

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

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE SURTOS DE
ADENITE EQUINA NO RIO GRANDE DO SUL -
BRASIL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Felipe Libardoni

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE SURTOS DE ADENITE EQUINA NO RIO GRANDE DO SUL - BRASIL

Felipe Libardoni

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
2012**

**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

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE SURTOS DE
ADENITE EQUINA NO RIO GRANDE DO SUL -
BRASIL**

elaborada por
Felipe Libardoni

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

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Fernando Spilki, Dr (FEEVALE)

Karin Erica Brass, Dr (UFSM)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária e ao CNPq pela oportunidade de realização deste projeto.

À professora Agueda Vargas pela acolhida, confiança, orientação e ensinamentos recebidos durante o período de execução deste trabalho.

À minha família em especial aos meus pais Dalmo Libardoni e Vera Libardoni e minha irmã Gabriela Libardoni pelo exemplo de vida, e por não medirem esforços para me proporcionar a melhor educação e acreditarem no meu potencial.

Às pós-graduandas Luana Farias e Leticia Matter pelas sugestões, opiniões e auxílio na parte escrita do trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, principalmente aos colegas Carlos Eugenio Vidal, Leticia Trevisan Gressler, Ananda Paula Kowalski e Andréia Vielmo que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos Stephan de Oliveira, Monique Rovani, Camila Tochetto, Candice Schimidt e Cássia Bagolin por me incentivarem a seguir em frente e nunca desistir, mesmo nos momentos difíceis enfrentados durante esse período.

Às colaboradoras da iniciação científica por manterem o laboratório sempre em bom funcionamento.

A todos o meu agradecimento!!!

RESUMO

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

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE SURTOS DE ADENITE EQUINA NO RIO GRANDE DO SUL – BRASIL

AUTOR: Felipe Libardoni

ORIENTADOR: Agueda Castagna de Vargas

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2012.

A adenite equina é uma doença infecto-contagiosa que acomete o trato respiratório superior, sendo uma das principais doenças respiratórias de equinos. O agente etiológico dessa enfermidade é o *Streptococcus equi* subespécie *equi* (*S. equi*), responsável por aproximadamente 30% das notificações em todo o mundo. Os principais sinais clínicos da adenite são febre, secreção nasal e enfartamento de linfonodos, que ocorre pela dificuldade de fagocitose do *S. equi* por células de defesa devido a presença da cápsula de ácido hialurônico e proteína M. Somado a isso, o entendimento sobre a epidemiologia e o controle da adenite equina ainda é limitado. Estudos moleculares demonstram diferenças na região N-terminal na sequência do gene codificador da proteína M (SeM) de *S. equi*. Esta região do gene já foi utilizada na diferenciação de isolados por meio da caracterização de diferentes alelos. Esta dissertação objetivou analisar e diferenciar 47 isolados bacterianos de *S. equi* provenientes de amostras clínicas de equinos da região sul do Brasil, oriundas de 15 animais Puro Sangue de Corrida (PSC), 29 da raça Crioula e três da raça Brasileiro de Hipismo (BH), por meio de análise filogenética e diferenciação de alelos, com base no sequenciamento da região N-terminal do gene SeM. As amostras foram oriundas de 31 surtos em 20 estabelecimentos de criação. Foram encontrados 15 alelos de SeM, dentre os quais apenas um (alelo 9) já disponível no banco de dados PubMLST-SeM, como alelo 61, com sete isolados (14,9%). Entre os novos alelos identificados, o alelo 1 foi o mais prevalente com 13 isolados (27,7%), seguido pelo alelo 3 com 10 isolados (21,3%). Os resultados demonstram a grande diversidade da proteína M entre os isolados de *S. equi* na população equina estudada. Portanto, o sequenciamento parcial do gene da proteína M do *S. equi* é uma ferramenta útil na investigação epidemiológica para a diferenciação de isolados em surtos de adenite equina, com a identificação de alelos em populações de equinos. Além disso, pode representar uma perspectiva para o controle da enfermidade com a orientação na escolha de cepas para confecção de vacinas comerciais e autógenas.

Palavras-chave: *Streptococcus equi* subespécie *equi*, garrotilho, proteína M, equino, alelo.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Professional Graduation Program in Veterinary Medicine
Universidade Federal de Santa Maria

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF OUTBREAKS STRANGLES IN RIO GRANDE DO SUL – BRAZIL

AUTHOR: Felipe Libardoni

ADVISER: Agueda Castagna de Vargas

Defense Place and Date: Santa Maria, February 27nd, 2012

Strangles is an equine infectious disease that affects the upper respiratory tract, being considered the main respiratory disease in horses. The etiologic agent is *Streptococcus equi* subsp. *equi* (*S. equi*), responsible for approximately 30% of horse diseases worldwide notifications. The clinical signs of strangles are fever, nasal secretion and lymph node enlargement. The last one occurs due the incomplete phagocytosis of *S. equi* by defense cells because the presence of hyaluronic acid capsule and M protein (SeM) on the bacteria. The understanding of strangles epidemiology and its control is still limited. Molecular studies demonstrate differences in the gene sequence that codify the N-terminal region of the M protein (SeM) of *S. equi*. This gene region was already used in the differentiation of isolates by characterization of different alleles. This thesis aims to analyze and differentiate 47 *S. equi* isolates from equine clinical specimens from southern Brazil (15 Thoroughbred horses, 29 animals from the Crioula breed and three Brasileiro de Hipismo) through phylogenetic analysis and differentiation of alleles based on sequencing of the N-terminal region of the SeM protein. Samples were obtained from 31 outbreaks in 20 premises. Fifteen alleles were identified being only one (allele 9), with 7 isolates (14.9%), was already available in the PubMLST-SeM database (allele 61). Among the new identified alleles, the number 1 was the most prevalent with 13 isolates (27.7%), followed by allele 3 with 10 isolates (21.3%). The results demonstrate the great diversity of the amino acid sequence among the *S. equi* isolates from the studied equine population. Therefore the N-terminal sequence of SeM gene of the *S. equi* isolates is a useful tool in epidemiological investigation to differentiate isolates in strangles outbreaks with the identification of alleles in horses population, and may represent an alternative for to control the illness with guidance in selecting strains for production of commercial and autogenous vaccines.

Key words: *Streptococcus equi* subesp. *equi*, M protein, equine, alleles.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Árvore filogenética de Neighbour-joining construída com base nas sequências de nucleotídeos dos alelos SeM identificados em isolados de *Streptococcus equi subespécie equi* em surtos de adenite equina no Rio Grande do Sul – Brasil. Os valores de Bootstrap são mostrados nos ramos da árvore (foram realizadas 1000 repetições). A árvore foi dividida em quatro grupos: verde (grupo 1), vermelho (grupo 2), azul (grupo 3), amarelo (grupo4). 31
- Figura 2 – Distribuição geográfica dos 15 alelos identificados nos 47 isolados de *Streptococcus equi subespécie equi* oriundos de 20 estabelecimentos de criação no Rio Grande do Sul – Brasil, e respectivos grupos raciais..... 32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Caracterização da origem (estabelecimento), dos surtos de adenite e isolados de *Streptococcus equi subespécie equi* oriundos de 20 estabelecimentos de criação de equinos das raças Crioula, Puro Sangue de Corrida (PSC) e Brasileiro de Hipismo (BH) localizados no Rio Grande do Sul – Brasil. 33
- Tabela 2 – Comparação da sequência de aminoácidos da transcrição dos 15 alelos encontrados, entre os 47 isolados de *Streptococcus equi subespécie equi* oriundos de estabelecimentos de criação de equinos no Rio Grande do Sul – Brasil, tendo como referência o isolado de *Streptococcus equi subespécie equi* 4047 disponível no GenBank 34

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

BH	Raça Brasileiro de Hipismo
BIC	<i>Bayesian Information Criterion</i> (Critério de informação Bayesiano)
°C	Graus Celsius
CRL	Raça Crioula
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeo
HAP	Proteína associada ao hialuronato
IdE	Endopeptidase de IgG
IdE2	Endopeptidase de IgG
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
LTDA	Limitada
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micromolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ng	Nanograma
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de campo pulsado)
PSC	Cavalo Puro Sangue de Corrida
Pub-MLST	<i>Multilocus sequence typing (MLST) databases</i>
RADP-PCR	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> (Amplificação aleatória de DNA polimórfico)
SeM	Gene da proteína M
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Adenite equina	12
2.2 Etiologia	12
2.3 Epidemiologia	13
2.4 Tratamento e controle	14
2.5 Proteína M	15
3 CAPÍTULO 1 - Diversidade de SeM em <i>Streptococcus equi</i> subespécie <i>equi</i> isolados de surtos de adenite equina no Rio Grande do Sul – Brasil	17
RESUMO	18
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO	24
CONCLUSÕES	27
AGRADECIMENTOS	28
REFERÊNCIAS	28
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 - INTRODUÇÃO

A criação de equinos no Brasil tem grande relevância econômica e social, representando uma grande parcela no agronegócio brasileiro. O país possui o terceiro maior rebanho equino do mundo, com um plantel de 5,5 milhões de animais, dos quais 470.199 mil estão no Rio Grande do Sul, ficando o Estado em terceiro lugar entre as unidades da federação (BRASIL, 2010).

O setor equídeo forma hoje uma importante cadeia do agronegócio, com forte interação dos setores ligados ao esporte, lazer e turismo, sendo uma das cadeias produtivas que oferece mais oportunidades de trabalho para médicos veterinários, e que vem conquistando posição de destaque na economia nacional e internacional. Além disso, atividades ligadas à equideocultura, sejam elas de esporte ou lazer, movimentam milhões de dólares na economia brasileira e internacional gerando milhares de empregos.

Dentre as enfermidades que afetam equinos, o segundo grupo com maior prevalência é composto pelas doenças que acometem o trato respiratório, como a adenite equina, responsável por aproximadamente 30% das notificações de enfermidades em equinos em todo o mundo (CHANTER, 1997). A adenite equina, também conhecida como garrotilho, é uma doença infecto-contagiosa aguda caracterizada por inflamação mucopurulenta do trato respiratório superior dos equinos (SCHILD, 2001). O termo garrotilho deve-se ao fato de que cavalos afetados e não tratados parecem estar sendo estrangulados (garroteados), devido ao aumento dos linfonodos retrofaríngeos e submandibulares, que obstruem a faringe (ANZAI et al., 1999).

Esta enfermidade é causada pela bactéria β -hemolítica *Streptococcus equi* subesp. *equi* (*S. equi*) do grupo C de Lancefield. Também pertencem a esse grupo *Streptococcus equi* subesp. *zooepidemicus* e *Streptococcus dysgalactiae* subesp. *equisimilis*, microrganismos relacionados geneticamente, porém com potencial patogênico diferenciado e frequentemente isolados de amostras clínicas como contaminantes secundários (TIMONEY, 2004).

O uso de antimicrobianos é recomendado no tratamento da fase inicial da adenite equina. Essa terapia é eficiente somente nessa fase, caracterizada por febre, depressão e secreção nasal mucopurulenta, prevenindo a formação de abscessos (HARRINGTON et al., 2002).

Em surtos, recomenda-se o isolamento dos equinos doentes e a vacinação do rebanho para evitar a disseminação da doença. No Brasil estão comercialmente disponíveis vacinas

contendo como antígeno bactérias inativadas (bacterinas). Porém, elas não asseguram um controle satisfatório, pois conferem apenas proteção a cerca de 50% dos vacinados. Vacinas experimentais contendo proteína M e proteína associada ao hialuronato (HAP) de *S. equi* estão sendo desenvolvidas a partir de tecnologias de proteína recombinante, mas não têm demonstrado proteção satisfatória em equinos, possivelmente por variações dessas proteínas (MEEHAN et al., 1998; CHANTER et al., 1999; SHEORAN et al., 2002).

A identificação de uma variação na região N-terminal do gene da Proteína M vem sendo empregada para diagnóstico da adenite, e utilizada como ferramenta epidemiológica na caracterização de surtos da doença através da caracterização de diferentes alelos (KELLY et al., 2006).

Os principais objetivos dos estudos atuais sobre adenite equina visam um melhor entendimento sobre a base molecular e fatores de virulência do agente. Além disso, a produção de vacinas mais eficientes também é alvo de pesquisa. Técnicas avançadas de biologia molecular serão possivelmente o caminho para melhorar a compreensão sobre a adenite equina e, assim, minimizar limitações e resolver problemas ligados a patogenia e controle da doença.

Devido à ausência de estudos referentes a identificação de alelos da proteína M de isolados brasileiros, este estudo objetivou analisar e diferenciar isolados de *S. equi*, obtidos de amostras clínicas de equinos da região sul do Brasil, por meio de análise filogenética e diferenciação de alelos com base no sequenciamento da região N-terminal do gene da proteína M.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Adenite equina

A adenite equina, também conhecida como garrotilho, é uma doença infecto-contagiosa aguda de distribuição mundial caracterizada por inflamação mucopurulenta do trato respiratório superior dos equinos (SCHILD, 2001) e responsável por aproximadamente 30% das notificações em todo o mundo (CHANTER, 1997). Esta enfermidade leva ao aumento de volume dos linfonodos retrofaríngeos e submandibulares, que obstruem a faringe e acarretam significativos prejuízos na performance do animal (ANZAI et al., 1999).

2.2 Etiologia

Essa doença é causada por *Streptococcus equi* subesp. *equi* (*S. equi*), uma bactéria Gram-positiva, encapsulada, β -hemolítica do grupo C de Lancefield, com morfologia de coco que forma longas cadeias de forma irregular. Em agar sangue, as colônias tem aspecto mucóide, cor de mel e apresentam uma ampla zona de hemólise. *S. equi* tem uma relação fenotípica e genética com *S. equi* subesp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*), ambos considerados espécies distintas até 1984 (FACKLAM, 2002), e também com *S. equi* subesp. *ruminatorum* (*S. ruminatorum*) (FERNANDES et al., 2004). Acredita-se que o *S. equi* possa ter evoluído do ancestral *S. zooepidemicus*, que é causador de doenças em equinos e também em outras espécies de animais, incluindo o homem (HOLDEN et al., 2009). Estes mesmos autores relatam que a complexa interação de especialização patogênica e o intercâmbio genético entre *S. equi*, *S. zooepidemicus*, *S. ruminatorum* e *S. pyogenes* continua a influenciar a evolução desses estreptococos importantes.

As diferenças fenotípicas entre as subespécies de *S. equi* são pequenas e convencionalmente são detectadas por meio de testes bioquímicos, principalmente a fermentação de carboidratos. Utiliza-se lactose, sorbitol, trealose e fator CAMP como critério para a diferenciação dessas três subespécies. *S. equi* não fermenta nenhum destes carboidratos enquanto *S. zooepidemicus* fermenta lactose e sorbitol (KUWAMOTO et al., 2001), e *S. ruminatorum* apresenta reação CAMP positiva com *Staphylococcus aureus* (FERNANDES et al., 2004). Porém, muitas vezes a caracterização fenotípica tradicional não é capaz de diferenciar as subespécies devido à existência de cepas de *S. equi* atípicas fermentadoras de

trealose, lactose ou ambos (GRANT et al., 1993). Com isso, métodos moleculares vêm ganhando espaço como ferramenta para diferenciação de subespécies, bem como diferenciação de isolados. Esses métodos envolvem técnicas de sequenciamento da região intergênica 16S-23S para identificação das subespécies de *Streptococcus* do grupo C de Lancefield (CHANTER et al., 1999), caracterização molecular da proteína M (WALKER & TIMONEY, 1998), técnicas de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RADP-PCR) e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) em investigação de surtos (GONZALEZ-REY et al., 2003), PCR multiplex para caracterização de espécies (ALBER et al., 2004) e sequenciamento do gene hsp60 (SILVA et al., 2007).

2.3 Epidemiologia

A infecção por *S. equi* ocorre através da inalação e/ou ingestão do micro-organismo, seguido pela fixação deste no epitélio nasofaríngeo e migração para os linfonodos regionais (TIMONEY, 2004). Os principais sinais clínicos da adenite são febre, corrimento nasal e enfartamento de linfonodos, que resulta da dificuldade de fagocitose por células de defesa devido a presença da cápsula de ácido hialurônico e proteína M (BOSCHWITZ & TIMONEY, 1994; ANZAI et al., 1999).

Em surtos de adenite, são de grande importância os fatores predisponentes na transmissão e disseminação da doença, tais como fatores estressantes como desmame, viagens, alterações climáticas bruscas, doenças concomitantes, superlotação, deficiências nutricionais, parasitismo, transporte, idade e estação de monta onde são agrupados animais de diferentes origens. Os equinos de sobreano são mais predispostos a desenvolver adenite, seguidos de potros desmamados e adultos (YELLE, 1987). Outro importante fator na disseminação do agente etiológico da adenite é a existência de animais portadores assintomáticos, que geralmente abrigam a bactéria nas bolsas guturais. O diagnóstico nesses casos é complexo, pois a forma mais eficiente é o exame endoscópico das bolsas guturais, que é utilizado para coleta de material a ser enviado para diagnóstico laboratorial por PCR e cultura (NEWTON et al., 2000), e visualização de condróides (concreções esféricas), formados quando ocorre a drenagem de pus dos linfonodos abscedados para o interior das bolsas guturais (NEWTON et al., 1997).

2.4 Tratamento e controle

O uso de antimicrobianos no tratamento da adenite equina é controverso. Embora *S. equi* seja sensível à maioria dos antimicrobianos *in vitro* (KIRINUS et al., 2010), essa terapia é eficiente somente na fase inicial da doença, caracterizada por febre e depressão, prevenindo a formação de abscessos (HARRINGTON et al., 2002). No entanto, o tratamento nessa fase pode inibir o desenvolvimento de imunidade (SWEENEY et al., 2005). Por outro lado, nos casos em que ocorre o enfartamento de linfonodos, o tratamento geralmente é ineficiente devido a vascularização insuficiente no abscesso para permitir a penetração de antibióticos em níveis adequados (HARRINGTON et al., 2002). A recomendação nesse momento é acelerar o processo inflamatório (maturação do abscesso) com a aplicação de pomadas rubefascentes para antecipar a supuração dos abscessos (SWEENEY et al., 2005).

Nos casos de surtos de adenite, o manejo dos equinos doentes é o fator mais importante no controle da disseminação da doença. Animais doentes devem ser imediatamente separados e submetidos ao tratamento de acordo com a evolução do caso, e os equipamentos e instalações devem ser devidamente higienizados e desinfetados. (SWEENEY et al., 2005).

A imunização com vacinas contendo bactérias inativadas (bacterinas) como forma de prevenção da enfermidade não asseguram um controle satisfatório, pois conferem apenas cerca de 50% de imunidade nos animais vacinados (TIMONEY & EGGERS, 1985; JORM, 1990). Por razão desta baixa eficiência, foi desenvolvida uma vacina de inoculação intranasal produzida com uma cepa de *S. equi* atenuada denominada *Pinnacle* (WALKER & TIMONEY, 2002). Esta atenuação foi realizada por mutações induzidas que tornaram esta cepa incapaz de produzir cápsula. Porém, a reversão dessas mutações e o retorno da produção de cápsula pela bactéria é possível, revertendo a virulência e desenvolvendo doença nos animais (WALKER & TIMONEY, 2002). Vacinas experimentais estão sendo desenvolvidas a partir de tecnologias de DNA recombinante. Imunógenos contendo a proteína M de *S. equi* como antígeno têm demonstrado eficiência em estudos com ratos desafiados pós vacinação, mas ainda não demonstram proteção satisfatória em equinos (MEEHAN et al., 1998; SHEORAN et al., 2002). Da mesma forma, a vacinação com proteína associada ao hialuronato (HAP), que forma a cápsula do *S. equi*, demonstrou proteção em camundongos, mas não conseguiu impedir o desenvolvimento de adenite em equinos vacinados (CHANTER et al., 1999).

2.5 Proteína M de *S. equi*

Em uma revisão sobre as bases moleculares da infecção por *S. equi*, HARRINGTON et al. (2002) agruparam os fatores de virulência, conforme a função exercida, em categorias como a aderência bacteriana, evasão do sistema imune e aquisição de nutrientes, embora alguns dos fatores tenham múltipla função. Dentre esses fatores de virulência da bactéria, a proteína M, de 58 kDa codificada pelo gene SeM, tem especial importância (HARRINGTON et al., 2002). Esta foi caracterizada pela primeira vez por GALÁN & TIMONEY (1987), que clonaram seu gene e expressaram em *Escherichia coli*. A proteína M tem aspecto de fimbria que se projeta a partir da parede celular bacteriana, possui característica ácido resistente (GALÁN & TIMONEY, 1987), e atividade de aderência e antifagocítica, inibindo a deposição do componente C3b do complemento na superfície bacteriana. Essa também impede a ligação e inativa o fibrinogênio e a imunoglobulina G, inibindo a fagocitose por neutrófilos e macrófagos (BOSCHWITZ & TIMONEY, 1994; MEEHAN et al., 2000).

A proteína M vem sendo utilizada para diagnóstico da Adenite, além de ser uma candidata promissora a antígeno vacinal (TIMONEY & MUKHTAR, 1993), embora a utilização de proteína M purificada como antígeno vacinal não tenha conferido proteção significativa em equinos vacinados após serem desafiados com *S. equi* (SHEORAN et al., 2002). Até então acreditava-se que a sequência do gene da proteína M de diferentes isolados de *S. equi* era altamente homogênea (GALAN & TIMONEY 1988), contudo dados recentes identificaram variações na região N-terminal dessa proteína (ANZAI et al., 2005). Em seguida KELLY et al. (2006) demonstraram o potencial para a exploração da variação dessa região, utilizando-a como ferramenta epidemiológica na caracterização de surtos da doença produzida por *S. equi*.

O sequenciamento da região variável da proteína M, em surtos de adenite no Reino Unido nos anos de 2007 e 2008, permitiu identificar uma mudança nas frequências alélicas entre as cepas circulantes neste período, sugerindo pressão seletiva nesses isolados (IVENS et al., 2011). Além disso, PARKINSON et al. (2011) demonstram evidências de mutações no gene SeM que podem levar ao surgimento de novos alelos geograficamente relacionados. Estes afirmam que o sequenciamento do gene SeM é uma ferramenta útil para a elucidação da epidemiologia de adenite equina a nível regional e nacional.

Essas variações na região N-terminal alteram a conformação de epitopos e determinam mudanças na virulência, influenciando diretamente a resposta imunológica mediada por IgA e linfócitos T (TIMONEY et al., 2010). Isso facilita a colonização da mucosa por *S. equi*, mas

não altera a ação de anticorpos opsonizantes (TIMONEY et al., 2010). Além disso, *S. equi* produz endopeptidases (IdE e IdE2) que clivam IgG, reduzindo a opsonização que auxilia na fagocitose (LANNERGARD & GUSS, 2006; HULTING et al., 2009). Estudos demonstram que a inclusão de IdE e IdE2 aumentam a eficácia em vacinas de subunidade, demonstrando a importância dessas enzimas para evasão do sistema imune e o desenvolvimento de imunidade protetora contra *S. equi* em equinos (GUSS et al., 2009).

3 CAPÍTULO 1

Diversidade de SeM em isolados de *Streptococcus equi* subespécie *equi* em surtos de adenite equina no Rio Grande do Sul - Brasil

Felipe Libardoni, Agueda Castagna de Vargas

Diversidade de SeM em *Streptococcus equi* subespécie *equi* isolados de surtos de adenite equina no Rio Grande do Sul - Brasil

Diversity of SeM in *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from strangles outbreaks in Rio Grande do Sul - Brazil

Felipe Libardoni¹ Agueda Castagna de Vargas²

RESUMO

A adenite equina, causada por *Streptococcus equi* subespécie *equi* (*S. equi*), é uma das principais doenças respiratórias de equinos, provocando grandes prejuízos econômicos. Estudos moleculares demonstram diferenças na região N-terminal na sequência do gene codificador da proteína M (SeM) de *S. equi*. Esta região do gene já foi utilizada na diferenciação de isolados por meio da caracterização de diferentes alelos. Este estudo objetivou analisar e diferenciar 47 isolados de *S. equi* provenientes de amostras clínicas de equinos da região sul do Brasil, procedentes de 15 animais Puro Sangue de Corrida (PSC), 29 da raça Crioula e três da raça Brasileiro de Hipismo (BH), por meio de análise filogenética e diferenciação de alelos, com base no sequenciamento da região N-terminal do gene SeM. As amostras foram oriundas de 31 surtos de adenite equina em 20 estabelecimentos de criação. Foram encontrados 15 alelos do gene SeM, dentre estes apenas um (alelo 9) está disponível no banco de dados PubMLST-SeM (alelo 61). Ele foi identificado em 7 isolados (14,9%), isto demonstra a diversidade da proteína M na população estudada. Entre os novos alelos identificados, o alelo 1 foi o mais prevalente com 13 isolados (27,7%), seguido pelo alelo 3

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Bolsista CNPq

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Professor Associado. E-mail: agueda.vargas@gmail.com 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Autor para correspondência.

com 10 isolados (21,3%). Portanto o sequenciamento da região N-terminal do gene da proteína M do *S. equi* é uma ferramenta útil na investigação epidemiológica permitindo a diferenciação de isolados em surtos de adenite equina com a identificação de alelos em populações de equinos, bem como no controle da enfermidade com a orientação na escolha de cepas para confecção de vacinas comerciais e autógenas.

Palavras-chave: Garrotilho, Proteína M, equino, alelos.

ABSTRACT

Strangles, caused by *Streptococcus equi subsp. equi* (*S. equi*) is a major respiratory disease of horses, causing great economic losses. Molecular studies have shown differences in the N-terminal sequence of the M protein (SeM) gene of *S. equi*. This gene region has been used in isolate differentiation by characterization of different alleles. This study aimed to analyze and differentiate 47 isolates of *S. equi* from equine clinical specimens from southern Brazil, coming from 15 Thoroughbreds, 29 of the Crioula horses and 3 Brasileiro de Hipismo horses (BH), through phylogenetic analysis and differentiation of alleles by the SeM gene N-terminal region sequence. The samples were derived from 31 outbreaks in 20 premises. Fifteen alleles were identified amongst which only one available in the PubMLST-SEM database (allele 61) with 7 isolates (14.9%). Among the new identified alleles number 1 was the most prevalent with 13 isolates (27.7%), followed by allele 3 with 10 isolates (21.3%). Therefore the N-terminal sequence of the SeM gene of the *S. equi* isolates is a useful tool in epidemiological investigation to isolate differentiation in strangles outbreaks with the identification of alleles in horses populations, as well as to control the disease guiding the selection of strains for production of commercial and autogenous vaccines.

Key words: M protein, equine, alleles, adenitis, strangles.

INTRODUÇÃO

A adenite equina é a principal doença que envolve o trato respiratório superior de equinos (SLATER, 2007). A etiologia primária é atribuída ao *Streptococcus equi subespécie equi* (*S. equi*), uma bactéria β -hemolítica pertencente ao grupo C de Lancefield. *S. equi* está intimamente relacionado ao seu ancestral *Streptococcus equi subesp. zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*), um comensal do trato respiratório dos equinos que pode ocasionar infecções oportunistas (HOLDEN et al., 2009).

A proteína M (SeM) é um antígeno de superfície produzido por *S. equi* que aumenta sua virulência em relação a *S. zooepidemicus*. SeM se liga ao fibrinogênio e as imunoglobulinas G (IgG) inibindo a deposição de C3b do complemento na superfície da bactéria, resultando em uma ação antifagocítica (BOSCHWITZ & TIMONEY, 1994; MEEHAN et al., 2001). A utilização de SeM recombinante como alvo vacinal obteve sucesso em experimentos com camundongos (MEEHAN, et al., 1998) porém, os mesmos resultados não foram alcançados com equinos. Este fato conduz à hipótese de existência de possíveis variações estruturais dessa proteína (SHEORAN et al., 2002), contrariando a proposição de ausência de variação (GALAN & TIMONEY, 1988).

Estudos moleculares demonstram diferenças (mutações) na sequência do gene codificador da proteína M, localizadas na região N-terminal (CHANTER et al., 2000; ANZAI et al., 2005). Esta região do gene SeM já foi utilizada na diferenciação de isolados (ANZAI et al., 2005) e na identificação de fontes de surtos. Além disso, foram evidenciadas mudanças nas frequências alélicas entre cepas em um determinado período, sugerindo pressão de seleção nesses isolados (KELLY et al., 2006; IVENS et al., 2011). Devido à importância do melhor entendimento da adenite equina e do seu agente etiológico, associada à ausência de estudos referentes a variações de alelos da proteína M em isolados brasileiros, este estudo objetivou analisar e diferenciar isolados de *S. equi*, obtidos de amostras clínicas de equinos do Rio

Grande do Sul, Brasil, por meio de análise filogenética e diferenciação de alelos com base no sequenciamento da região N-terminal do gene SeM.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização dos isolados

Foram utilizados 47 isolados bacterianos provenientes de amostras de secreção nasal e aspirados de linfonodo de equinos (três da raça Brasileiro de Hipismo (BH); 15 Puro Sangue de Corrida (PSC) e 29 da raça Crioula) com sinais clínicos de adenite equina enviadas para diagnóstico laboratorial. As amostras foram oriundas de 31 surtos ocorridos em 20 estabelecimentos de criação objeto da pesquisa (identificadas com letras maiúsculas) localizados no Rio Grande do Sul – Brasil no período de 1994 a 2010 (Tabela 1). Os isolados foram previamente caracterizados como *S. equi* por meio de análise morfo-tintorial e testes de fermentação de açúcares de acordo com MACFADDIN (2000), KUWAMOTO et al. (2001) e SILVA et al. (2007), e mantidas liofilizadas. Os isolados foram cultivados em meio ágar sangue (sangue ovino 5%) e incubados em aerobiose à 37°C, por um período de 48 horas, para posterior extração do DNA bacteriano e processamento molecular.

Extração de DNA, PCR e sequenciamento

As células bacterianas dos isolados de *S. equi* foram suspensas em 1mL de água mili-Q para realização da extração de DNA através do protocolo de CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) precedido por uma digestão com 5µL de proteinase K (20 mg/mL) por 60 minutos à 37°C, segundo SAMBROOK & RUSSELL (2001). Em seguida, o ácido nucléico foi extraído com fenol-clorofórmio tamponado. A precipitação foi realizada com isopropanol (*over night*) e etanol 70°GL. Após secagem, o pellet foi ressuscitado em água mili-Q.

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e os iniciadores senso ASW73 (5'-CAG AAA ACT AAG TGC CGG TG-3') e antisenso ASW74 (5'-ATT CGG TAA GAG CTT GAC GC-3') foi realizada segundo KELLY et al. (2006) para amplificação da região N-terminal do gene SeM. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L, contendo 5 μ L do Tampão GoTaq®, 10 μ M de cada iniciador, 200 μ M de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 1U de DNA Polimerase GoTaq®, 1 μ L de DNA molde (~50 ng) e água ultra pura. A amplificação foi realizada utilizando-se uma desnaturação inicial por 5 minutos à 95°C, seguida por 35 ciclos de 30 seg à 95°C, 30 seg à 55°C, 40 seg à 72°C e uma extensão final de 5 minutos à 72°C. Os produtos da amplificação foram verificados em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídio (0,5 μ g mL⁻¹).

O sequenciamento do produto de PCR das amostras foi realizado em triplicata na empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

Análise molecular e distribuição geográfica dos isolados

Os cromatogramas obtidos após o sequenciamento foram alinhados e analisados utilizando o programa Gap 4 do pacote Staden (STADEN, 1996). As 47 sequências consenso de 327 nucleotídeos obtidas foram comparadas com a sequência da proteína M de cepas disponíveis no GenBank (NCBI). Em seguida, foi realizado o alinhamento das sequências de nucleotídeos pelo método Clustal W e a tradução em aminoácidos, comparados com o isolado *S. equi* 4047 disponível no GenBank (Tabela 2). A identificação dos alelos foi realizada utilizando o programa MEGA 5, e todos alelos de proteína M encontrados foram comparados no banco de dados PubMLST-SeM (http://Pubmlst.org/perl/mlstdbnet/agdbnet.pl?file=sz_seM.xml). As relações filogenéticas

entre as seqüências foram estabelecidas através de uma árvore de Neighbor-joining construída utilizando o programa MEGA 5. Esta primeira árvore filogenética foi utilizada na escolha do melhor modelo de substituição nucleotídica pelo teste BIC (*Bayesian Information Criterion*) que apontou o modelo Tamura-3 parametros. A distribuição geográfica dos isolados foi realizada de acordo com informações disponíveis no histórico clínico das amostras.

RESULTADOS

Dentre os 47 isolados de *S. equi* analisados, foram encontrados 15 alelos SeM (agrupados e identificados com números arábicos) oriundos de 23 mudanças de nucleotídeos que resultaram em 17 alterações de aminoácidos (Tabela 2). De todos os alelos identificados nesse trabalho apenas o alelo 9 foi idêntico ao alelo SeM-61 quando comparados às seqüências depositadas no banco de dados PubMLST-SeM publicadas até 12 de Janeiro de 2012.

A frequência dos alelos é apresentada na Tabela 1, ordenada de acordo com a raça dos equinos acometidos por adenite. Dos 31 surtos (amostras isoladas em distintas datas) de adenite, ocorridos nos 20 estabelecimentos de criação, foi possível a identificação de diferentes alelos em surtos distintos no mesmo estabelecimento (estabelecimentos B, C, D, F, G, M, N e O), e também o mesmo alelo em surtos distintos (estabelecimento L). Além disso, em um mesmo surto ocorrido no estabelecimento C, foi verificada a presença de distintos alelos (3, 4 e 5). O alelo 1 foi o mais frequente (7 surtos – 23%), seguido pelo alelo 3 (6 surtos – 19%) e alelo 9 (5 surtos – 16%). Quando consideramos a distribuição dos alelos por surtos nas raças, o alelo 9 foi o de maior ocorrência em equinos PSC (4 surtos – 33%), e o alelo 1 (6 surtos – 32%) em Crioulos.

Conforme as diferenças nas seqüências do gene SeM entre os alelos, esses foram distribuídos em quatro grupos filogenéticos (Figura 1). Foi evidenciada uma maior distância

filogenética entre os alelos mais frequentemente identificados nas raças Crioula (alelo 1) e PSC (alelo 9). Além disso, no grupo 1 ficaram reunidos alelos de 16 surtos, dos quais 10 (62,5%) ocorreram em cavalos Crioulos, e no grupo 4 ficaram agrupados alelos de oito surtos, sendo seis (75%) em PSC.

Na análise da distribuição geográfica dos isolados, foi demonstrado uma grande dispersão dos alelos na raça Crioula (Figura 2). No entanto foi demonstrada uma concentração dos alelos 3 e 6 (19,14%) (Crioulos) em municípios adjacentes na região da depressão central do Rio Grande do Sul. Não foi possível uma análise da distribuição geográfica dos isolados em PSC, pois os mesmos tiveram amostras oriundas da mesma região, uma vez que a maior concentração de equinos dessa raça são criados neste local.

DISCUSSÃO

A consequência da variação de aminoácidos da proteína M em relação à virulência de *S. equi* ainda não está totalmente elucidada. Embora tenha sido demonstrado que a variabilidade da região N-terminal não compromete a ligação ao fibrinogênio e a reação imunológica mediada por anticorpos, esta interfere significativamente na resposta de IgA e células T (TIMONEY et al., 2010). Este fato evidencia a importância dessa região na resposta imune de mucosa e, portanto, no desenvolvimento da adenite equina ou proteção contra essa doença.

Esse estudo demonstrou a existência de grande variabilidade alélica do gene da proteína M de isolados brasileiros de *S. equi*. Dos 15 alelos identificados a partir dos 47 isolados, apenas o alelo 9 neste trabalho (Tabela 2) foi idêntico ao alelo SeM-61 (descrito no Reino Unido) quando comparados com o banco de dados de alelos da proteína M. Isso evidencia que isolados brasileiros de *S. equi* são distintos em relação a Europa e América do

Norte, o que é provavelmente explicado pelo isolamento geográfico, assim como WALLER & JOLLEY (2007) encontraram diferenças entre isolados europeus e norte americanos.

A ocorrência do alelo 9 predominante em cavalos brasileiros PSC, mesmo que em amostragem limitada, sugere a possibilidade desse isolado ter sido introduzido como resultado do movimento internacional de equinos, assim como relatado por IVENS et al. (2011) em isolados europeus, e ANZAI et al. (2005) que sugerem que isolados brasileiros e australianos podem ter sido originados da Europa. Cavalos PSC disputam competições internacionais, e frequentemente são adquiridos no mercado externo, ou enviados temporariamente para o exterior, entrando em contato direto com populações de outros países. Isso pode facilitar o intercâmbio de diferentes cepas de *S. equi*, explicando a identidade do alelo 9 de isolados brasileiros com o alelo SeM-61 descrito na europa.

Neste trabalho, foi verificado o predomínio de isolados do alelo 1 em cavalos da raça Crioula, que permaneceu na população de 1994 até 2010, e do alelo 9 na população de PSC, verificado entre os anos de 2006 e 2010 (Tabela 1). A capacidade de permanência de algumas cepas em uma população ao longo do tempo também foi demonstrada por PARKINSON et al. (2011) ao evidenciarem a maior prevalência de um alelo em cepas de *S. equi* de cavalos no Reino Unido entre os anos de 2007 e 2010. A maior frequência do alelo 9 em cavalos PSC e do alelo 1 em Crioulos pode ser justificada pelo fato dessas raças não terem um ambiente de convívio e circulação em comum, pois os PSC competem especificamente em provas de turfe e os Crioulos participam de competições e eventos nacionais específicos da raça. Isso é reforçado pela presença exclusiva dos alelos 2, 4, 6, 7 e 8 em cavalos Crioulos e os alelos 11, 12, 13 e 14 em cavalos PSC.

A variação do alelo causador de diferentes surtos em oito (88%) de nove estabelecimentos ao longo do tempo (B, C, D, F, G, M, N e O) (Tabela 1) pode estar relacionada a utilização de vacinas com cepas autógenas para adenite equina, um

procedimento muito utilizado pelos estabelecimentos de criação no Rio Grande do Sul para o controle dessa enfermidade (MABONI et al., 2010). Como a região N-terminal da proteína M de *S. equi* é extremamente imunogênica, e por isso constantemente estimulada a sofrer alterações para se evadir da ação do sistema imune (MEEHAN et al., 2001; BOSCHWITZ & TIMONEY, 1994), sugere-se que a vacinação autógena pode ter estimulado o *S. equi* de portadores ou enfermos a desenvolver modificações no gene da proteína M como forma de evasão do sistema imune, originando novos alelos.

A detecção de três alelos (3, 4, 5) em um surto e estabelecimento de criação, chama a atenção para a possibilidade de diferentes alelos estarem presentes no mesmo surto, ou que apenas um alelo desencadeie o surto, e por pressão imunológica venha a originar um novo alelo (KELLY et al., 2006). Os alelos 3 e 4 apresentaram relações filogenéticas muito próximas (Figura 1) e com mudança apenas no aminoácido 70 (Tabela 2) demonstrando a alta homologia entre esses alelos e a possível mutação durante o surto. Já o alelo 5 demonstrou uma maior similaridade com o alelo 2, e uma variação maior na sequência de aminoácidos em relação aos alelos 3 e 4. Somado a isso, a divisão filogenética na Figura 1 em quatro grupos demonstrou uma maior concentração de surtos nos grupos 1 e 4, com a maior ocorrência de surtos por cepas de *S. equi* dos alelos 1 e 9 nas raças Crioula e PSC, respectivamente.

A distribuição geográfica dos alelos (Figura 2) reflete claramente as práticas de criação de equinos no sul do Brasil. Ainda que as amostras estejam restritas ao Rio Grande do Sul (RS), o Estado possui o terceiro maior rebanho equino do Brasil (BRASIL, 2010), onde se encontra a maior concentração de cavalos da raça Crioula, pois essa raça se originou nessa região, onde se encontram a maioria dos criatórios. Além disso, os principais haras brasileiros de PSC estão concentrados na região da campanha, em Bagé, no RS, que é tida como um dos locais mais favoráveis do mundo à criação de equinos. Ao mesmo tempo em que essa grande concentração regional viabiliza as práticas de criação, aumenta a disseminação de agentes

infecciosos entre os estabelecimentos, e isso explica a grande frequência do alelo 9 concentrada nos estabelecimentos de PSC em Bagé.

Estudos atuais buscam o desenvolvimento de métodos de prevenção mais eficientes contra a adenite equina. Dentre esses destaca-se a produção de vacinas com proteína M recombinante que embora aumentem a opsonização *in vitro* (TIMONEY et al., 1997), não conferem proteção clínica (SHEORAN et al., 2002). No entanto, são escassos os estudos que levam em consideração os alelos utilizados na produção de vacinas, e sua relação com os alelos presentes nas populações alvo. No Brasil estão disponíveis apenas bacterinas de *S. equi* (vacinas autógenas e comerciais), sem informação a que alelos pertencem. Com base nos dados apresentados nesse trabalho, seria viável a determinação dos alelos para orientação na seleção de cepas para a confecção de vacinas comerciais ou autógenas. Por outro lado o desenvolvimento de uma vacina experimental recombinante contendo os alelos 1 e 3 mais frequentes nas populações de BH e Crioulos, e os alelos 9 e 5 mais presentes em populações de PSC, pois de acordo com os resultados desse trabalho 61% dos surtos tiveram o envolvimento desses alelos.

CONCLUSÕES

Na população de cavalos estuda há grande diversidade de alelos de proteína M em isolados de *Streptococcus equi subespécie equi* em relação aos dados mundiais depositados no PubMLST-SeM. Apenas um alelo dentre os 15 identificados possui sequência já publicada. O sequenciamento da região N-terminal do gene da proteína M do *S. equi* é uma ferramenta útil na investigação epidemiológica para a diferenciação de isolados em surtos de adenite equina, com a identificação de alelos em populações de equinos, bem como no controle da enfermidade com a orientação na escolha de cepas para confecção de vacinas comerciais e autógenas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Mestrado para Felipe Libardoni – (552403/2010-5); bolsa de Iniciação Científica para Andréia Vielmo (507044/2010-0); bolsa de produtividade em pesquisa para Agueda Castagna de Vargas (313599/2009-2) e concessão de recursos no Edital Universal 14/2011 (481943/2011-0).

REFERÊNCIAS

- ANZAI, T. et al. Variation in the N-terminal region of an M-like protein of *Streptococcus equi* and evaluation of its potential as a tool in epidemiologic studies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 2167-2171, 2005.
- BOSCHWITZ, J.S.; TIMONEY, J. F. Inhibition of C3 deposition on *Streptococcus equi* subsp. *equi* by M protein: a mechanism for survival in equine blood. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 8, p. 3515-3520, 1994.
- BRASIL. Levantamento sistemático da produção agrícola – Ano de 2010. **Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística (IBGE)**. Acesso em 23 de Jan. de 2012. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=p&o=21&i=P>.
- CHANTER, N. et al. *Streptococcus equi* with truncated M-proteins isolated from outwardly healthy horses. **Microbiology**, v. 146, p. 1361-1369, 2000.
- GALAN, J.E.; TIMONEY, J.F. Immunologic and genetic comparison of *Streptococcus equi* isolates from the United States and Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 1142-1146, 1988.
- 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.

- IVENS, P.A.S. et al. Molecular characterization of ‘strangles’ outbreaks in the UK: the use of M-protein typing of *Streptococcus equi ssp. equi*. **Equine Veterinary Journal**, n. 43, n. 3, p. 359-364, 2011.
- 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. et al. 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.
- MABONI, G. et al. Uso experimental de uma vacina autógena contra adenite equina. **Anais das XVIII JORNADAS DE JÓVENES INVESTIGADORES DE AUGM.** 2010.
- MACFADDIN, J.F. **Biochemical testes for identification of medical bacteria**, 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 912p.
- MEEHAN, M. et al. Affinity purification and characterization of a fibrinogen-binding protein complex which protects mice against lethal challenge with *Streptococcus equi subsp. equi*. **Microbiology**, v. 144, p. 993-1003, 1998.
- MEEHAN, M. et al. The fibrinogen-binding protein (FgBP) of *Streptococcus equi subsp. equi* additionally binds IgG and contributes to virulence in a mouse model. **Microbiology**, v. 147, p. 3311-3322, 2001.
- PARKINSON, N.J. et al. Molecular epidemiology of strangles outbreaks in the UK during 2010. **Veterinary Record**, v. 168, p. 1-5, 2011.
- SAMBROOK, R.; RUSSEL D.W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001. 3v.
- SHEORAN, A.S. et al. Nasal mucosal immunogenicity for the horse of a SeM peptide of *Streptococcus equi* genetically coupled to cholera toxin. **Vaccine**, v. 20, p. 1653-1659, 2002.

- 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.
- SLATER, J. Bacterial infections of the equine respiratory tract. In **Equine Respiratory Medicine and Surgery**. Eds MCGORUM, B. C. et al. Saunders. P. 327-337, 2007.
- STADEN, R. The staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**. v. 5, n.3, p. 1596-1599, 1996.
- TIMONEY, J.F. et al. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-like proteins SeM and SzPSe. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9 p. 3600-3605, 1997.
- TIMONEY, J.F. et al. Affects of N-terminal variation in the SeM protein of *Streptococcus equi* on antibody and fibrinogen binding. **Vaccine**, v. 28, p. 1522-1527, 2010.
- WALLER, A.S.; JOLLEY, K.A. Getting a grip on strangles: recent progress towards improved diagnostics and vaccines. **Veterinary Journal**, v. 173, p. 492-501, 2007.

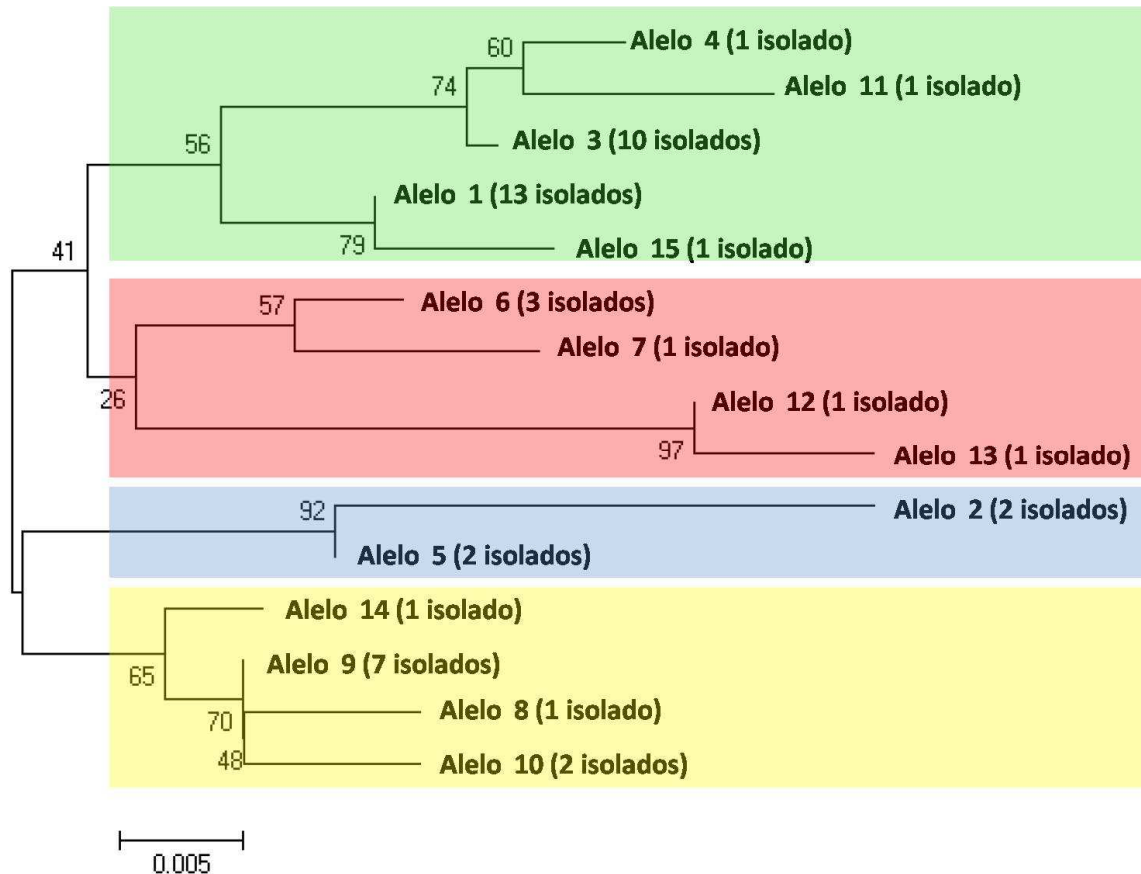


Figura 1: Árvore filogenética de Neighbour-joining construída com base nas sequências de nucleotídeos dos alelos SeM identificados em isolados de *Streptococcus equi* subespécie *equi* em surtos de adenite equina no Rio Grande do Sul – Brasil. Os valores de Bootstrap são mostrados nos ramos da árvore (foram realizadas 1000 repetições). A árvore foi dividida em quatro grupos: verde (grupo 1), vermelho (grupo 2), azul (grupo 3), amarelo (grupo 4).

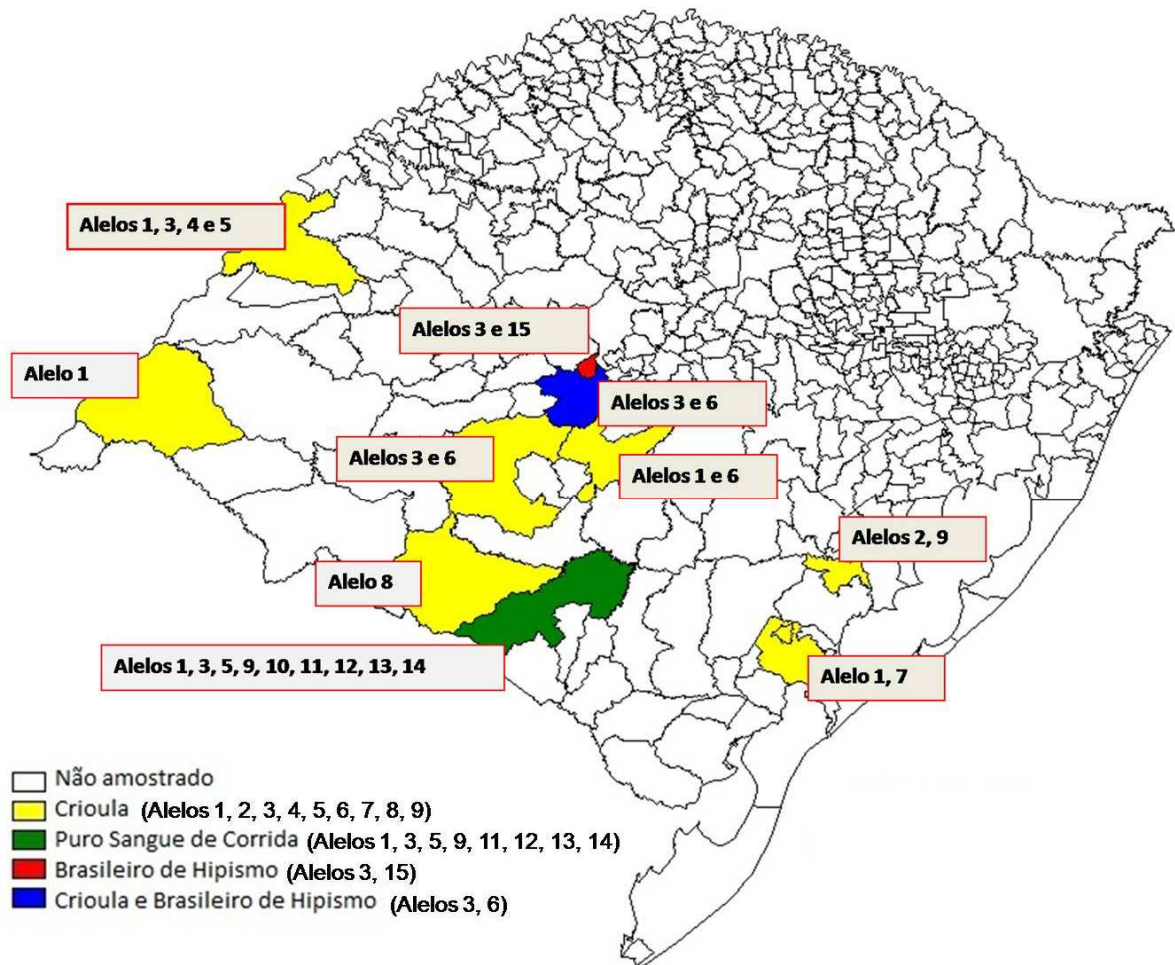


Figura 2: Distribuição geográfica dos 15 alelos identificados dos 47 isolados de *Streptococcus equi* subespécie *equi* oriundos de 20 estabelecimentos de criação no Rio Grande do Sul – Brasil, e respectivos grupos raciais.

Tabela 1 – Caracterização da origem (estabelecimento), dos surtos de adenite e isolados de *Streptococcus equi subespécie equi* oriundos de 20 estabelecimentos de criação de equinos tipo Puro Sangue de Corrida (PSC) e das raças Crioula, e Brasileiro de Hipismo (BH) localizados no Rio Grande do Sul – Brasil.

Estabelecimento	Surto	Alelo	Raça/Tipo	Isolado(os)
A	20/02/2008	1	Crioula	37/08-1, 37/08-V, 41/08-NV
B	16/07/2008	2	Crioula	53/08-2, 53/08-3
	14/12/2010	9	Crioula	178/10
C	30/07/2008	3	Crioula	152/08-1, 152/08-2, 152/08-3
	04/04/2009	3, 4, 5	Crioula	90/09-2, 90/09-1, 90/09-3
D	07/05/2007	6	Crioula	171/07
	20/11/2009	3	Crioula	261/09- 1, 261/09-4
E	08/08/2010	1	Crioula	105/10-C, 105/10-D, 105/10-E, 105/10-AA, 105/10-AC
F	07/03/2003	1	Crioula	78/03
	07/05/2003	1	Crioula	366/03
	23/11/2005	6	Crioula	566/05
G	19/08/2008	1	Crioula	162/08
	04/09/2009	7	Crioula	62/09
H	24/11/1994	1	Crioula	291/94
I	21/05/2010	8	Crioula	77/10
J	20/04/2009	6	Crioula	94/09-P
K	22/05/2009	3	Crioula	113/09
L	06/03/2008	9	PSC	47/08-2, 47/08-4
	10/12/2009	9	PSC	280/09
M	29/04/2009	3	PSC	97/09-C
	13/05/2010	10	PSC	68/10-C, 68/10-F
N	04/07/1994	5	PSC	99/94
	21/05/2002	11	PSC	204/02
	01/12/2006	9	PSC	702/06, 732/06
O	07/05/2003	1	PSC	166/03
	25/06/2008	9	PSC	128/08-N
P	06/11/2006	12	PSC	628/06
Q	16/07/2007	13	PSC	246/07
R	05/12/2008	14	PSC	272/08-J
S	29/04/2009	3	BH	91/09-H, 91/09-Q
T	05/05/2003	15	BH	126/03

Tabela 2: Comparação da sequência de aminoácidos da transcrição dos 15 alelos encontrados, entre os 47 isolados de *Streptococcus equi* subespécie *equi* oriundos de estabelecimentos de criação de equinos no Rio Grande do Sul – Brasil, tendo como referência o isolado de *Streptococcus equi* subespécie *equi* 4047 disponível no GenBank.

Alelo ^a (n ^b)	Raça/Tipo		Aminoácidos ^c																	
	BH ^d	CRL ^e	PSC ^f	14	15	20	21	23	36	38	45	56	66	67	70	71	85	88	94	95
4047	-	-	-	Asp	Leu	Ser	Glu	Ala	Asn	Leu	Asp	Ala	Tir	Asn	Val	His	Arg	Ser	Val	Asp
1 (13)	-	12	1	*	*	*	Asp	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2 (2)	-	2	-	Glu	Fen	Asn	*	Ile	*	*	*	*	*	*	Met	*	*	Asn	*	*
3 (10)	2	7	1	*	*	*	Val	*	*	*	*	*	*	*	Met	*	*	*	Ile	*
4 (1)	-	1	-	*	*	*	Val	*	*	*	*	*	*	*	Lis	*	*	*	Ile	*
5 (2)	-	1	1	*	Fen	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Met	*	*	Asn	*	*
6 (3)	-	3	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Met	*	Ser	*	*	*
7 (1)	-	1	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Met	Arg	Ser	*	*	*
8 (1)	-	1	-	*	*	*	Asp	*	*	*	Ala	*	*	*	Met	Arg	*	Asn	*	*
9 (7)	-	1	6	*	*	*	Asp	*	*	*	*	*	*	*	Met	Arg	*	Asn	*	*
10 (2)	-	-	2	*	*	*	Asp	*	*	*	*	*	*	Lis	Met	Arg	*	Asn	*	*
11 (1)	-	-	1	*	*	*	Val	*	Asp	*	*	*	*	*	Met	*	*	*	Ile	*
12 (1)	-	-	1	*	*	*	*	*	*	*	*	Glu	Cis	*	Gli	Arg	*	*	*	*
13 (1)	-	-	1	*	*	*	*	*	*	*	*	Glu	Cis	*	Gli	Arg	*	*	*	Asn
14 (1)	-	-	1	*	*	*	Asn	*	*	*	*	*	*	*	Met	Arg	*	Asn	*	*
15 (1)	1	-	-	*	*	*	Asp	*	*	Ile	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

^aNúmero atribuído ao alelo encontrado nesse trabalho

^bTotal de isolados do alelo

^c Aminoácidos diferentes em relação ao isolado 4047 são mostradas em negrito. Os asteriscos indicam o mesmo aminoácido.

^dRaça Brasileiro de Hipismo

^eRaça Crioula

^fTipo Puro Sangue de Corrida

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A região N-terminal da Proteína M de *Streptococcus equi* subespécie *equi* permite a diferenciação de isolados.

Foi encontrada uma grande diversidade de alelos na população de equinos no Sul do Brasil em relação as sequências mundiais.

Foi possível identificar diferenças na frequência de alelos em relação as raças estudadas, sendo o alelo 9 mais frequente em Puro Sangue de Corrida, e os alelos 1 e 3 mais frequentes em Crioulos, levantando a hipótese que talvez possa existir uma resistência racial a determinados alelos.

Como as amostras desse trabalho estão restritas ao Rio Grande do Sul, uma maior abrangência com amostragem de outros estados brasileiros poderia aumentar a diversidade e representatividade de alelos brasileiros, visto que o Brasil é considerado um país continental.

Trabalhos avaliando o Índice de Reatividade Cruzada do soro (em camundongos) poderiam demonstrar o perfil de respostas imunológicas entre os 15 alelos.

Experimentos para avaliar a influência da vacinação autógena como um fator que possa estimular *Streptococcus equi* subespécie *equi* a desenvolver modificações no gene da proteína M como forma de evasão do sistema imune, originando novos alelos, podem auxiliar a elucidar variabilidade alélica dos *S.equi*.

Futuros estudos devem ser realizados investigando a influência dos diferentes alelos em relação a virulência bacteriana e a resposta imune do hospedeiro, almejando melhorar a eficiência de vacinas comerciais utilizadas como forma de prevenção da adenite equina.

5 REFERÊNCIAS

ANZAI, T. et al. *Streptococcus equi* but not *Streptococcus zooepidemicus* produces potent mitogenic responses from equine peripheral blood mononuclear cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 67, p. 235-246, 1999.

ANZAI, T. et al. Variation in the N-terminal region of an M-like protein of *Streptococcus equi* and evaluation of its potential as a tool in epidemiologic studies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 2167–2171, 2005.

ALBER, J. et al. Multiplex Polymerase Chain Reaction for Identification and Differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* and *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, p. 455-458, 2004.

BOSCHWITZ, J. S.; TIMONEY, J.F. Characterization of the antiphagocytic activity of equine fibrinogen for *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **Microbial Pathogenesis**, n. 17, p. 121–129, 1994.

BRASIL. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – Ano de 2010. **Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística (IBGE)**. Acesso em 23 de Jan. de 2012. Disponível em:
<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=p&o=21&i=P>.

CHANTER, N. Streptococci and enterococci as animal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 1005-1095, 1997.

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.

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

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

FERNANDEZ, E. et al. *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* subsp. nov., isolated from mastitis in small ruminants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2291–2296, 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*. **Infection and Immunity**, n. 55, p. 3181–3187, 1987.

GALAN, J. E.; TIMONEY, J. F. Immunologic and genetic comparison of *Streptococcus equi* isolates from the United States and Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 1142–1146, 1988.

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.

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.

GUSS, B. et al. Getting to grips with strangles: an effective multi-component recombinant vaccine for the protection of horses from *Streptococcus equi* infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 9, 2009.

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

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.

HULTING, G. et al. Two novel IgG endopeptidases of *Streptococcus equi*. **FEMS Microbiol Letters**, v. 298, p.44–50, 2009.

IVENS, P. A. et al. Molecular characterisation of ‘strangles’ outbreaks in the UK: the use of M-protein typing of *Streptococcus equi* ssp. *equi*. **Equine Veterinarian Journal**, v. 43, p. 359–364, 2011.

JORM, L. R. Strangles in horse studs: incidence, risk factors and effect of vaccination. **Australian Veterinary Journal**, v. 67, p. 436–439, 1990.

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, p. 480–486, 2006.

KIRINUS, J. K. et al. Perfil fenotípico e susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus equi* isolados de equinos da região Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária brasileira**, v. 31, n. 3, p. 231-238, 2010.

KUWAMOTO, Y. et al. 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.

LANNERGARD, J.; GUSS, B. IdeE, an IgG-endopeptidase of *Streptococcus equi* ssp. *equi*. **FEMS Microbiol Letters**, v. 262, p. 230–235, 2006.

MEEHAN, M. et al. Affinity purification and characterization of a fibrinogen-binding protein complex which protects mice against lethal challenge with *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **Microbiology**, v. 144, p. 993–1003, 1998.

MEEHAN, M., et al. Localization and characterization of the ligand-binding domain of the fibrinogen-binding protein (FgBP) of *Streptococcus equi* subsp. *equi*, **Microbiology**, v. 146, p. 1187–1194, 2000.

NEWTON, J. R. et al. Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*. **Veterinary Record**, v. 140, p. 84–90, 1997.

NEWTON, J. R. et al. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, p. 515–526, 2000.

PARKINSON, N. J. et al. Molecular epidemiology of strangles outbreaks in the UK during 2010. **Veterinary Record**, v. 168, p. 1-5, 2011.

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.

SHEORAN, A. S. et al. Nasal mucosal immunogenicity for the horse of a SeM peptide of *Streptococcus equi* genetically coupled to cholera toxin. **Vaccine**, v. 20, p. 1653–1659, 2002.

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.

SWEENEY, C. R. et al. *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 123–134, 2005.

TIMONEY, J. F.; EGGERS, D. Serum bactericidal responses to *Streptococcus equi* of horses following infection or vaccination. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, p. 306–310, 1985.

TIMONEY, J. F.; MUKHTAR, M. M. The protective M proteins of the equine group C streptococci. **Veterinary Microbiology**, v. 37 p. 389–395, 1993.

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

TIMONEY, J. F. et al. Affects of N-terminal variation in the SeM protein of *Streptococcus equi* on antibody and fibrinogen binding. **Vaccine**, v. 28, p. 1522–1527, 2010.

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.

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

YELLE M. T. Clinical aspects of *Streptococcus equi* infection. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, p. 158-162, 1987.