartrite, broncopneumonia, pleurite, epicardite, endocardite e meningite (SOEDARMANTO, 1996; SALASIA et al., 2004) e também da nasofaringe de camelos saudáveis e enfermos no Kenya e Somália (YOUNAN et al., 2005).

O *S. equi* subesp. *zooepidemicus* é um microrganismo comensal das tonsilas e mucosa da nasofaringe de eqüinos saudáveis. Entretanto está associado a enfermidades do trato respiratório em potros, eqüinos jovens e pneumonia pós-transporte em adultos (OIKAWA et al., 1995), sendo também associado à formação de abscessos pulmonares (LAVOIE et al., 1994). Pode ainda ser isolado de animais com pleuropneumonia, endometrite, septicemia neonatal e mastite. Eqüinos adultos que morrem de pneumonia associada ao transporte freqüentemente apresentam *S. equi* subesp. *zooepidemicus* em culturas de lesões pulmonares, o que demonstra sua associação com enfermidades respiratórias. Entretanto não é evidente se o agente é causador primário ou um contaminante secundário (RADOSTITS et al., 2002).

S. equi subesp. *zooepidemicus* e *Rhodococcus equi* são os agentes mais isolados de casos de pneumonia em potros, sendo encontrados em culturas puras ou como parte de uma infecção mista (LÉGUILLETTE, 2002). Pneumonia por *S. equi* subesp. *zooepidemicus* é a principal causa de mortes em animais entre 32 e 180 dias de vida no Texas (COHEN, 1994) e a morbidade em Ontário, Canadá, chega a 71% em potros (HOFFMAN, 1993)

Os sinais clínicos da infecção do trato respiratório inferior de potros por *S. equi* subesp. *zooepidemicus* são tosse, febre leve, corrimento nasal mucopurulento e aumento da freqüência respiratória (RADOSTITS et al., 2002).

Já foram relatados casos em humanos de sepse multifocal, artrite séptica, endocardite (LEE & DYER, 2004) e meningite estreptocócica (DOWNAR, 2001) e surtos de glomerulonefrite (NICHOLSON et al., 2000), todos associados ao contato com eqüinos.

2.1.3. *Streptococcus dysgalactiae* subesp. *equisimilis*

O *Streptococcus dysgalactiae* subesp. *equisimilis* é um agente beta-hemolítico pertencente ao grupo C Lancefield, porém com baixa homologia de DNA com as espécies *S. equi* subesp. *equi* e *S. equi* subesp. *zooepidemicus*. São habitantes normais da pele e superfícies mucosas. Podem ser isolados de placentas de fetos abortados e raramente de abscessos em linfonodos. A patogenia é pouco entendida e as infecções por estes agentes são raras e oportunistas (TIMONEY, 2004).

S. dysgalactiae subesp. *equisimilis* foi reclassificado em duas subespécies, *S. dysgalactiae* subesp. *equisimilis* e *S. dysgalactiae* subesp. *dysgalactiae*, que não é β -hemolítico mas pertence ao mesmo grupo C de Lancefield (KAWATA et al., 2003). Esse agente já foi envolvido em casos de mortalidade de peixes no Japão, em 2004 (NOMOTO et al., 2004), e casos de faringite aguda em crianças (BISNO et al., 1996; ZAOUTIS et al., 2004). Também foi identificado em suínos abatidos com endocardite, linfadenite e poliartrite (KAWATA et al., 2003).

2.1.4. *Streptococcus equi* subesp. *ruminatorum*

A partir de novembro 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*. As características bioquímicas são teste positivo para glicose, lactose e sorbitol e negativo para trealose (FERNANDEZ et al., 2004).

2.2 Adenite eqüina

A adenite eqüina é uma doença contagiosa aguda caracterizada por inflamação mucopurulenta do trato respiratório superior dos eqüinos, conhecida popularmente como garrotinho, devido às manifestações clínicas de aumento de volume na região do pescoço, formando um “garrote” no animal afetado (SHILD et al., 2001). Possui distribuição mundial e é responsável por perdas econômicas importantes, considerando-se os custos com tratamento, medidas de controle e eventuais perdas de animais (WALLACE et al., 1995). Dentre os casos de enfermidade infecciosas de eqüinos que são notificadas ao International Collating Centre, 30% são casos de adenite eqüina (CHANTER et al., 1997a). A enfermidade é conhecida desde 1251 e o agente causal foi identificado pela primeira vez em 1873, sendo posteriormente utilizado para a reprodução da doença em eqüinos, em 1888 (WILKENS, 1994). A infecção é fatal em apenas 10% dos casos, e a morte ocorre por disseminação dos abscessos ou por púrpura hemorrágica, causada pelo acúmulo de complexos formados por anticorpos e a proteína M (CHANTER et al., 2000).

O período de incubação varia de 3 a 14 dias e os animais apresentam febre, apatia, descarga nasal, inicialmente mucosa progredindo para mucopurulenta, tosse, anorexia, dificuldade de deglutição e edema submandibular, dificultando a respiração (TIMONEY et al., 1993b). O curso clínico é de duas a quatro semanas, com recuperação espontânea da maioria dos animais após drenagem do conteúdo dos abscessos (SCHILD, 2001). A transmissão ocorre por contato direto nasal ou oral, ou indireto, através de aerossóis, fômites contaminados e insetos. Alguns fatores podem aumentar o risco de infecção, como o frio, falta de higiene nas instalações e o excesso de animais (TIMONEY et al., 1993a).

S. equi penetra pela boca ou narinas e a bactéria se adere a receptores específicos em células das criptas das tonsilas e linfonodos adjacentes. Em poucas horas, o organismo atinge os linfonodos regionais, onde se multiplica no meio extracelular. O peptidoglicano da parede celular ativa o componente C3 do complemento que atrai neutrófilos para o local. A falha destas células em fagocitar e destruir estas bactérias parece ser devido a uma combinação da cápsula de ácido hialurônico e a proteína M. A ação antifagocítica da proteína M ocorre pela inibição do fator H do complemento e pela ligação com o fibrinogênio, o que impede o reconhecimento da bactéria como estranha pelo sistema imune do hospedeiro (TIMONEY, 1993a).

Outros fatores como estreptolisina e estreptoquinase contribuem para a formação dos abscessos. À medida que estes progridem, há formação de edema submandibular devido à

obstrução do fluxo de fluido linfático. O processo de destruição de fagócitos atrai outras células inflamatórias que fagocitam algumas bactérias e são destruídas por outras, levando à formação de pus em um processo contínuo que pode ter várias resoluções (BROOKS et al, 2000).

Na maioria dos casos da enfermidade, o animal apresenta apenas aumento dos linfonodos, com formação de abscessos e rápida resolução sem auxílio terapêutico. Aproximadamente 20% dos eqüinos afetados permanecem portadores crônicos, disseminando o agente por vários meses e servindo como uma importante fonte de infecção na população (NEWTON et al., 2000).

A disseminação do agente via linfática ou hematogena pode levar à formação de abscessos bastardos em cavidades (abdominal e torácica), podendo, em casos menos freqüentes, atingir o cérebro (RADOSTITS et al., 2002). KOL et al., (2003) relataram a ocorrência de dois casos de adenite bastarda em Israel. O primeiro caso foi de um poney de um ano de idade com a presença de uma massa de 18 cm x 10 cm na cavidade torácica, caudal ao coração, que resultou na morte do animal. O segundo caso relatado ocorreu em um potro de 15 meses, onde foi relatada a presença de um abscesso de 25 cm de diâmetro na cavidade abdominal, próxima ao reto, que após a drenagem apresentou uma redução no tamanho e recuperação do animal. A causa da disseminação do agente ainda é desconhecida, entretanto suspeita-se que a inadequada antibioticoterapia em eqüinos com secreção nasal e aumento de volume nos linfonodos pode contribuir para a ocorrência desses casos (KOL et al., 2003). Os sinais clínicos apresentados pelos animais com abscessos bastardos variam de acordo com o tamanho e localização dos abscessos. O agente pode ainda atingir válvulas cardíacas, cérebro, olhos, articulações e bainhas tendinosas (RADOSTITS et al., 2002).

Quadros de púrpura hemorrágica têm sido descritos em eqüinos com exposição prévia a *S. equi* subesp. *equi* que apresentam altos títulos de anticorpos contra a proteína M de *S. equi*. Os eqüinos com púrpura apresentam infartos na musculatura esquelética, pele, trato gastrointestinal, pâncreas e pulmão. Lesões histológicas como vasculite leucocitoclástica e necrose aguda coagulativa são descritas para estes casos (KAESE et al., 2005).

Além de casos de adenite bastarda e púrpura hemorrágica, os eqüinos afetados podem desenvolver complicações mais brandas e não fatais, tais como miocardites, celulite purulenta, hemiplegia laríngea e empiema de bolsas guturais (PRESCOTT & WRIGHT, 2000)

Aproximadamente 75% dos eqüinos desenvolvem sólida e duradoura imunidade à adenite eqüina que parece ser mediada por IgG e IgA produzidas na mucosa local. O colostro

de éguas que se recuperaram da doença contém IgG e IgA, fornecendo assim (se ingerido nas primeiras 24 horas de vida) proteção aos potros até o período de desmame. Acredita-se que a proteína M seja o principal antígeno protetor de *S. equi* (JACOBS et al., 2000).

O diagnóstico é geralmente realizado de acordo com os sinais clínicos e também pela demonstração do agente em esfregaço de exsudato nasal ou pus. A confirmação é feita pelo isolamento e cultura de *S. equi* a partir do material proveniente das lesões ou órgãos afetados (SCHILD, 2001).

O tratamento é indicado nos casos em que o animal apresenta sinais sistêmicos de infecção como febre, depressão e alterações no hemograma entretanto ainda não apresenta os sinais de aumento de volume nos linfonodos. O *S. equi* subesp. *equi* é muito sensível à penicilina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e lincomicina. O tratamento deve ser realizado de 5-10 dias, com penicilina (18.000 a 22.000 UI/kg) ou trimetoprim associado à sulfa (20 mg/kg) (PRESCOTT & WRIGHT, 2000).

Vacinas utilizadas para adenite equina são constituídas de proteína M e têm sido associadas a reações adversas como edema e aumento de volume dos linfonodos regionais em 72% dos casos. Também são relatados sinais sistêmicos como artrite, laminite e letargia em 24% (SMITH, 1994). As vacinas inativadas como Strepguard TM[®] (Bayer) e a Strepvax II[®] (Boehringer Ingelheim) são administradas via intramuscular com reforço anual. Essas vacinas geralmente não resultam em uma completa proteção por não levarem a um estímulo antigênico eficiente sem a formação de imunidade na nasofaringe (PRESCOTT & WRIGHT, 2000).

Tendo em vista que a imunidade local é a mais importante para a proteção contra o agente, uma vacina atenuada de *S. equi*, Pinnacle TM[®] (Fort Dodge), com aplicação local, que apresenta resultados melhores que os obtidos com vacinas inativadas de aplicação intramuscular (PRESCOTT et al., 2000; WALKER et al., 2002). A vacinação intranasal de uma mistura de Proteína M ligada a uma toxina colérica foi testada por Sheoran et al. (2002), resultando na indução de resposta específica de anticorpos IgG no soro e IgA na mucosa. Entretanto, os resultados de proteção clínica não foram satisfatórios. Estudos recentes têm utilizado a proteína HAP (proteína associada ao hialuronato), apresentando resultados satisfatórios experimentalmente, (CHANTER et al., 1999; HARRINGTON et al., 2002). Entretanto até o momento não existem formulações comerciais com esta proteína.

Flock et al., (2004) avaliaram a eficácia de uma vacina recombinante contendo partes das proteínas FNZ (proteína ligante de fibronectina), SFS (proteína ligante de fibronectina secretada) e EAG (proteína ligante de $\alpha 2$ macroglobulina, albumina e imunoglobulina G). A

vacina apresentou taxas satisfatórias de IgA de mucosa, e IgG de soro quando administrada via intranasal e subcutânea.

2.3. Chaperoninas - HSP60

As chaperoninas, também conhecidas como chaperonas, são uma família de proteínas conservadas que têm habilidade de reconhecer e se ligar de forma seletiva a proteínas não ativas em condições fisiológicas e situações de estresse (BUCHNER et al., 1996). São proteínas que atuam na montagem correta de proteínas alvo, ligando-se a superfícies reativas da proteína alvo que estão expostas durante os processos de montagem, impedindo a interação destas regiões com outras da mesma proteína, induzindo a uma conformação incorreta (LEWIN, 2001). São divididas em dois grupos: grupo I, das chaperoninas encontradas em bactérias, mitocôndrias, cloroplastos; e o grupo II, presentes em eucariotos e Archaea (LUND et al., 2003).

O grupo de chaperonas mais estudado são as *heat-shock proteins*, que são chaperonas que atuam na célula em situação de estresse, impedindo o desempacotamento irreversível das proteínas. Os principais membros deste grupo são as Hsp104, Hsp90, Hsp70, Hsp60/GroEL e as pequenas chaperonas (BUCHNER, 1996).

A família das HSP60 inclui as famílias complexas GroEL e TCP-1. As GroEL são encontradas em procariotos, cloroplastos e mitocôndrias, enquanto as TCP-1 são encontradas no citosol de células eucariotas (FINK, 1999). Os genes que codificam para a Hsp60 são extremamente conservados e vitais para a célula, sendo encontrados em quase todos os organismos, com exceção dos micoplasmas (LUND et al., 2003). Além do importante papel no *foldings* protéico, as chaperonas possuem capacidade de estimular o sistema imune, aumentando a produção de citocinas em resposta a uma infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (QAMRA & MANDE, 2004).

A maioria das HSP60, também conhecidas como Cpn60, são proteínas oligoméricas complexas, com uma cavidade central onde se ligam proteínas não ativas. Em bactérias as HSP60 precisam de uma chaperonina GroEL (cpn10) para que sua função seja completa (FINK, 1999). Estudos sugerem que as *heat shock proteins* são essenciais para o processo de agregação e empacotamento ou *foldings* protéico, levando à formação de corpúsculos de inclusão em *Escherichia coli* mutantes defeituosas para o gene da *hsp60*, também conhecido como *GroEL* em *E. coli* (GRAGEROW et al., 1991).

Pelo fato de serem encontradas em praticamente todos os microrganismos, essa região têm sido muito utilizada para caracterização de agentes através de técnicas moleculares (GOH et al., 1996; GOH et al., 1998; QAMRA & MANDE, 2004; WONG et al., 2002).

2.4. Métodos descritos para a identificação de *Streptococcus equi*

Agentes pertencentes ao mesmo grupo C Lancefield, como *S. equi* subesp. *zooepidemicus* são freqüentemente isolados de amostras clínicas como contaminantes secundários de casos de adenite eqüina, sendo portanto necessário que se faça a correta diferenciação entre essas subespécies. Para esta diferenciação podem ser utilizadas técnicas baseadas em características fenotípicas dos agentes ou técnicas moleculares.

As diferenças fenotípicas (Anexo B) entre as subespécies de *S. equi* são pequena e tradicionalmente é realizada baseada em testes de 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 ainda mais sua diferenciação fenotípica (GRANT et al., 1993). Ainda dentre as técnicas fenotípicas, existem kits comerciais de fermentação de açúcares em microplaca, como o API 20 STREP, um sistema de diferenciação entre os membros da família *Streptococcaceae*, constituído por 20 testes bioquímicos com alto poder discriminatório (BioMérieux, 1997).

Devido aos problemas relacionados com a diferenciação fenotípica destas subespécies, métodos moleculares de caracterização são estudados constantemente. As técnicas moleculares são descritas para a maioria dos gêneros bacterianos, com a utilização de seqüência espécie-específicas de DNA como na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (McPHERSON & MOLLER, 2000).

O teste de PCR baseado na seqüência *SeM*, que codifica para a proteína M de *S. equi* subesp. *equi* é até três vezes mais sensível que a cultura (TIMONEY & ARTIUSHIN, 1997a), entretanto este gene pode ser eventualmente identificado em isolados de *S. equi* subesp. *zooepidemicus*. A cultura de swab nasal, lavados nasais e pus de abscesso pode ser realizada em agar Columbia CNA (colistina, ácido nalidixico) acrescido de 5% de sangue ovino ou eqüino (TIMONEY, 2004). Entre 24 e 48 horas após o início da febre, *S. equi* subesp. *equi* pode não ser isolado da mucosa nasal (TIMONEY, 2004).

Recentemente foi descrito um PCR multiplex baseado no gene *sodA* e exotoxinas SeeH e SeeI para diferenciação entre *S. equi* subesp. *equi* e *S. equi* subesp. *zooepidemicus*. As

seqüências internas do gene *sodA* não são suficientes para a diferenciação entre as subespécies, identificando apenas as espécies de *S. equi*. Entretanto, os genes *seeH* e *seeI* estão presentes apenas nos isolados de *S. equi* subesp. *equi*, servindo como diferenciação. O uso dessa técnica pode ser restrita em casos de mutações nos genes que codificam as toxinas *SeeH* e *SeeI*, levando a erros no diagnóstico (ALBER et al., 2004a).

A utilização da técnica de PCR tem especial importância na identificação de animais portadores e apresenta uma maior sensibilidade comparada ao isolamento de material de bolsas guturais, com detecção de 76% dos portadores enquanto a cultura detectou 59% (NEWTON et al., 2000).

Seqüências de rRNA 16S espécie-específicas são utilizadas por diversos autores para muitas espécies de *Streptococcus* (KAWAMURA et al., 1995; ABDULMAWJOOD & LÄMMLER, 2000), entretanto as seqüências de regiões internas do gene rRNA 16S de *S. equi* subesp. *equi* e *S. equi* subesp. *zooepidemicus* são praticamente idênticas, indicando que essa região não é suficiente para a identificação e diferenciação entre as espécies (ABDULMAWJOOD & LÄMMLER, 2000).

Sechi et al., (1999) estudaram técnicas moleculares de ribotipificação para o estudo de isolados de *S. equi* subesp. *equi* obtidos de camelos da Etiópia, com a finalidade de estabelecer uma relação clonal entre as cepas de camelos e eqüinos, demonstrando que existe uma variação genética entre estes isolados. O uso de seqüências repetitivas como ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) foram descritas para o estudo de variações entre isolados de *S. equi* (AL-GHAMDI et al., 2000).

A utilização de seqüências baseadas na proteína M-like foi descrita para diferenciação entre as subespécies, entretanto cepas de *S. equi* subesp. *zooepidemicus* possuem genes que codificam proteínas M-like com alto grau de homologia com as proteínas produzidas por *S. equi* subesp. *equi*, não sendo portanto uma técnica confiável para a correta diferenciação (TIMONEY et al., 1997b).

O seqüenciamento de regiões intergênicas do gene 16S-23S nem sempre é suficiente para a diferenciação entre as subespécies pela existência de poucas regiões de divergência e com poucos nucleotídeos (CHANTER et al., 1997b). Técnicas de análise de polimorfismo de DNA através de RAPD-PCR (DUARTE et al., 2004) e eletroforese em campo pulsado (PFGE) associada a técnicas de RAPD (GONZALEZ-REY et al., 2003) também têm sido relatadas.

Além dos métodos citados, que nem sempre apresentam um grau de diferenciação satisfatória entre as subespécies, a análise parcial do gene que codifica para a chaperonina

HSP60 é uma alternativa importante a ser estudada na caracterização e diferenciação molecular de espécies bacterianas com divergência genética recente (WONG et al., 2002). Os genes que codificam para a chaperonina HSP60 são extremamente conservados entre as espécies bacterianas e podem ser utilizados em estudos de evolução molecular e taxonomia. Métodos baseados no seqüenciamento de regiões parciais do gene *hsp60* já demonstraram alto poder discriminatório em espécies como *Staphylococcus* coagulase-negativa (GOH et al., 1996), enterobactérias (WONG et al., 2002), sorotipos de *Streptococcus suis* (BROUSSEAU et al., 2001), e entre *Streptococcus uberis* e *Streptococcus parauberis* (ALBER et al., 2004b).

3. CAPÍTULO 1

**A comparison between biochemical test and the partial analysis of
sequences of the *hsp60* gene for the identification of *Streptococcus equi*
isolates**

A ser submetido à revista Current Microbiology

**A comparison between biochemical test and the partial analysis of sequences of the
hsp60 gene for the identification of *Streptococcus equi* isolates**

Running head: Identification of *S. equi* by sequencing of *hsp60* gene

Mariana Sá e Silva^{1,2}, Mateus Matiuuzzi da Costa^{3,4}, Clarissa Barretta¹, Ana Cláudia Mello
Groff¹, Agueda Castagna de Vargas^{1*}

Postal addresses of affiliation:

¹ Laboratório de Bacteriologia, DMVP, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM

² Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, Campus Toledo

³ Universidade do Oeste de Santa Catarina, UNOESC, Campus Xanxerê

⁴ Centro de Biotecnologia, CBIOT, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

Agueda Castagna de Vargas*: Phone: (55) 3220 8107

Corresponding author:

Agueda Castagna de Vargas

Universidade Federal de Santa Maria

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Prédio 44, sala 5137

CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

agueda@ccr.ufsm.br

Abstract

Streptococcus equi is the etiological agent of strangles. Opportunistic agents from the same group are frequently isolated from horses with strangles and may induce mistake diagnostic. Among the subspecies of *S. equi* the phenotypic characteristics are almost undistinguishable; however the pathogenic potential is widely differentiated. The objective of this study was to determine the phenotypic and molecular characteristics of *S. equi* isolates obtained from samples of clinical cases of strangles by sequencing the *hsp60* gene. By phenotypical assays 26 strains of *Streptococcus* sp. were identified, 18 were characterized as *S. equi* subsp. *equi*, five as *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, two as *S. dysgalactiae* subsp., *equisimilis*, and one as *Streptococcus* sp.; However using molecular characterization, 21 isolates were identified as *S. equi* subsp. *equi* and five as *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. The analysis of the *hsp60* sequence is a good discriminatory tool and can be useful as a method of differentiation, principally for the characterization of atypical isolates.

Keywords: *Streptococcus equi*, *hsp60*, characterization, strangles.

Introduction

Strangles is an acute contagious disease characterized by inflammation of the superior respiratory tract of horses [18]. *S. equi* subsp. *equi* pertains to the Lancefield group C, which includes other agents such as *S. equi* subsp. *zooepidemicus* and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, that are frequently isolated from clinical samples of horse as secondary contaminants [14, 23]. The term bastard strangles refers to the dissemination of *S. equi* subsp. *equi* to lymph nodes and other organs such as the lungs, spleen, liver, kidneys, and brain. In 10% of sick horses rupture of abscesses may lead to the dissemination of the agent, resulting in mortality [14, 19, 23].

There are few phenotypic features capable of distinguishing between the subspecies of *S. equi*. These are based on sugar fermentation tests, mainly using lactose, trehalose, and sorbitol [6, 15]. Laboratory diagnosis of strangles is often difficult because strains of *S. equi* subsp. *equi* demonstrate atypical biochemical fermentation [12]. Due to the problems related with the phenotypic differentiation of these subspecies, various molecular methods of characterization have been used, e.g., the sequencing of intergenic regions of 16S-23S genes [4], DNA polymorphic using RAPD-PCR [5], Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) associated to RAPD techniques [11], and the utilization of repetitive sequences [2]. However, these methods are unable to differentiate between the subspecies of *S. equi*. Thus, the partial sequencing of the chaperonin *hsp60* gene may be an important alternative to differentiate between these subspecies.

The objective of this study was to evaluate the *hsp60* gene as a secure alternative method to identify and differentiate between the subspecies of *S. equi*. Additionally, this technique could be used for the diagnosis as well as for the elaboration of control measures of this disease.

Materials and Methods

Bacterial isolates. Samples from horses with clinical signs of strangles or bastard strangles used in this study were obtained from the Laboratory of Bacteriology of the Federal University of Santa Maria and the Federal University of Pelotas. All samples were grown in sheep blood agar. Plates were incubated at 37°C for 48 h; colonies were observed for staining characteristics and the production or not of hemolysis. Colonies of Gram-positives rods were recultured in sheep blood agar plates.

Phenotypic characterization. The pure plate cultures of *Streptococcus* spp. were suspended in saline solution and used for the biochemical fermentation sugar tests for the phenotypic differentiation of *Streptococcus* sp. isolates [16].

Molecular characterization. Colonies of *Streptococcus* sp. were emulsified in 1mL of Mili-Q sterile water and the DNA extracted using the CTAB method [17], modified by digestion with Proteinase-K. For fragment amplification, the degenerate primers HSP 279 5'-GAATTCGAIIIIIGCIGGIGA(TC)GGIACIACIAC-3', and HSP 280 5'-CGCGGGATCC(TC)(TG)I(TC)(TG)ITCICC(AG)AAICCGGIGC(TC)TT-3' previously described by GOH [9], were used. The reaction contained 2 µl of DNA and 48 µl of master mix (15 pmol of primers, 200 µM of deoxirribonucleotides, *Taq* 1 X buffer and 5 U of *Taq* DNA polymerase (Cenbiot). The thermal cycle conditions were: 94°C for 5 min, 95°C for 30 s, 37°C for 30 s, and 72°C for 1 min (30 cycles), followed by 75°C for 5 min. The amplified

products were purified by QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) and sequenced in an automatic DNA sequencer (MEGABACE 1000) at the Molecular Biology Laboratory, Federal University of Santa Maria. Sequences were aligned by adequate software (Bioedit), and were edited manually when necessary. The sequence data were further aligned with the computer program ClustalW [20] and compared with the *hsp60* gene of *S. equi* subsp. *equi* and *S. equi* subsp. *zooepidemicus* sequences (GenBank accession numbers AY123646 and AY123645, respectively).

Results and Discussion

Strangles is an important disease that affects the superior respiratory tract of horses. For the implantation of efficient prophylactic and control measures it is necessary to have a correct differentiation between *S. equi* subsp. *equi* and from other agents of the Lancefield group C, that may be less pathogenic [21].

By phenotypical characterization 26 isolates were separated in four biotypes: a) biotype I (*S. equi* subsp. *equi*), non-fermentors of trehalose, sorbitol and lactose, 18 isolates; b) biotype II (*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*), ferments trehalose but does not ferment sorbitol and lactose, two isolates; c) biotype III (*S. equi* subsp. *zooepidemicus*), ferments lactose and sorbitol and does not trehalose, five isolates; and d), biotype IV (*Streptococcus* sp.), that ferments lactose and trehalose, but does not ferment sorbitol, one isolate (Table 1).

During this study it was observed that four isolates were divergent by phenotypical and molecular characterization. Two isolates were classified phenotypical as *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. However, during molecular characterization of these two isolates, one was identified as *S. equi* subsp. *equi* and the other as *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. One isolate grouped into biotype IV, where it was not possible to identify the subspecies, was

characterized as *S. equi* subsp. *equi* by molecular analysis. Another isolate classified as *S. equi* subsp. *zooepidemicus* by phenotypical characteristics was characterized as *S. equi* subsp. *equi* by molecular analysis. Atypic fermentation parameters described in isolates from the Lancefield group C, have resulted in erroneous diagnoses [12, 13]. *S. equi* subsp. *zooepidemicus* is considered as a normal microorganism from the nasopharynx of horses, and is frequently isolated from health horses [22]. During this study, samples were obtained from animals with clinical manifestations of strangles, but the results obtained did not correspond to a normal distribution of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* in a healthy population of horses.

The use of the PCR technique for the diagnosis of bacterial diseases has frequently been used as an alternative to phenotypical analysis, which is based on the metabolism of normal bacterial [4]. The target-regions frequently used in PCR studies of the taxonomy of *S. equi* are based on the 16S rRNA region or the intergenic (16S – 23S) regions [4]. The *hsp60* region has several advantages, such as being a gene that is common to all microorganisms, codifying for a highly conserved protein family [7, 25]. The degenerated primers of the *hsp60* region that were used during this study amplified a 600 pb fragment in all isolates. The use of *hsp60* specific primers were described in *S. parauberis* and *S. uberis* with satisfactory results [1]; however, the small number of divergences of bp between subspecies of *S. equi*, makes it difficult to design specific primers to be used in diagnostic tests.

The alignment of *S. equi* subsp. *equi* and *S. equi* subsp. *zooepidemicus* by the *hsp60* gene demonstrated 16 different nucleotides, presenting 2.89% of divergence among the subspecies, similar results were reported for the 16 S – 23 S rRNA intergenic region from the same subspecies. However, only 169 nucleotides were analyzed in this intergenic region [4], while in the *hsp60* gene analyzed 552 nt were observed, resulting in more accurate results. WONG [24], analyzing sequences of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, indicated that the *hsp60* region was more discriminatory when compared to the 16S rRNA sequence.

Similar results with the *hsp60* were described by BROUSSEAU [3], who partially sequenced serotypes of *Streptococcus suis* with high DNA homology. Additionally, the same method was used as an alternative for the molecular identification of other microorganisms such as *Staphylococcus* sp. [8, 9], enteric pathogens [24], and other *Streptococcus* sp. [1, 8, 10].

During this study six of the 26 isolates were from clinical diagnosed cases of bastard strangles, with the formation of rectal abscesses. Five of these were identified as *S. equi* subsp. *equi* by phenotypical characterization and one demonstrated an atypical biochemical pattern that was confirmed by sequencing as *S. equi* subsp. *equi*.

The results of this study have demonstrated that phenotypical tests commonly used for *S. equi* identification may produce diagnostic mistake. The analysis of the *hsp60* partial gene favors the differentiation of *S. equi* subspecies and can be useful during molecular diagnosis, mainly in the characterization of atypical isolates.

Acknowledgements

The authors thank Prof. Dr Elgion Loreto from the Molecular Biology laboratory of UFMS, the financial support from CAPES, FAPERGS, collaborators from the LABACUFMS, where the experiment was carried out, and Sônia Botton for review of this manuscript.

Reference

1. ALBER, J. et al. (2004) Polymerase chain reaction mediated identification of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* using species-specific sequences of the genes encoding superoxide dismutase A and chaperonin 60. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.** 51:180-184

2. AL-GHAMDI, G.M. et al.(2000) Use of repetitive sequence-based polimerase Chain reaction for molecular epidemiologic analysis of *Streptococcus equi* subspecies *equi*. **Am J Vet Res**, 61:699-705.
3. BROUSSEAU, R. et al. (2001) *Streptococcus suis* serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene Sequences. **App Env Microb**, 67:4828-4833.
4. CHANTER, N. et al.(1997) Characterization of the Lancefield group C *Streptococcus* 16S-23S RNA gene intergenic spacer and its potential for identification and sub-specific typing. **Epidemiol Infect**,118:125-135.
5. DUARTE, R.S. et al.(2004) Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. **J Clin Microbiol**, 42:4214-4222.
6. EUZÉBY, J.P.(2005) **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire**. 18 Jan 2005. On-line: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdicto/ss/equi.html>
7. FINK, A.L.(1999) Chaperone-Mediated Protein Folding. **Phys Rev**, 79:425-442.
8. GOH, S.H. et al.(1996) HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: Studies with coagulase-negative Staphylococci. **J Clin Microb**, 34:818-823.
9. GOH, S.H. et al.(1997) Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. **J Clin Microb**, 35:3116-3121.
10. GOH, S.H. et al. (1998) *Streptococcus iniae*, a human and animal pathogen: specific identification by the chaperonin 60 gene identification method. **J Clin Microb**, 36: 2164-2166.
11. GONZALES-REY, C. et al. (2003) RAPD-PCR and PFGE as tools in the investigation of an outbreak of beta-hemolytic *Streptococcus* group A in a Swedish hospital. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, 26:25-35.

12. GRANT, S.T.; EFSTRATION, A.; CHANTER, N.(1993) Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. **Vet Rec**, 133:215-216.
13. JORM, L.R. et al.(1994) Genetic structure of populations of beta-hemolytic Lancefield group C Streptococci from horses and their association with disease. **Res Vet**, 57:292-299.
14. KOL, A., et al. (2003) Complicated strangles: Two case reports and a literature review. **Israel J Vet Med**, 58.
15. KUWAMOTO, Y. et al. (2001) Microplate Sugar-Fermentation assay distinguishes *Streptococcus equi* from other Streptococci of Lancefield's Group C. **J. Equine Sci.** 12:47-49.
16. QUINN, P.J. et al.(1994) **Clinical Veterinary Microbiology**, Spain: Wolfe, 648p.
17. SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. (2001) **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
18. SCHILD, A.L. Infecção por *Streptococcus equi* (Garrotilho). In: RIET-CORREA, F. et al. (2001) **Doenças de Ruminantes e Equinos**. São Paulo: Varela, p.265-269, v.1.
19. SWEENEY, C.R. *Streptococcus equi*. In: SMITH, B.P. (1993) **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. São Paulo : Manole, p.531-533.
20. THOMPSON, J.D. et al.(1994) Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl Ac Res**, 22:4673-4680.
21. TIMONEY, J.F. (2004) The pathogenic equine streptococci. **Vet. Res**, 35:397-409.
22. WELSH, R.D. (1984) The significance of *Streptococcus zooepidemicus* in the horse. **Eq Pract**, 6:6-16.
23. WILKENS, C.A. Strangles. In: COETZER, J.A.W. et al. (1994) **Infectious diseases of livestock – With special reference to Southern Africa**. Oxford University Press, v. 2, Cap. 149, p.1248-1251.

24. WONG, R.S.Y. & CHOW, A.W. (2002) Identification of enteric pathogens by heat shock protein 60kDa (*HSP60*) gene sequences. **FEMS Microbiol Lett**, 206:107-113.
25. YURA, T.; NAGAI, H.; MURI, N. (1993) Regulation of the heat shock response in bacteria. **Annu Rev Microbiol**, 47:321-350.

TABLE 1. Phenotypical and genotypical profile of *Streptococcus* strains isolated from horses.

n.	source	Biochemistry	biotype	Sequencing
1	A	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
2	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
3	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
4	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	III	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>
5	B	<i>S. dysgalactiae</i> subesp. <i>equisimilis</i>	II	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
6	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	III	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>
7	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
8	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
9	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
10	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
11	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
12	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
13	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
14	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	III	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>
15	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
16	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
17	B	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
18	C	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	III	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
19	D	<i>S. dysgalactiae</i> subesp. <i>equisimilis</i>	II	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>
20	D	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
21	D	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	III	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>
22	E	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
23	E	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
24	E	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
25	E	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	I	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>
26	E	<i>Streptococcus</i> sp.	IV	<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>

A: Parotid Lymph node; B: Retropharyngeal Lymph node; C: sub-mandibular lymph node; D: Nasal Swab; E: Bastard abscess

4 . CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho evidenciam que apesar de freqüentemente utilizados, os teste fenotípicos conduzem a erros no diagnóstico de alguns isolados. Nos casos em que a caracterização fenotípica não é eficaz, principalmente na identificação de isolados atípicos, o uso da análise da seqüência parcial do gene *hsp60*, apresenta um alto poder discriminatório e pode ser útil no estabelecimento do diagnóstico molecular e como método de diferenciação entre as subespécies de *Streptococcus equi*.

O custo da técnica ainda é alto o que dificulta sua utilização em rotinas laboratoriais, entretanto sua utilização deve ser uma alternativa para casos de isolados atípicos, formas clínicas severas e que envolvam animais de alto valor zootécnico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULMAWJOOD, A. & LÄMMLER, C. Determination of intra-species variations of the V2 region of the 16S rRNA gene of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, **Res Vet Sci**, v. 68, p.33-39, 2000.

ALBER, J., et al. Multiplex polymerase chain reaction for identification and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* and *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **J Vet Med**, v.51, p.455-458, 2004a.

ALBER, J. et al. Polymerase chain reaction mediated identification of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* using species-specific sequences of the genes encoding superoxide dismutase A and chaperonin 60. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**. v.51, n.4, p.180-184, 2004b.

AL-GHAMDI, G.M., et al. Use of repetitive sequence-based polymerase Chain reaction for molecular epidemiologic analysis of *Streptococcus equi* subspecies *equi*. **Am J Vet Res**, v.61, n. 6, p.699-705, 2000.

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

BIO MERIEUX. **Api 20 Strep Catalogue Analytique**. Bio Mérieux, Marcy-l'Etoile, França, 1997, 278 p.

BISNO, A.L.; COLLINS, C.M.; TURNER, J.C. M Proteins of group C Streptococci isolated from patients with acute pharyngitis. **J Clin Microbiol**, v.34, n10, p.2511-2515, 1996.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Jawetz, Melnick & Adelberg Microbiologia Médica**. Cap. 15: Os Estreptococos. 21ªed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000, p.163-174.

BROUSSEAU, R. et al. *Streptococcus suis* serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences. **Appl Environ Microbiol**, v.67. n.10, p. 4828-4833, 2001.

BUCHNER, J. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. **The FASEB J**, v.10, p.10-19, 1996

CHANTER, N. et al. Streptococci and enterococci as animal pathogens. **J Appl Microbiol Symp Suppl**, 82, 110-109, 1997a.

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. **Epidemiol Infect**, n.118, p.125-135, 1997b.

CHANTER, N. et al. Recombinant hyaluronate associated protein as a protective immunogen against *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus* challenge in mice. **Microbiol Pathogen**, v.27, p.133-143, 1999.

CHANTER, N. et al. *Streptococcus equi* with truncated M-proteins isolated from outwardly healthy horses. Microbiol, n. 146, p. 1361-1369, 2000.

COHEN, N.D. Causes of and farm management factors associated with disease and death in foals. **J Am Vet Med Assoc**, n. 204, p.1644-54, 1994.

DOWNAR, J. et al. Streptococcal meningitis resulting from contact with an infected horse. **J Clin Microbiol**, v. 39, n.6, p. 2358-2359, 2001.

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

EUZÉBY, J.P. **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire**. Capturado em 18/01/2005. Disponível on-line: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/equi.html>

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

FAO - **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS**. Capturado em 23/10/2004. Disponível on-line: 2002 <http://www.fao.org/>

FERNANDEZ, E. et al. *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* subsp. nov., isolated from mastitis in small ruminants. **J Syst Evol Microbiol**, v.54, p.2291-2296, 2004.

- FINK, A.L. Chaperone-mediated protein folding. **Physiol rev.** v.79, n.2, p.425-442, 1999.
- FLANAGAN, J. et al. Characterization of the haemolytic activity of *Streptococcus equi*. **Microbiol Pathogen**, v.24, p. 211-221, 1998.
- FLOCK, M. et al. Recombinant *Streptococcus equi* proteins protect mice in challenge experiments and induce immune response in horses. **Infect and Immun**, v. 72, n.6, p.3228-3236, 2004.
- GALAN 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*. **Infect and Immun**, v.55, n 12, p.3181-3187, 1987.
- GOEHRING, L.S. et al. Neurological syndromes among horses in The Netherlands. A 5 year retrospective survey (1999-2004). **Vet Q**, v.27, n.1, p.11-20, 2005.
- GOH, S.H. et al. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: Studies with coagulase-negative Staphylococci. **J Clin Microbiol**, v.34, n.4, p.818-823, 1996.
- GOH, S.H. et al. *Streptococcus iniae*, a human and animal pathogen: specific identification by the chaperonin 60 gene identification method. **J Clin Microbiol**, v.36, p.2164-2166, 1998.
- GONZALES-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. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 26, n.1, p.25-35, 2003.
- GRAGEROW, A. et al. Protein aggregation and inclusion body formation in *Escherichia coli* rpoH mutant defective in heat shock protein induction. **FEBS Lett**, v.291, p. 222-224, 1991.
- GRANT, S.T.; EFSTRATION, A.; CHANTER, N. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. **Vet Rec**, v. 133, p.215-216, 1993.
- HARRINGTON, D.J.; SUCLIFFE, I.C.; CHANTER, N. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. **Microbiol and Infect**, v. 4, p.501-510, 2002.

HOFFMAN, A.M. et al. Clinical and endoscopic study to estimate the incidence of distal respiratory tract infection in thoroughbred foals on Ontario breeding farms. **Am J Vet Res**, v 54, p. 1602-1607, 1993.

JACOBS, A.A.C. et al. Investigations towards an efficacious and safe strangles vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated *Streptococcus equi*. **Vet Rec**, n.147, p.563-567, 2000.

KAESE, H.J. et al. Infective purpura hemorrhagic in five horses. **J Am Vet Med Assoc.**, n. 226, v. 11, p.1893 – 1898, 2005.

KAWAMURA, Y. et al. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*, **Int J Syst Bacteriol**, v. 45, p. 406-408, 1995.

KAWATA, K. et al. rDNA sequence analyses of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates from pigs. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, p.1941-1946, 2003.

KOL, A., et al. Complicated strangles: two case reports and a literature review. **Israel J Vet Med**, v.58, 2003.

KOWALSKI, J.J. Mecanismo da doença Infecçiosa. In: REED, S.M & BAYLY, W.M. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, p.5456, 2000.

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

LANNERGARD et al. CNE, a collagen-binding protein of *Streptococcus equi*. **FEMS Microbiol Letter**, v.222, p.69-74, 2003.

LAVOIE J.P.; Fiset, L.; LAVERTY, S. Review of 40 cases of lung abscesses in foals and adult horses. **Equine Vet J**, v.26, p.348-352, 1994.

LEE, A.S; DYER, J.R. Severe *Streptococcus zooepidemicus* infection in a gardener, **MJA**, v.180, n.7, p. 366, 2004.

LÉGUILLETTE, R.; ROY, M.F.; LAVOIE, J.P. Foal Pneumonia. **Equine Respiratory Diseases**. 21-Jan-2002. Disponível on-line: www.ivis.org . Capturado em 15/01/2005.

LEWIN, B. **Genes VII**. Parte 2 – Proteínas, cap.8, p.184-188. Artmed, Porto Alegre, 2001.

LUND, P.A. et al. The chaperonins: Perspectives from the archaea, **Bioch Society Trans**, v.31, p.684-685, 2003.

McPHERSON, M.J. & MOLLER, S.G. **PCR**. BIOS Scientific Publishers: Oxford, 2000, p.9-19.

NEWTON, J.R. et al. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*. **Equine Vet J**, v.32, p.515-523, 2000.

NICHOLSON, M.L. et al. Analysis of Immunoreactivity to a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* M-like protein to confirm an outbreak of post streptococcal glomerulonephritis, and sequences of M-like proteins from isolates obtained from different host species. **J Clin Microbiol**, v.38, n 11, p.4126-4130, 2000.

NOMOTO, R. et al. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. **J Fish Dis**, v.27, n.12, p.679-86, 2004.

OIKAWA, M. et al. Pathology of equine respiratory disease occurring in association with transport. **J Comp Pathol.**, v. 113, p. 29-43, 1995.

POYART, C. et al. Identification of Streptococci to species-level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. **J Clin Microbiol** .36, p.41-47, 1998.

PRESCOTT, J. & WRIGHT, B. **Strangles in Horses**. Ministry of Agriculture and Food. Ontário, September 2000. Disponível Online http://www.gov.on.ca/OMAFEA/english/livestock/horses/fact/info_strangles.htm. Capturado em 08/04/2003.

QAMRA, R. & MANDE, S.C. Crystal structure of the 65-kilodalton Heat shock protein, chaperonin 60.2 of *Mycobacterium tuberculosis*, **J Bacteriol**, v.188, n.23, p.8105-8113, 2004.

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

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária – Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9ª ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. Doenças Causadas por Bactérias – I. 2002, p.632-636.

SALASIA, S.I.O. et al. Persistent occurrence of a single *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* clone in the pig and monkey population in Indonesia, **J Vet Sci**, v.5, n.3, p.263-265, 2004.

SCHILD, A.L. Infecção por *Streptococcus equi* (Garrotilho). IN: RIET-CORREA, F. et al.. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. Ed. Varela : São Paulo. v 1, p.265-269, 2001.

SECHI, L.A. et al. Molecular characterization of *Streptococcus equi* subspecies *equi* isolated from an Ethiopian camel by ribotyping and PCR-ribotyping, **New Microbiol**, v.22, n.4, p.383-387, 1999.

SHEORAN, A.S.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J.F. Nasal mucosal immunogenicity for the horse of a SeM peptide of *Streptococcus equi* genetically coupled to cholera toxin. **Vac**, v.20, p.1653-1659, 2002.

SOEDARMANTO, I. et al. Identification and molecular characterization of serological group C Streptococci isolated from diseased pigs and monkeys in Indonesia. **J Clin Microbiol**, v.34, p. 2201-2204, 1996.

SMITH, H. Reaction to strangles vaccination. **Aust Vet J**, v.71 n.8, p.257-258, 1994.

TEIXEIRA, L.M.; TRABULSI, L.R. Cap 22: *Streptococcus*, Enterococcus e gêneros relacionados. IN: TRABULSI, L.R. & ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed. Atheneu, São Paulo, 2004. p.189-193.

TIMONEY, J.F. *Streptococcus*. IN: GYLES, C.L. & THOEN, C.O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 2 ed. Iowa Press, 1993a, p.3 – 20.

TIMONEY, J.F. & MUKHTAR, M.M. The protective M proteins of the equine group C streptococci. **Vet Microbiol**, v.37, p.389-395, 1993b.

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

TIMONEY, J.F. & ARTIUSHIN, S.C. Detection of *Streptococcus equi* in equine nasal swabs and washes by DNA amplification. **Vet Rec**, v.141, p.446-447, 1997

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

WALKER, J.A.; TIMONEY, J.F. Construction of a stable non-mucoid deletion mutant of the *Streptococcus equi* Pinnacle vaccine strain. **Vet Microbiol**, v.6, n 89, p.311-321, 2002.

WALLACE, F.J. et al. An assessment of mucosal immunization in protection against *Streptococcus equi* ('strangles') infections in horses. **Vet Immun and Immunopathol**, v.48, p.139-154, 1995.

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

WILKENS, C.A. Strangles. In: COETZER, J.A.W. et al. **Infectious diseases of livestock – With special reference to Southern Africa**. Oxford University Press, v. 2, Cap. 149, p.1248-1251, 1994.

WONG, R.S.Y. & CHOW, A.W. Identification of enteric pathogens by heat shock protein 60kDa (HSP60) gene sequences. **FEMS Microbiol Lett**, v.206, p.107-113, 2002.

YOUNAN, M. et al. Identification and molecular characterization of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolated from camels (*Camelus dromedarius*) and camel milk in Kenya and Somalia. **J Vet Med**, v. 52, p.142-146, 2005.

ZAOUTIS, T; ATTIA, M.; GROSS, R.; KLEIN, J. The role of group C and group G streptococci in acute pharyngitis in children. **Clin Microbiol Infect**, v.10, n.1, p.37-40, 2004.

ANEXO A – Fatores de Virulência e patogenicidade de *Streptococcus* do grupo C de Lancefield em animais.

Espécie	Grupo	Fatores de Virulência	Doença
	de Lancefield		
<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	C	Cápsula de ácido hialurônico, proteína M, hemolisina e estreptoquinase, toxina leucocidina	Adenite eqüina
<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	C	Cápsula de ácido hialurônico, proteína M, hemolisina e estreptoquinase	Infecções oportunistas de trato respiratório
<i>S. dysgalactiae</i> subesp. <i>equisimilis</i>	C	Hialuronidase, proteína ligante da fibronectina (FBP) e proteína M	Metrites, e placentite em eqüídeos, artrite em suínos e mastites em pequenos ruminantes
<i>S. equi</i> subesp. <i>ruminantium</i>	C		Mastite em pequenos ruminantes

Fonte: GYLES, 1993 – adaptada

ANEXO B – Características fenotípicas de *Streptococcus* do grupo C de Lancefield.

	Trealose	Sorbitol	Lactose	Maltose
<i>Streptococcus equi</i> subesp. <i>equi</i>	-	-	-	+
<i>Streptococcus equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	-	+	+	+ (-)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subesp. <i>equisimilis</i>	+	-	V	+
<i>Streptococcus equi</i> subesp. <i>ruminantium</i>	-	+	+	+

Fonte: QUINN, 1994 – adaptada

ANEXO C – Alinhamento das seqüências de *hsp60* de *S. equi* subesp. *equi* e *S. equi* subesp. *zooepidemicus* obtidas no GenBank

```

                *           20           *           40           *           60
Sequiequi : GCTACTGTTTTGACCCAAGCGATTGTGCGTGAAGGGCTTAAAAATGTAACAGCAGGTGCT : 60
Sequizoee : GCTACTGTTTTGACCCAAGCGATTGTGCGTGAAGGGCTTAAAAATGTAACAGCAGGTGCT : 60
                GCTACTGTTTTGACCCAAGCGATTGTGCGTGAAGGGCTTAAAAATGTAACAGCAGGTGCT

                *           80           *           100          *           120
Sequiequi : AACCCAATTGGTATTCGTCGTGGGATTGAAGCAGCGACAACGACAGCTGTGAGGCCTTA : 120
Sequizoee : AACCCAATTGGTATTCGTCGTGGGATTGAAGCAGCAACAACGACAGCTGTGAGGCCTTA : 120
                AACCCAATTGGTATTCGTCGTGGGATTGAAGCAGCACAACGACAGCTGTGAGGCCTTA

                *           140          *           160          *           180
Sequiequi : AAGGCTGTTGCTCAACCAGTATCTGAAAAGAAGCTATTGCTCAAGTAGCTTCGGTGTC : 180
Sequizoee : AAGGCTGTTGCTCAACCAGTATCTGAAAAGAAGCGATTGCTCAAGTAGCTTCGGTGTC : 180
                AAGGCTGTTGCTCAACCAGTATCTGAAAAGAAGCATTGCTCAAGTAGCTTCGGTGTC

                *           200          *           220          *           240
Sequiequi : TCACGTTCTGAAAAGGTTGGTGACTATATTTCTGAAGCTATGGAGCGCGTGGGAAATGAT : 240
Sequizoee : TCACGTTCTGAAAAGGTTGGTGACTATATTTCTGAAGCTATGGAGCGCGTGGGAAATGAT : 240
                TCACGTTCTGAAAAGGTTGGTGACTATATTTCTGAAGCTATGGAGCGCGTGGGAAATGAT

                *           260          *           280          *           300
Sequiequi : GGTGTGATTA CTATTGAGGAATCACGTGGTATGAAAACAGAGCTTGAGGTTGTTGAGGGA : 300
Sequizoee : GGTGTTATCA CTATTGAGGAATCACGTGGTATGAAAACAGAGCTTGAGGTTGTTGAGGGA : 300
                GGTGT AT ACTATTGAGGAATCACGTGGTATGAAAACAGAGCTTGAGGTTGTTGAGGGA

                *           320          *           340          *           360
Sequiequi : ATGCAGTTTGACCGCGGCTATTTGTCACAATACATGGTCACTGACAATGAAAAATGGTT : 360
Sequizoee : ATGCAGTTTGACCGCGGCTATTTGTCACAATACATGGTCACTGACAATGAAAAATGGTT : 360
                ATGCAGTTTGACCGCGGCTATTTGTCACAATACATGGTACTGACAATGAAAAATGGTT

                *           380          *           400          *           420
Sequiequi : GCTGATCTTGAAAACCCATTTATCCTGATTACTGATAAGAAAATTTCTAATATCCAAGAC : 420
Sequizoee : GCTGATCTTGAAAACCCATTTATCCTGATTACTGATAAGAAAATTTCTAATATCCAAGAT : 420
                GCTGATCTTGAAAACCCATTTATCCTGATTACTGATAAGAAAATTTCTAATATCCA GA

                *           440          *           460          *           480
Sequiequi : ATTCTTCCAATTGCTTGAGGAGGTGCTTAAGACTAGCCGTCATTGTGATCATTGCTGAT : 480
Sequizoee : ATTCTTCCITTGCTTGAGGAGGTGTTGAAAACAAGCCGTCATTGTGATCATTGCTGAT : 480
                ATTCTTCC TTGCTTGAGGAGGTG T AA AC AGCCGTCATTG TGATCATTGCTGAT

                *           500          *           520          *           540
Sequiequi : GATGTTGATGGCGAAGCCCTTCCGACCTAGTGCTTAATAAAAATTCGTGGTACCTTCAAT : 540
Sequizoee : GATGTTGATGGCGAAGCCCTTCCGACCTAGTGCTTAATAAAAATTCGTGGGACCTTCAAT : 540
                GATGTTGATGGCGAAGCCCTTCCGACC TAGTGCTTAATAAAAATTCGTGG ACCTTCAAT

                *
Sequiequi : GTTGTAGCGGTT : 552
Sequizoee : GTTGTAGCGGTT : 552
                GTTGTAGCGGTT

```