

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

Caiane Tasca

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Streptococcus equi* SUBESPÉCIE *equi* ISOLADOS DE EQUINOS DOENTES E PORTADORES NO RIO GRANDE DO SUL

Santa Maria, RS
2018

Caiane Tasca

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Streptococcus equi* SUBESPÉCIE *equi* ISOLADOS DE EQUINOS DOENTES E PORTADORES NO RIO GRANDE DO SUL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof^a Dr^a. Agueda Castagna de Vargas

Santa Maria, RS
2018

Caiane Tasca

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Streptococcus equi* SUBESPÉCIE *equi* ISOLADOS DE EQUINOS DOENTES E PORTADORES NO RIO GRANDE DO SUL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Aprovado em 23 de fevereiro de 2018:

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

Letícia Trevisan Gressler, PhD. (IFF/FW)

Carla Paola Bustos, Dra. (UBA) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Antonio e Maria Stela,
pela educação recebida, pelo exemplo de luta,
força e determinação.
Por apoiarem e incentivarem meus sonhos!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por clarear meus pensamentos nos momentos difíceis e dar força para seguir em frente.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de desfrutar da excelência no ensino desde a graduação. Ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de cursar o mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de mestrado.

Ao Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da Universidade Federal de Santa Maria por disponibilizar a estrutura para a realização de estágio, iniciação científica e experimentos.

À coordenadora do LABAC e orientadora, professora Agueda Castagna de Vargas, pela confiança e ensinamentos.

Às minhas mentoras do LABAC, Rosangela Ziech e Cláudia Balzan – as queridas Rô e a Claudinha – pela paciência, pela disponibilidade, por tudo que me ensinaram (principalmente a paixão pelas bacs) e pelo exemplo de força e determinação. Vocês detêm grande parte do mérito pelo meu trabalho.

A toda equipe do LABAC, aos colegas atuais - Julia, Valessa, Bibiana Petri, Evelyn, Bibiana Barasoul, Adriana, Bruna, Alexandra, Igor, Letícia, Carolina, João, Mateus e Victória – e aos antigos Luana, Letícia Matter, Letícia Trevisan, Denis, Felipe, Grazieli, Ananda, Giovana, pelo auxílio nos experimentos e rotina, pelo trabalho em equipe, pelo conhecimento repassado e pela convivência diária.

À minha família, pelo suporte financeiro e emocional. Por ter entendido e apoiado desde sempre minha decisão de ir para longe...

Às colegas e amigas que a Veterinária me deu de presente, Alessandra Bridi, Alice Demori, Anieli Pohl, Elisiane Camana, Suelen Soares e Taiara M. da Silva pelos conselhos, pelo colo, pelo carinho, pela parceria, pela troca de conhecimentos, pelas ‘consultorias’... enfim, por todos os momentos inesquecíveis! Sem dúvida vocês me ajudaram a amadurecer e me tornar uma pessoa melhor.

Ao meu amor, amigo e parceiro, Bruno, por todo apoio e carinho ao longo dos últimos anos. Contigo ao meu lado o mundo se tornou mais leve.

A todos que de alguma forma contribuíram na minha formação, o meu muito obrigada!

*“A capacidade de errar ligeiramente é verdadeira maravilha do DNA.
Sem esse atributo especial,
seríamos ainda bactérias anaeróbias
e a música não existiria...”*
(Lewis, Thomas)

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Streptococcus equi* SUBESPÉCIE *equi* ISOLADOS DE EQUINOS DOENTES E PORTADORES NO RIO GRANDE DO SUL

AUTORA: Caiane Tasca

ORIENTADORA: Agueda Castagna de Vargas

Streptococcus equi subespécie *equi* (*S. equi*) é o agente causador da adenite equina, uma das doenças infecciosas mais frequentemente diagnosticadas em todo o mundo. Após a doença aguda de curta duração, caracterizada pelo enfartamento dos linfonodos da cabeça e pescoço, parte dos equinos permanece portador da bactéria por longos períodos, sendo este o ponto chave para a manutenção do agente e ocorrência da doença de forma contínua. Em vista disso, se torna importante entender o que desencadeia o estado de portador, o motivo de nem todos os animais conseguirem eliminar a bactéria após a melhora clínica. Esta dissertação descreve a caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *S. equi* isoladas de equinos doentes (n=42) e portadores (n=18) no estado do Rio Grande do Sul. Por meio da avaliação da coloração e aspecto das colônias, provas de fermentação de açúcares (ribose, lactose, trealose e sorbitol), visualização da cápsula, teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, avaliação da capacidade de formação de biofilme e detecção de genes que codificam fatores de virulência (*hasA*, *hasB*, *hasC*, *eqbE*, *eqbG*, *seeH* e *seeI*) foi possível evidenciar diferenças consideráveis entre os dois grupos de isolados. *S. equi* isolados de equinos portadores apresentaram colônias opacas e branco-acinzentadas (100%), cápsula em pequena quantidade (38,9%) ou ausente (61,1%), com capacidade de fermentar pelo menos dois dos açúcares testados (100%) e resistência em média a 3,6 (1-7) classes de antimicrobianos. Por outro lado, cepas isoladas de equinos doentes apresentaram predominantemente colônias mucóides e cor de mel (95,2%), com muita cápsula (92,8%), incapazes de fermentar qualquer um dos açúcares (92,8%) e resistentes em média a 2,1 (0-7) classes de antimicrobianos. Foi observada uma maior proporção de cepas multirresistentes no grupo de isolados de animais portadores (13/18 = 72,2%) em comparação ao grupo de isolados de animais doentes (5/42 = 11,9%). Capacidade de formar biofilme foi detectada em 94,4% dos isolados de animais doentes e 78,6% de portadores, não havendo diferença entre os grupos. Todos os isolados de equinos portadores apresentaram deleção do gene *eqbE* e 66,7% dos mesmos também em *hasA* e *hasB*. A perda desses loci gênicos por isolados de equinos portadores já havia sido reportada em outro estudo. Desta forma, nossos resultados complementam os da literatura internacional ao associar as características genotípicas dos isolados de animais portadores com suas características fenotípicas, e evidenciar diferenças com aquelas de isolados de equinos com manifestação clínica. Estudos mais aprofundados são necessários para elucidar quais outros eventos estão envolvidos na persistência de *S. equi* no hospedeiro após a cura clínica.

Palavras-chave: Portadores, cápsula, fermentação de açúcares, biofilme, resistência aos antimicrobianos, equibactin.

ABSTRACT

PHENOTYPICAL AND GENOTYPICAL CHARACTERIZATION OF *Streptococcus equi* subsp. *equi* ISOLATED FROM DISEASED AND CARRIER HORSES IN RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: Caiane Tasca

ADVISOR: Agueda Castagna de Vargas

Streptococcus equi subspecies *equi* (*S. equi*) is the causative agent of strangles, one of the most frequently diagnosed infectious disease worldwide. After the short duration acute disease, characterized by abscess formation in the head and neck lymph nodes, some horses remain as *S. equi* carriers for long periods. Equine carriers are the key point for the bacteria maintenance and occurrence of the disease continuously. Therefore, it becomes important to understand what triggers the carrier state, why not all animals can eliminate the bacteria after clinical improvement. This dissertation describes the phenotypic and genotypic characterization of *S. equi* strains isolated from diseased horses (n = 42) and carriers (n = 18) in the Rio Grande do Sul state. Evaluating colonies' color and appearance, sugars fermentation tests (ribose, lactose, trehalose and sorbitol), capsule visualization, antimicrobial susceptibility test, biofilm formation capacity and detection of virulence factors encoding genes (*hasA*, *hasB*, *hasC*, *eqbE*, *eqbG*, *seeH* and *seeI*) it was possible to show considerable differences between the two groups of isolates. *S. equi* isolated from equine carriers presented dry, opaque and white-gray colonies (100%), capsule in small quantity (38.9%) or absent (61.1%), capable of fermenting at least two sugars tested (100%) and resistance on average to 3.6 (1-7) antimicrobials classes. On the other hand, strains isolated from diseased horses had predominantly mucoid and honey color colonies (95.2%), with a large capsule (92.8%), unable to ferment any of the sugars (92.8%) and resistant in mean to 2.1 (0-7) antimicrobials classes. A higher proportion of multiresistant strains was observed in the isolates from carrier animals group (13/18 = 72.2%) compared to the group of isolates from diseased animals (5/42 = 11.9%). Biofilm formation capacity was detected in 94.4% of the isolates from diseased animals and 78.6% from carriers, with no difference between the groups. All the equine carriers' isolates showed deletion of the *eqbE* gene and 66.7% of them also in *hasA* and *hasB* genes. The loss of these gene loci by isolates from carrier horses had already been reported in another study. Thus, our results complement those of the international literature by associating the genotypic characteristics of the isolates of animal carriers with their phenotypic characteristics, and evidencing differences with those isolated from horses with clinical manifestation. Further studies are needed to elucidate which other events are associated to the persistence of *S. equi* in the host after clinical cure.

Keywords: Carriers, capsule, fermentation of sugars, biofilm, antimicrobial resistance, equibactin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização do operon <i>has</i> em diferentes espécies de <i>Streptococcus</i> e relação de parentesco entre os mesmos.	22
Figura 2 – Representação esquemática das deleções encontradas no locus <i>has</i> em <i>S. equi</i> isolados de equinos portadores.	23
Figura 3 – Representação esquemática do locus ICESe2.	25
Figura 4 – Representação esquemática das deleções encontradas no locus ICESe2 em <i>S. equi</i> isolados de equinos portadores	26

ARTIGO

Figura 5 – (Fig.1). Negative staining with India ink showing isolates with absence of capsule (A), few capsule (B) and lots of capsule (C). The arrows indicate the location of the capsule, involving Gram-positive cocci. Optical microscope. 1000x magnification.	57
Figura 6 – (Fig.2). Antimicrobials susceptibility profile of <i>S. equi</i> isolated from diseased and carriers horses. Bars indicate the proportion of isolates resistant to each antimicrobial.	58
Figura 7 – (Fig.3). Result of the in vitro biofilm formation capacity test for isolates of diseased horses and carriers. The results are expressed as percentage of isolates for each category.....	59

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1. List of the primers used in this study.	54
Table 2. Phenotypic characteristics of the 60 <i>S. equi</i> isolates used in this study and the ATCC® 39506.	55
Table 3. PCR results for <i>hasA/B</i> , <i>hasB/C</i> , <i>eqbE</i> , <i>eqbG</i> , <i>seeH</i> and <i>seeI</i> genes of the 60 <i>S. equi</i> isolates used in this study and the ATCC® 39506.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

100x: cem vezes
1:100: um para cem
A: adenine (adenina)
Amg: aminoglicosídeos
AMP: ampicilina
Ans: ansamicinas
Atb: antimicrobiano
ATCC[®]: American Type Culture Collection
Beta-Lact.: beta-lactâmicos
BHII: Brain heart infusion (Infusão cérebro coração)
C: cytosine (citosina)
CFL: cefalotina
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
cm: centímetro
CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO₂: dióxido de carbono
CTAB: Cetyl trimethylammonium bromide / Brometo de Cetrimônio
CTF: ceftiofur
DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTP: deoxynucleotide triphosphate
ENO: enrofloxacina
eqbE: gene que codifica um NRPS do sideróforo equibactin
eqbG: gene que codifica um NRPS do sideróforo equibactin
ERI: eritromicina
EST: estreptomicina
EUA: Estados Unidos da América
F: forward
Fen: fenicóis
FLO: florfenicol
G: guanine (guanina)
GEN: gentamicina
hasA: gene hialuronato sintase
hasB: gene UDP-glicose dehidogenase
hasC: gene UDP-glicose pirofosforilase
HS: horse serum / soro equino
ICE: elemento integrativo conjugativo
IFN γ : interferon γ
IRCA: índice de resistência múltipla por classe de antimicrobianos
IRMA: índice de resistência múltipla aos antimicrobianos
IvF: inibidores da via do folato
LABAC: Laboratório de Bacteriologia

Mac: macrolídeos;
MHC II: complexo maior de histocompatibilidade de classe II
ml: mililitro
min: minuto (s)
mm: milímetro
mM: miliMolar / miliMol
ng: nanograma
nm: nanômetro
NRPS: peptídeo sintase não ribossomal
OD/DO: densidade óptica / optical density
ODc: corrected optical density (densidade óptica corrigida)
Odx: quadruplicate mean optical density (densidade óptica média da cepa)
OIE: Organização Mundial da Saúde Animal
Pb (bp): pares de bases / base pairs
PCR: reação em cadeia da polimerase
PEN: penicilina G
Qui: quinolonas;
R: reverse
RIF: rifampicina
rpm: rotações por minuto
RS: Rio Grande do Sul
seeH: gene que codifica o superantígeno H de *S. equi*
seeI: gene que codifica o superantígeno I de *S. equi*
seM: M protein (proteína M de *Streptococcus equi* subespécie *equi*)
seM: gene que codifica a proteína M
S. equi: *Streptococcus equi* subespécie *equi*
S. zooepidemicus: *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus*
SUBESP. / SUBSP.: subespécie
SUT: sulfazotrin
T: timine (timina)
TET: tetraciclina
Tet: tetraciclinas
THB: Todd Hewitt Broth (caldo Todd Hewitt)
TNF- α : fator de necrose tumoral α
U: units
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFC/CFU: unidades formadoras de colônia
UFSM: Universidade Federal de Santa Maria
v/v: proporção volume por volume (% volume per volume)
w/v: proporção peso por volume (% weight per volume)
YE: yeast extract (extrato de levedura)
 μ g: micrograma
 μ l: microlitro
 μ m: micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

±: mais ou menos

≤: menor ou igual

≥: maior ou igual

°C: graus Celsius

°GL: graus Gay Lussac (%V)

®: marca registrada

™: trademark (marca registrada)

%: por cento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 ADENITE EQUINA	16
2.2 <i>STREPTOCOCCUS EQUI</i> SUBESPÉCIE <i>EQUI</i>	20
2.2.1 <i>Fatores de virulência</i>	21
2.2.2 <i>Cápsula</i>	21
2.2.3 <i>Proteína M</i>	24
2.2.4 <i>Equibactina</i>	25
2.2.5 <i>Superantígenos</i>	27
2.3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	28
2.4 BIOFILME	29
3. ARTIGO 1 - PHENOTYPIC AND GENOTYPIC DIFFERENCES BETWEEN <i>STREPTOCOCCUS EQUI</i> SUBSP. <i>EQUI</i> ISOLATED FROM DISEASED AND CARRIER HORSES	31
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICE A – RESULTADO DOS TESTES FENOTÍPICOS	73
APÊNDICE B – DIÂMETRO DOS HALOS (MM) DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	75
APÊNDICE C – RESULTADOS DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E VALORES DE IRMA E IRCA	77
APÊNDICE D – RESULTADOS DO TESTE DE CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME	79
APÊNDICE E – RESULTADOS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA OS DIFERENTES GENES	80
ANEXO A - PADRÕES DE INTERPRETAÇÃO DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	83

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e o quarto mundial (FAO, 2014). Somados aos muares (mulas) e asininos (asnos) são oito milhões de cabeças, movimentando R\$ 7,3 bilhões, somente com a produção de cavalos (MAPA, 2016). O rebanho envolve mais de 30 segmentos, distribuídos entre insumos, criação e destinação final e compõe a base do chamado Complexo do Agronegócio Cavalo, responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (CEPEA, 2006).

Quando o assunto é exportação de cavalos vivos, os números são significativos: a expansão alcançou 524% entre 1997 e 2009, passando de US\$ 702,8 mil para US\$ 4,4 milhões (MAPA, 2016). O Brasil é o oitavo maior exportador de carne equina, sendo os principais destinos Bélgica, Holanda, Itália, Japão e França e os Estados Unidos em menor escala (MAPA, 2016).

A população brasileira de equinos encontra-se na sua maioria na região Sudeste, seguida das regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Norte. O estado do Rio Grande do Sul conta com 535.227 equinos, perfazendo 55% do total da Região Sul (IBGE, 2015). É o segundo do país em número de cabeças, sendo Minas Gerais o primeiro, com 774.639 (IBGE, 2015).

Usado unicamente como meio de transporte durante muitos anos, os equídeos têm conquistado outras áreas de atuação, com forte tendência para lazer, esportes e inclusive terapia. Uma de suas principais funções, contudo, continua sendo o trabalho diário nas atividades agropecuárias, onde aproximadamente cinco milhões de animais são utilizados, principalmente, para o manejo de bovinos (MAPA, 2016).

A criação de animais de alta qualidade eleva a perspectiva de crescimento do setor, porém, a ocorrência de doenças infecciosas pode contrapor esta tendência. Entre os fatores que acarretam perdas à criação equina estão as doenças infecciosas. A adenite equina é uma das doenças infecciosas mais frequentemente diagnosticadas (GUTIÉRREZ e ARIAS, 2013; WALLER, PAILLOT e TIMONEY, 2011). Esta enfermidade está mundialmente difundida, apesar de possuir apenas os equinos como hospedeiros naturais (WALLER, PAILLOT e TIMONEY, 2011). Desta forma, é provável que venha a ser incluída na lista de doenças de notificação obrigatória da OIE (informação verbal¹), gerando possíveis restrições para transporte de equinos e contribuindo para a adoção de regras mais rígidas e eficientes para o con-

¹ Proposta apresentada por Andrew Waller durante o Workshop “Getting to Grips with Strangles and other Streptococcal Diseases”, Gallatin Gateway, Montana – EUA, setembro de 2017.

trole desta enfermidade, tais como comprovação do status negativo de portadores para o trânsito internacional de equinos. No Brasil, a adenite equina faz parte da lista de doenças de notificação obrigatória, sendo necessária a notificação mensal dos casos confirmados aos órgãos responsáveis (BRASIL, 2013).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ADENITE EQUINA

A adenite equina é a doença respiratória mais comum do trato respiratório superior de equinos, particularmente em animais recém-desmamados ou com cerca de um ano (RIBEIRO e VARGAS, 2016). É a doença infecciosa de equinos mais frequentemente diagnosticada em todo o mundo (ROBINSON et al., 2016). Equinos, muares e asininos são suscetíveis (RIBEIRO e VARGAS, 2016).

O agente causador da adenite equina, também conhecida como garrotilho, é uma bactéria Gram positiva do grupo C de Lancefield denominada *Streptococcus equi* subespécie *equi* (*S. equi*) (SCHÜTZ, 1888; TODD, 1910). A doença foi descrita pela primeira vez em 1251 (RUFFUS, 1251) e o agente etiológico foi identificado em 1888 (SCHÜTZ, 1888). Em equinos, ciclo de vida do *S. equi* no hospedeiro é caracterizado por doença aguda de curta duração, o garrotilho, seguida de infecção persistente por longos períodos no interior das bolsas gústrais (ROBINSON et al., 2016). Esse ciclo aprimora a habilidade de transmissão do agente para animais suscetíveis.

Os prejuízos relacionados com a doença nos criatórios são atribuídos à interrupção do trabalho de animais destinados ao transporte ou tração, à queda no desempenho em treinamentos, bem como aos gastos com medicamentos, honorários veterinários, impacto estético negativo pelo enfartamento e abscedação de linfonodos, além de morte ocasional de animais (RIBEIRO e VARGAS, 2016).

A doença acomete equídeos entre um e cinco anos, com predomínio em animais com cerca de um ano de idade, o que coincide com a faixa etária de desmame dos potros (RIBEIRO e VARGAS, 2016). A morbidade é extremamente variável (TIMONEY, 1993), podendo acometer 10 a 30% dos animais do plantel, chegando a 100% em surtos (TONPITAK, SORNKLIEN e WUTTHIWITHAYAPHONG, 2016). A mortalidade ocorre em até 10% dos animais não tratados ou com diagnóstico tardio, e entre 1 e 2% dos casos, apesar da utilização de tratamento adequado, devido ao desenvolvimento de complicações (TIMONEY, 1993). O início da doença em criatórios geralmente é associado ao histórico do ingresso recente de animais assintomáticos, ou mesmo animais do próprio plantel que foram reintroduzidos sem período adequado de quarentena (WOOD et al., 1993). Os surtos são frequentes em locais com alta aglomeração de animais, como haras, baias de animais de salto, corrida, hipismo, pólo ou criatórios com alta densidade de animais (MALLICOTE, 2015).

A principal fonte de infecção do garrotilho são os próprios animais doentes ou portadores (CHANTER, 1997), uma vez que *S. equi* possui como *habitat* o trato respiratório de equídeos (TIMONEY, 2004). A transmissão pode ocorrer de forma direta pelo contato entre os animais e liberação de aerossóis pelos equídeos infectados ou por via indireta, através de fômites (WOOD et al., 1993). O microrganismo pode manter-se viável por até três meses no ambiente sob o abrigo da luz solar direta (JORM et al., 1994). Entretanto, um estudo recente demonstrou que *S. equi* é eliminado após 72 horas da matéria orgânica autoclavada retirada das baias de equinos, enquanto pôde manter-se viável por apenas 12 horas no mesmo material não autoclavado, sugerindo que os microrganismos da matéria orgânica sejam capazes de inativar o agente (POULIN et al., 2017).

Alguns equídeos recuperados não drenam o conteúdo purulento de suas bolsas guturais após a ruptura dos abscessos formados nos gânglios linfáticos retrofaríngeos adjacentes (WOOD et al., 1993). Com isso, o conteúdo purulento transforma-se em condróide, o que permite a persistência do *S. equi* por vários anos nestes animais, possibilitando a transmissão da bactéria para outros equinos ainda não infectados (NEWTON et al., 2000). Aproximadamente 10% dos animais que se recuperam da doença, após empiema das bolsas guturais, permanecem portadores da bactéria por longos períodos (NEWTON et al., 1997; WOOD et al., 1993). Um inquérito epidemiológico realizado no Rio Grande do Sul estimou que a prevalência de equinos portadores é de aproximadamente 2,3% a nível animal e 5,86% a nível de rebanho (LIBARDONI et al., 2016).

Portanto, o êxito da infecção por *S. equi* é resultado da sua capacidade de proliferar-se rapidamente no tecido tonsilar e linfonodos, levando a abscessos que são drenados para as bolsas guturais onde a infecção persiste (LAUS et al., 2007; VERHEYEN et al., 2000). Além disso, as condições nesses diferentes ambientes do hospedeiro, provavelmente, influenciaram a perda ou aquisição de genes que moldaram o genoma do *S. equi* (HOLDEN et al., 2009). Waller, Paillot e Timoney (2011) discutem o papel desses eventos genéticos na evolução e emergência desse importante patógeno que apresenta restrição ao hospedeiro. Análises genômicas de inúmeros isolados de *S. equi* revelaram evidências de adaptação das cepas de equinos com infecção persistente ao ambiente interno destes animais (ROBINSON et al., 2016). Esses animais aparentemente saudáveis, porém carreadores da bactéria, desempenham um papel crucial na recorrência da doença e na disseminação do *S. equi* para novos estados e países (WALLER, 2014, 2016).

A reinfeção pode ocorrer em 10 a 30% dos animais que apresentaram manifestações clássicas da enfermidade, denotando que a imunidade pós-infecção não ocorre na totalidade

dos animais expostos (CLABOUGH, 1987). A imunidade à bactéria está intimamente ligada à produção de anticorpos séricos e de mucosa contra a proteína M (WOOLCOCK, 1975), a qual permite a adesão da bactéria às células do epitélio nasal, oral, faríngeo, tonsilas e linfonodos, além de possuir efeito anti-fagocítico (TIMONEY e MUKHTAR, 1993).

Após a invasão do animal susceptível por via oral ou nasal, a bactéria se adere e multiplica nas células-alvo do trato respiratório superior e linfonodos regionais (TIMONEY e KUMAR, 2008). Em poucas horas, o microrganismo atinge os linfonodos regionais, onde se multiplica no meio extracelular (MALLICOTE, 2015). O peptidoglicano da parede bacteriana ativa a fração 3b do complemento, que atrai neutrófilos para o local (TIMONEY, KUMAR e MUTHUPALANI, 2006). A ação antifagocítica da proteína M ocorre pela inibição do fator C3b do complemento (BOSCHWITZ e TIMONEY, 1994) e pela ligação com o fibrinogênio, impedindo o reconhecimento da bactéria como estranha ao sistema imune do animal susceptível (SMEESTERS, MCMILLAN e SRIPRAKASH, 2010). A bactéria libera também as enzimas estreptoquinase e estreptolisina S, que causam a destruição da parede das células-alvo e morte celular (SWEENEY et al., 2005).

A ação do microrganismo nos linfonodos regionais promove a quimiotaxia de neutrófilos, aumento da permeabilidade local, edema e formação de abscessos com acúmulo de grande coleção purulenta, que pode ser eliminada em alguns animais após a abscedação dos linfonodos, principalmente os submandibulares e retrofaríngeos (MALLICOTE, 2015). Processo similar ocorre na região da nasofaringe, levando à secreção nasal purulenta (TIMONEY e KUMAR, 2008). Em 80 a 90% dos casos o processo é benigno, ocorrendo cura clínica dos animais com ou sem a instituição de terapia (MALLICOTE, 2015). As principais complicações da enfermidade são decorrentes da disseminação linfo-hemática do microrganismo, podendo levar a septicemia e localização em outros órgãos ou mesmo reações de hipersensibilidade (BOYLE et al., 2018).

O período de incubação é variável, entre uma a três semanas. Classicamente, os principais sinais clínicos da enfermidade são: febre (39 - 41°C) (BOYLE et al., 2018), linfadenopatia uni ou bilateral (RIBEIRO e VARGAS, 2016), descarga nasal (inicialmente mucosa progredindo para mucopurulenta), tosse, anorexia, apatia, dificuldade de deglutição e edema submandibular (dificultando a respiração) (MALLICOTE, 2015). O sinal clínico que caracteriza a enfermidade é o enfartamento de linfonodos da região de cabeça do animal (submandibulares, retro-faríngeos, parotídeos), secundário à instalação de processo inflamatório local (SCHÜTZ, 1888).

As descargas nasais e de material purulento dos linfonodos ocorrem 24 a 72 horas após o aparecimento de pico febril nos animais, usualmente 4 a 8 dias pós-infecção (BOYLE et al., 2018). A secreção dos linfonodos apresenta coloração amarelada e contém grande quantidade de bactérias viáveis que contaminam o pasto, água, comedouros e utensílios de uso no manejo dos animais (RIBEIRO e VARGAS, 2016). A linfadenopatia é acompanhada por faringite, laringite e, raramente, conjuntivite (TIMONEY e KUMAR, 2008). O enfartamento do linfonodo retrofaríngeo pode causar obstrução da orofaringe, levando à disfagia e dificuldade respiratória (SWEENEY et al., 2005). Esse quadro é o que caracteriza a denominação popular da doença como ‘garrotilho’ (TODD, 1910).

O curso clínico usualmente perdura duas à quatro semanas, com recuperação espontânea da maioria dos animais após drenagem do conteúdo dos abscessos (MALLICOTE, 2015). Nos casos severos ou crônicos os animais podem permanecer com sinais clínicos por até três meses (RIBEIRO e VARGAS, 2016).

As principais estratégias de controle e profilaxia do garrotilho nos criatórios livres ou endêmicos repousam no controle do fluxo de animais, cuidados sanitários na aquisição de animais, quarentenário, isolamento e terapia de animais doentes (SWEENEY et al., 2005), cuidados na formação de lotes de animais no pós-desmame, higiene e desinfecção de instalações e utensílios dos animais (BOYLE et al., 2018), exames clínicos e laboratoriais periódicos nos animais do plantel e implementação de profilaxia vacinal (WALLER, 2014).

A maioria dos equídeos desenvolve imunidade duradoura, por até cinco anos, após infecção natural por *S. equi* (MALLICOTE, 2015). A utilização da vacinação tem sido recomendada na profilaxia da enfermidade em propriedades endêmicas ou com alta rotatividade de animais (WALLER, 2013). No entanto, a eficiência das vacinas é controversa (MORAES, VARGAS, et al., 2009). O baixo índice de proteção tem sido atribuído, em parte, à inadequada estimulação antigênica, à interferência da imunidade passiva materna conferida pelo colostro quando do uso da vacina em potros, ou mesmo que a proteção nos equinos seria mediada principalmente por imunoglobulinas secretórias locais da mucosa nasofaríngea, em detrimento de anticorpos bactericidas séricos (WALLER, 2014; WOOLCOCK, 1975).

O uso da vacina diminui a severidade e a frequência dos casos naturais (SWEENEY et al., 2005). No entanto, não impede a infecção de todos os animais do plantel (MALLICOTE, 2015). Diferentes vacinas estão disponíveis para a profilaxia da doença, que incluem imunógenos de uso parenteral (intramuscular, subcutânea) e intra-nasal, utilizando antígenos atenuados, inativados (bacterinas) ou de subunidades (WALLER, 2014). As vacinas inativadas geralmente não conferem proteção total aos animais por não induzirem estímulo

antigênico adequado de imunidade local na nasofaringe, reconhecida como a principal porta de entrada do microrganismo (TIMONEY e KUMAR, 2008).

A penicilina é o fármaco de escolha para o tratamento do garrotilho (MALLICOTE, 2015), antes dos animais desenvolverem enfartamento de linfonodos (WEESE et al., 2008). Embora não tenha sido observada resistência a este antimicrobiano em isolados do sul do Brasil (KIRINUS et al., 2011) e da Argentina (BUSTOS et al., 2017a), recentemente um estudo utilizando isolados do estado de São Paulo demonstrou resistência à penicilina em *S. equi* (PANSANI et al., 2016). Esses dados ressaltam a importância do tratamento orientado pelo teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

2.2 *Streptococcus equi* SUBESPÉCIE *equi*

Anteriormente esta bactéria era conhecida apenas como *Streptococcus equi*. Com o advento das técnicas de biologia molecular evidenciou-se a íntima relação de parentesco deste agente com o até então chamado *Streptococcus zooepidemicus* (HARRINGTON, SUTCLIFFE e CHANTER, 2002; WEBB et al., 2008; WALLER e ROBINSON, 2013). Estes dois agentes possuem 78,2% de genes ortólogos (HOLDEN et al., 2009) e trabalhos demonstraram que *S. equi* se originou a partir de *S. zooepidemicus* (CHANTER et al., 1997; JORM et al., 1994). Os dois agentes foram então agrupados na mesma espécie e classificados apenas como subespécies diferentes.

Quando cultivado em meio de ágar acrescido de sangue *S. equi* demonstra uma ampla zona de hemólise completa, denominada Beta-hemólise (MACFADDIN, 2000). Esta é uma importante característica deste agente utilizada para diferenciá-lo das demais espécies do gênero *Streptococcus*. Do mesmo modo, cepas patogênicas de *S. equi* apresentam colônias com aspecto mucóide, devido à presença de cápsula (ANZAI, TIMONEY, et al., 1999; TIMONEY et al., 2014). Além disso, a morfologia celular desta bactéria apresenta-se como cocos Gram positivos organizados em correntes e com reação negativa na prova da catalase (QUINN et al., 2011).

Para caracterização do agente são utilizadas técnicas fenotípicas, tais como a capacidade de fermentar açúcares (BANNISTER, BENSON e SWEENEY, 1985). Tradicionalmente, *S. equi* é incapaz de fermentar lactose, trealose, sorbitol e ribose, enquanto *S. zooepidemicus* fermenta ribose, lactose e sorbitol (KUWAMOTO, ANZAI e WADA, 2001; QUINN et al., 2011). Entretanto, tem sido relatada a ocorrência de cepas de *S. equi* atípicas, capazes de

utilizar lactose e/ou trealose (GRANT, EFSTRATIOU e CHANTER, 1993; WOOLCOCK, J. B., 1975), o que poderia dificultar a correta diferenciação das duas subespécies.

Um estudo realizado por Harris et al. (2015) revelou que mutações que levam à racionalização do metabolismo e perda de determinantes de virulência foram mais frequentemente encontradas em isolados de animais com infecção persistente. Isso sugere que o potencial patogênico do *S. equi* reduz como consequência da estadia no equino por longos períodos após a doença aguda (ROBINSON et al., 2016). Um exemplo disso é a deleção do locus do sideróforo equibactina, a qual foi evidenciada exclusivamente em isolados de animais com infecção persistente e torna a capacidade do agente causar doença aguda no seu hospedeiro natural significativamente menor (HARRIS et al., 2015).

2.2.1 Fatores de virulência

Os fatores de virulência de *S. equi* incluem a presença de cápsula de ácido hialurônico, estreptolisina, estreptoquinase S, fosfolipase A2 (LÓPEZ-ÁLVAREZ et al., 2017), proteínas receptoras para a região Fc de imunoglobulinas da classe IgG, peptidoglicano, proteína M, hemolisinas e leucotoxinas (HARRINGTON, SUTCLIFFE e CHANTER, 2002; RIBEIRO e VARGAS, 2016).

As linhagens de *S. equi* apresentam atividade mitogênica e pirogênica, em razão da presença de exotoxinas pirogênicas (SePE-I, SePE-H, SePE-K(M) e SePE-L) as quais induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a virulência da bactéria (ANZAI, SHEORAN, et al., 1999; ARTIUSHIN et al., 2002).

Isolados de *S. equi* apresentam beta-hemolisinas, que produzem zonas de hemólise total ao redor das colônias quando cultivadas em Ágar acrescido de sangue (TIMONEY, 2004). Esta hemólise é determinada pela ação da estreptoquinase S, uma citotoxina capaz de promover a formação de poros nas membranas dos eritrócitos (FLANAGAN et al., 1998). Como consequência da hemólise, ocorre liberação do íon ferro, um importante cofator na multiplicação e no metabolismo bacteriano (WOOLDRIDGE e WILLIAMS, 1993).

2.2.2 Cápsula

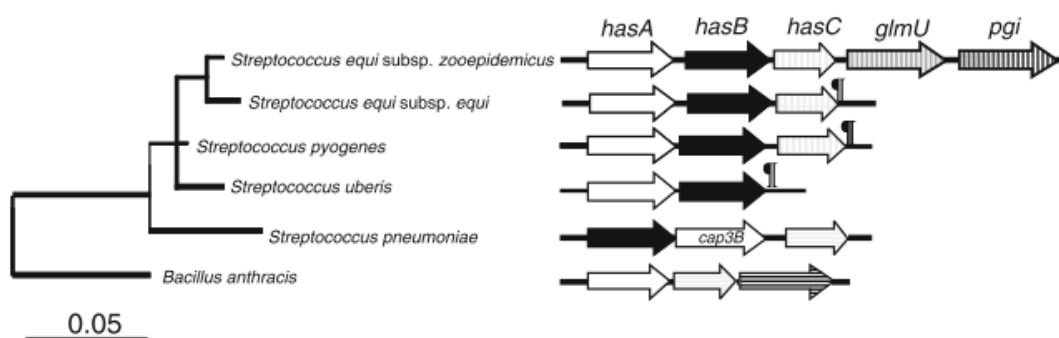
A cápsula de ácido hialurônico, um polímero de alto peso molecular, consiste de resíduos de N-acetilglucosaminas alternados com ácido hialurônico (TIMONEY, 2004). Isolados virulentos de *S. equi* de casos de garrotilho são, na maioria dos casos, altamente capsulados

(WOOLCOCK, 1974) e produzem colônias mucóides, enquanto mutantes não capsulados são muito menos virulentos (ANZAI et al., 1999).

A cápsula antifagocítica reduz a quantidade de estreptococos que se associam à superfície dos neutrófilos e posteriormente são englobados e destruídos (ANZAI et al., 1999; TIMONEY, 2004). A cápsula também aumenta a carga negativa e a hidrofília da superfície bacteriana, produzindo um ambiente redutor que protege a atividade de proteases e toxinas sensíveis à presença oxigênio, tais como a estreptolisina S (TIMONEY, 2004). A cápsula é necessária para a funcionalidade da proteína M e possivelmente de outras proteínas hidrofóbicas expostas na superfície bacteriana (TIMONEY et al., 2014). Na ausência da cápsula hidrofílica estas proteínas se agregam, perdendo a conformação tridimensional essencial para seu correto funcionamento (TIMONEY, 2004). Então, *S. equi* não capsulados mesmo expressando quantidades normais da proteína M antifagocítica, são eficientemente fagocitados (HARRINGTON, SUTCLIFFE e CHANTER, 2002; TIMONEY et al., 2014).

A síntese da cápsula é controlada pelo operon *has*, composto por *hasA* (hialuronato sintase), *hasB* (UDP-glicose dehidogenase) e *hasC* (UDP-glicose pirofosforilase) (BLANK, HUGENHOLTZ e NIELSEN, 2008; ZHANG et al., 2016). Esses genes são ortólogos entre diversas espécies de estreptococos e outras bactérias (BLANK, HUGENHOLTZ e NIELSEN, 2008), porém estudos moleculares demonstram que sua organização nos operons é diferente (Figura 1).

Figura 1 – Organização do operon *has* em diferentes espécies de *Streptococcus* e relação de parentesco entre os mesmos.



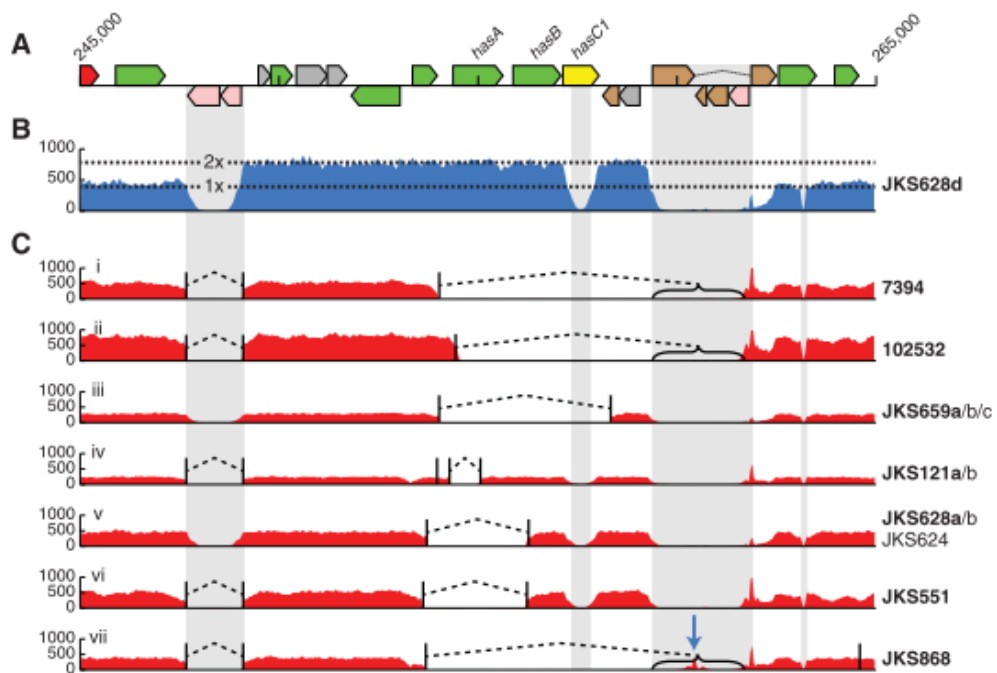
Fonte: Blank, Hugenholtz e Nielsen (2008).

Apesar da homologia entre o operon *has* de *S. equi* e *S. zooepidemicus*, o primeiro apresenta uma quantidade de ácido hialurônico na superfície bacteriana muito superior do que o segundo. Uma explicação para a variação neste fenótipo seria a duplicação e inversão do

gene *hasC* em outro operon, concomitante a uma mutação no gene da hialuronato liase, enzima responsável por degradar o ácido hialurônico presente na cápsula (HOLDEN et al., 2009). Supõe-se que a atividade da enzima hialuronato liase esteja diminuída em *S. equi*, mantendo os níveis de cápsula de ácido hialurônico (WALLER, PAILLOT e TIMONEY, 2011), o que poderia diminuir a habilidade deste agente invadir tecidos e diminuir sua aderência à superfície das mucosas, porém, aumentando a resistência à fagocitose (HOLDEN et al., 2009).

Em um estudo com 224 isolados de *S. equi* de vários países Harris et al. (2015) encontraram deleções de diferentes tamanhos apenas em cepas provenientes de animais portadores (Figura 2). Essas mesmas estirpes apresentaram níveis de expressão dos genes relacionados à cápsula significativamente menores do que aquelas provenientes de animais doentes (HARRIS et al., 2015). Isso sugere que após o período de doença aguda as cepas passam por eventos de adaptação ao hospedeiro, com consequente diminuição da virulência.

Figura 2 – Representação esquemática das deleções encontradas no locus *has* em *S. equi* isolados de equinos portadores.



As linhas pontilhadas demonstram os locais onde ocorreu a deleção. (A) Representação da anotação do genoma ao redor do locus *has*. (B) Oito isolados, todos de equinos diferentes, exibiram independentemente duplicações da região entre sequências de inserção repetidas (indicadas por colunas cinzentas). (C) Doze isolados de oito equinos exibiram sete deleções independentes de diferentes regiões do locus *has*.

Fonte: Harris et al. (2015)

2.2.3 Proteína M

Dentre os fatores de virulência de *S. equi*, a proteína M, de 58kD, codificada pelo gene *seM*, tem especial importância (HARRINGTON, SUTCLIFFE e CHANTER, 2002). Esta foi caracterizada pela primeira vez por Galán e Timoney (1987), que clonaram seu gene e expressaram em *Escherichia coli*. A proteína M tem aspecto de fímbria que se projeta a partir da parede celular bacteriana (FISCHETTI et al., 1988), possui característica ácido resistente (GALÁN e TIMONEY, 1987), e atividade de aderência e antifagocítica, inibindo a deposição do componente C3b do complemento na superfície bacteriana (BOSCHWITZ e TIMONEY, 1994). Essa proteína também impede a ligação e inativa o fibrinogênio e a imunoglobulina G, inibindo a fagocitose por neutrófilos e macrófagos (BOSCHWITZ e TIMONEY, 1994; MEEHAN et al., 2000). Embora a utilização de proteína M purificada (não recombinante) como antígeno vacinal não tenha conferido proteção significativa em equinos vacinados e posteriormente desafiados com *S. equi* (SHEORAN, ARTIUSHIN e TIMONEY, 2002), ela ainda é uma candidata promissora a antígeno vacinal.

Por muito tempo a sequência do gene da proteína M de diferentes isolados de *S. equi* foi considerada altamente homogênea e conservada (GALÁN e TIMONEY, 1988), contudo Anzai et al. (2005) identificaram variações na região N-terminal dessa proteína. Posteriormente, 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*. Além disso, Chanter et al. (2000) também relataram um truncamento (deleção de nucleotídeos que codificam a região N-terminal) da proteína M em equinos portadores.

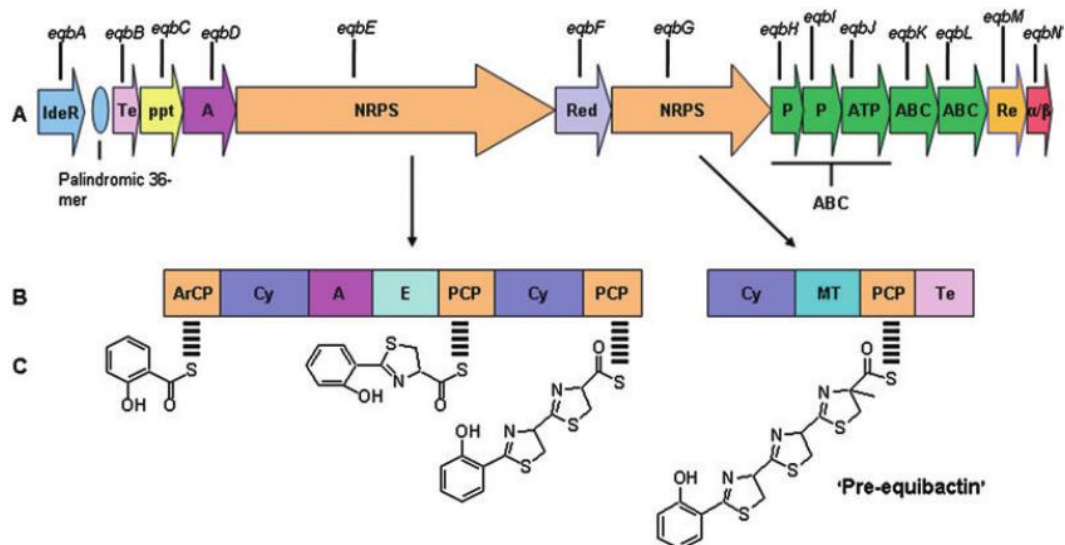
O sequenciamento da região variável da proteína M, em surtos de adenite no Reino Unido nos anos de 2007 e 2008, permitiu identificar uma mudança nas frequências alélicas entre as cepas circulantes neste período, sugerindo pressão seletiva nesses isolados (IVENS et al., 2011). Além disso, Parkinson et 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. No Brasil, Libardoni et al. (2013) identificaram a presença de 15 diferentes alelos do gene da proteína M em isolados de *S. equi* de surtos de adenite equina no estado do Rio Grande do Sul. Na Argentina novos alelos da proteína M também foram descritos (BUSTOS, MESPLET, et al., 2017), sugerindo que isolados da América do Sul diferem daqueles oriundos de outros continentes.

2.2.4 Equibactina

Em 2008 foi divulgada a descoberta de um novo locus gênico oriundo de um elemento integrativo-conjugativo (ICE). Segundo os pesquisadores, esse locus seria único, encontrado somente em *Streptococcus equi* subesp. *equi*, estaria envolvido na aquisição de ferro (sideróforo) e teria sido o ponto-chave na evolução e diferenciação do *S. equi* a partir do *S. zooepidemicus* (HEATHER et al., 2008). A aquisição deste locus associado à mutação do gene da hialuronato liase seriam os eventos evolutivos que levaram à diferenciação do *S. equi* a partir do *S. zooepidemicus* (HOLDEN et al., 2009).

O ICESe2 possui um tamanho de 63.055 pares de bases (pb) e é composto por 14 genes (*eqbA-N*) (Figura 3). O *eqbA* é o gene regulador dependente de Ferro, de 381pb. O gene *eqbB* codifica uma esterase, *eqbC* uma transferase e *eqbD* uma salicilato-AMP ligase. O *eqbE* (6.072pb) e *eqbG* originam um peptídeo sintase não ribossomal (NRPS) responsável pela produção do suposto sideróforo equibactina (WALLER, PAILLOT e TIMONEY, 2011). O *eqbF* produz uma redutase. *eqbH* e *eqbI* geram uma permease, *eqbJ* uma ATPase (componentes do transportador ABC) e *eqbK* e *eqbL* o transportador ABC propriamente dito. Supõe-se que *eqbM* seja uma oxidoreductase e *eqbN* uma α/β hidrolase (HEATHER et al., 2008).

Figura 3 – Representação esquemática do locus ICESe2.



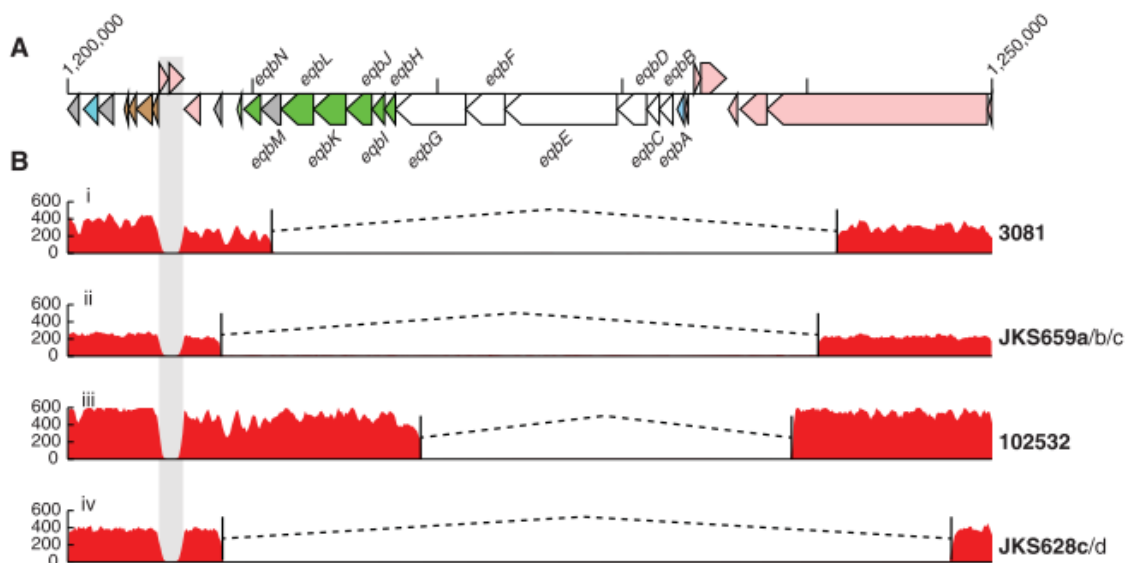
Organização dos 14 genes (*eqbA-N*) e suas respectivas funções (A). B: representação dos produtos dos genes *eqbE* e *eqbG* (Peptídeo Sintase Não Ribossomal - NRPS). Em C os supostos intermediários da equibactina.

Fonte: Heather et al. (2008)

Os 14 genes associados com a molécula sequestrante de ferro, equibactina, foram todos descritos como não essenciais para *S. equi in vitro*, com exceção do gene regulador *eqbA* (CHARBONNEAU et al., 2016). Entretanto, o locus do sideróforo equibactina ainda não foi detectado e caracterizado em isolados brasileiros de *Streptococcus equi*.

Comparações entre múltiplos isolados originários de equinos portadores mostraram que até mesmo estes isolados altamente relacionados variaram entre si por deleções e/ou ampliações, demonstrando que a microevolução de *S. equi* nas bolsas guturais produz uma mistura variada de cepas (HARRIS et al., 2015). Esses mesmos autores encontraram diferentes deleções de até 39,5kb no ICESe2 em isolados de equinos com infecção persistente (Figura 4), cobrindo todo o locus da equibactina. Esse locus codifica um suposto sideróforo que aumenta a habilidade de *S. equi* em adquirir ferro (HEATHER et al., 2008).

Figura 4 – Representação esquemática das deleções encontradas no locus ICESe2 em *S. equi* isolados de equinos portadores



As linhas pontilhadas demonstram os locais onde ocorreu a deleção. Deleção convergente do locus da equibactina em sete isolados recuperados de quatro equinos independentes infectados persistentemente.

(A) Representação da anotação do genoma em torno do cluster de equibactina. (B) Mapa de leitura do locus da equibactina em exemplos de isolados exibindo as quatro variantes de deleção.

Fonte: Harris et al. (2015).

Em um estudo, dois grupos de pôneis foram infectados experimentalmente utilizando *S. equi* com o ICESe2 intacto e *S. equi* com deleção em *eqbE*. A cepa com deleção demonstrou significativa redução na virulência, com menos enfartamento de linfonodos nos animais

do grupo infectado com a cepa que possuía deleções (HARRIS et al., 2015). Este mesmo estudo demonstrou ainda que cepas com deleções mantêm a capacidade de serem transmitidas e infectar um novo equino suscetível, porém possuem um potencial de virulência mais baixo, produzindo uma doença mais branda (HARRIS et al., 2015). Desta forma, por diminuir a virulência, infere-se que possíveis deleções em genes do sideróforo equibactin poderiam favorecer a permanência de *S. equi* nos equinos de maneira assintomática, permitindo a transmissão para outros animais e a ocorrência da doença na propriedade ao longo dos anos.

2.2.5 Superantígenos

O termo superantígenos foi criado em 1989 e descreve um grupo de proteínas com potência extremamente elevada de estimular linfócitos T CD4 e CD8 (WHITE et al., 1989). Superantígenos são importantes fatores de virulência produzidos por algumas bactérias, incluindo as pertencentes ao gênero *Streptococcus* (COMMONS et al., 2014; PROFT e FRASER, 2007; SPAULDING et al., 2013). São moléculas bifuncionais que utilizam pelo menos dois tipos de receptores expressos em diferentes células mononucleares do sistema imune (KOTB, 1995). São proteínas extracelulares cujas propriedades incluem pirogenicidade, atividade mitogênica para células T, habilidade de elevar a suscetibilidade do hospedeiro ao choque endotóxico e supressão da produção de imunoglobulinas (ARTIUSHIN et al., 2002; COMMONS et al., 2014).

Essas proteínas passam pelo processo convencional de apresentação de antígeno, ativando um grande número de células T sem a restrição do complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II) (COMMONS et al., 2014; KOTB, 1995). Diferente do que ocorre com qualquer outro antígeno, que deve ser processado e apresentado às células T, os superantígenos não necessitam de processamento e apresentação e também se ligam a um local diferente no receptor, a região variável da cadeia Beta (PROFT e FRASER, 2003; WHITE et al., 1989). Isso leva a uma extensiva ativação imune com uma grande liberação de citocinas pro-inflamatórias (BARNETT et al., 2015), tais como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 2 e interferon γ (IFN γ) (COMMONS et al., 2014; FRASER e PROFT, 2008; PROFT e FRASER, 2007).

Nos últimos anos o número de superantígenos conhecidos aumentou de forma considerável (ALBER et al., 2005). Atualmente existem mais de 40 diferentes tipos de superantígenos bacterianos descritos na literatura (PROFT e FRASER, 2003).

Hoje são conhecidos quatro superantígenos de *S. equi*. Primeiramente foram descobertos os superantígenos H e I, inicialmente chamados de exotoxinas pirogênicas (SePE-H e SePE-I) (ARTIUSHIN et al., 2002) e após M e L (ALBER et al., 2005), codificados respectivamente pelos genes *seeH*, *seeI*, *seeM* e *seeL*. Todos esses genes são homólogos aos de *Streptococcus pyogenes* (ARTIUSHIN et al., 2002; PROFT et al., 2003; PROFT e FRASER, 2003), e alguns aos de *S. zooepidemicus* (*szeM* e *szeL*) (ALBER et al., 2005) indicando que houve transferência horizontal entre essas espécies (HOLDEN et al., 2009).

Um estudo propõe que os superantígenos desempenham um papel importante na patogenia de *S. equi* por estimular uma resposta Th1 exagerada e inapropriada, o que poderia interferir no desenvolvimento de uma resposta imune efetiva (PAILLOT et al., 2010). Porém, o papel preciso destas proteínas durante a infecção por *S. equi* permanece indeterminado.

A expressão dos superantígenos foi detectada apenas nos linfonodos e nas bolsas gústrais durante a infecção e a ausência no soro sugere que a disseminação sistêmica de superantígenos pode ser desnecessária ou mesmo prejudicial para *S. equi* (MCLEAN et al., 2015). A presença de superantígenos no soro pode induzir formas severas da doença, as quais poderiam resultar na morte do hospedeiro, limitando então a disseminação da doença e o desenvolvimento do *status* de portador (MCLEAN et al., 2015).

2.3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A emergência de resistência a múltiplos agentes antimicrobianos em bactérias patogênicas tem se tornado uma ameaça significativa em saúde pública (VENTOLA, 2015; WHO, 2018). A crise da resistência aos antimicrobianos tem sido atribuída ao uso excessivo e mau uso de antibióticos, bem como à falta de desenvolvimento de novas drogas pela indústria farmacêutica devido a incentivos econômicos reduzidos e exigências regulatórias desafiadoras (GROSS, 2013; VENTOLA, 2015).

O isolamento de cepas patogênicas resistentes a um número cada vez maior de princípios (GROSS, 2013; LUSHNIAK, 2014) exigiu a adoção de alguns termos. Multirresistência foi definida como ausência de suscetibilidade adquirida a ao menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2011). Resistência estendida foi descrita como ausência de suscetibilidade a ao menos um agente em todas as classes de antimicrobianos, com exceção de duas classes ou menos (MAGIORAKOS et al., 2011). Pan-

resistência é a ausência de suscetibilidade a todos os agentes em todas as classes antimicrobianas (MAGIORAKOS et al., 2011).

Os antimicrobianos de eleição para o tratamento da adenite equina são a penicilina (GIGUÈRE, PRESCOTT e DOWLING, 2013), cefalosporinas, macrolídeos e sulfonamidas associadas ao trimetropin (SWEENEY et al., 2005). *S. equi* normalmente apresenta suscetibilidade a essas drogas (BUSTOS et al., 2017a; KIRINUS et al., 2011). Porém, tem sido reportado o isolamento de cepas resistentes a estes antimicrobianos (PANSANI et al., 2016). Então, o tratamento desta enfermidade não deve ser empírico, mas sim baseado em resultados de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, com vistas ao sucesso da terapia e minimizar a possibilidade de seleção e difusão de cepas resistentes. Além disso, ainda não foram realizados estudos sobre o perfil de sensibilidade de *S. equi* isolados de animais portadores.

2.4 BIOFILME

A maior parte da atividade bacteriana na natureza não ocorre com as células individualizadas crescendo na forma planctônica (livre), e sim com as bactérias sésseis, organizadas em biofilmes (DONLAN, 2002; SAUER, 2003). Bactérias na forma sésil constituem um componente importante da biomassa bacteriana em muitos ambientes (APARNA e YADAV, 2008), sendo que mais de 99,9% do total das bactérias na natureza crescem em biofilmes em uma grande variedade de superfícies (DONLAN e COSTERTON, 2002).

Biofilmes consistem de células únicas e microcolônias, todas embutidas em uma matriz de exopolissacarídeos altamente hidratada e predominantemente aniônica (COSTERTON, GEESEY e CHENG, 1978). Biofilmes são definidos como populações bacterianas organizadas em diferentes graus de complexidade envoltas por uma matriz extracelular aderidas umas às outras e/ou a superfícies bióticas ou abióticas (COSTERTON et al., 1995).

Em comparação com as suas equivalentes planctônicas (não aderentes), os consórcios microbianos compactos presentes nos biofilmes mostram uma resistência extraordinária aos biocidas convencionais, aos tratamentos antimicrobianos e às respostas de defesa imune do hospedeiro (SAUER, 2003), tais como anticorpos e fagócitos (DONLAN e COSTERTON, 2002). A formação de biofilmes tem sido frequentemente associada às infecções crônicas (COSTERTON, 1999; MOSCOSO, GARCÍA E LÓPEZ, 2009) e resistência aos antimicrobianos (STEWART E COSTERTON, 2001) devido à formação e persistência de agregados

celulares envoltos por uma matriz polimérica excretada por microrganismos após sua adesão a uma determinada superfície (FLEMMING et al., 2016).

O desenvolvimento do biofilme é um processo que compreende cinco estágios (DAVEY e O'TOOLE, 2000). O primeiro estágio consiste na ligação reversível das células à superfície (STOODLEY et al., 2002). No estágio 2 as células se prendem mais firmemente, de forma irreversível (O'TOOLE, KAPLAN e KOLTER, 2000), um passo mediado principalmente pela produção de exopolissacarídeo, e as células perdem a mobilidade mediada por flagelos (SAUER, 2003). Na fase seguinte (3), a primeira fase de maturação é atingida, através do desenvolvimento precoce da arquitetura do biofilme, alcançando uma espessura superior a 10 μm (APARNA e YADAV, 2008). A segunda fase de maturação é alcançada no estágio 4 com biofilmes totalmente maduros, com uma arquitetura complexa (SAUER, 2003) e espessura geralmente maior que 100 μm (APARNA e YADAV, 2008). Na fase de dispersão (5), células móveis únicas se dispersam da microcolônia do biofilme para reiniciar o processo em outra superfície (STOODLEY et al., 2002).

Estudos de formação de biofilme em *S. equi* ainda são escassos. Trabalhos argentinos demonstram que este agente é capaz de formar biofilme *in vitro* (BUSTOS et al., 2016; BUSTOS et al., 2017b). A capacidade de formação de biofilme por *S. equi* ainda é um tema pouco explorado, apesar de ser bastante estudada nos patógenos humanos *Streptococcus pneumoniae* (ALLEGRUCCI e SAUER, 2007; CAMILLI, PANTOSTI e BALDASSARRI, 2011; DOMENECH, GARCÍA e MOSCOSO, 2009; MOSCOSO, GARCÍA e LÓPEZ, 2006, 2009; OGGIONI et al., 2006) e *Streptococcus pyogenes* (FIEDLER et al., 2013). Em *Streptococcus pneumoniae* a relação entre capacidade de formação de biofilme e cápsula está bem documentada (OGGIONI et al., 2006). Vários estudos indicam que isolados que não apresentam cápsula possuem maior habilidade de formar biofilmes (DOMENECH, GARCÍA e MOSCOSO, 2009; MOSCOSO, GARCÍA e LÓPEZ, 2006, 2009). Entretanto, em *S. equi* esta associação ainda não foi avaliada.

3. ARTIGO

Research paper

Phenotypic and genotypic differences between *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from diseased and carrier horses

Caiane Tasca^a, Agueda Castagna de Vargas^{a*}

(Artigo a ser submetido para publicação – Veterinary Microbiology)

^aLaboratório de Bacteriologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 97105-900. *Corresponding author: Tel.: +55 55 3220 8107; fone/fax: +55 3220 8257. Email address: agueda.vargas@gmail.com.

Phenotypic and genotypic differences between *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from diseased and carrier horses

Abstract

Streptococcus equi subsp. *equi* (*S. equi*) is the causative agent of Strangles, an acute upper respiratory tract disease. The carriers of the bacteria are important for the endemic occurrence of this disease worldwide. In order to understand the pathogenesis of the disease during the persistence phase, the aim of this study was to demonstrate phenotypic and genotypic differences between *S. equi* strains isolated from diseased and carrier horses. Morphology of colonies, fermentation of sugars (ribose, lactose, trehalose and sorbitol), presence of capsule, antimicrobial susceptibility profile, ability to form biofilm and presence of virulence associated genes (*hasA*, *hasB*, *hasC*, *eqbE*, *eqbG*, *seeH* and *seeI*) were evaluated on 42 strains from diseased horses and 18 isolates from carriers. *S. equi* strains from carrier horses presented dry and white-gray colonies, with atypical pattern of carbohydrate fermentation and little or no amount of capsule on the bacterial surface, while diseased horses' strains had honey-colored mucoid colonies, were predominantly unable to ferment carbohydrates and produced a large amount of capsule. There was difference in antimicrobial susceptibility profile, and carriers' strains presented higher resistance indices. Despite these differences, the two groups of isolates did not differ in their ability to form biofilm. None of the carrier isolates showed the *eqbE* gene and two thirds also do not have the *hasA-B* portion of *has* operons, which could explain the smaller amount of capsule in these strains. In conclusion, there are differences between *S. equi* isolates from diseased horses and carriers in morphology of colonies, sugars fermentation pattern, capsule production, antimicrobial susceptibility profile and genetic constitution. Further and deeper studies could elucidate which other genes are involved in the phenotype changes of the equine carrier strains.

Keywords: Strangles, carriers, antimicrobial resistance, biofilm, fermentation of sugars, capsule, equibactin.

1. Introduction

Streptococcus equi subsp. *equi* (*S. equi*) is a Gram positive bacteria belonging to Lancefield's group C and is the causative agent of strangles, one of the horse infectious disease most frequently diagnosed worldwide (Waller et al., 2011). When this bacterium is cultured on blood agar form honey-colored mucoid colonies with a complete hemolysis halo (β -hemolysis) (Quinn et al., 2011). *S. equi* is unable to ferment ribose, lactose, sorbitol and trehalose (MacFaddin 2000, Kuwamoto et al. 2001), however some isolates show an atypical fermentation profile and are able to ferment lactose and / or trehalose (Grant et al., 1993).

Strangles is a short-term acute disease followed by long-term persistent infection (Sweeney et al. 2005, Waller 2014). The most common clinical signs are fever, purulent nasal discharge and swelling of head and neck lymph nodes (Timoney, 1993; Boyle et al., 2018). Transmission occurs through direct or indirect contact with secretions contaminated by *S. equi* from diseased animals or carrier (Harrington et al., 2002). This disease is associated with high morbidity and low mortality (Quinn et al. 2011, Waller 2013). However, about 10 to 20% of the animals remain as carriers, excreting the pathogen intermittently for a long time after the convalescence (Wood et al. 1993, Newton et al. 1997, Heather et al. 2008) and acting as an important source of infection for susceptible horses (Waller 2014, Waller 2016).

The presence of equine carriers of *S. equi* is associated with guttural pouches empyema and chondroids formation, which could hamper the immune system action and elimination of the bacteria present in that anatomical site (Wood et al. 1993, Newton et al. 1997). Addi-

tionally, recent studies demonstrated that strains isolated from carrier horses present deletions in genes that codify important virulence determinants, such as the loci related to production of hyaluronic acid capsule (*has*) and equibactin siderophore (*ICESe2*) (Harris et al., 2015), suggesting that the agent undergoes mutations during the persistence phase (Waller, 2016). Therefore, these isolates produce less capsule and equibactin, which decreases their virulence (Harris et al. 2015, Waller 2016).

S. equi long-term infection in equines could also be associated with its ability to form biofilms, which is a strategy of persistence in different environments. Biofilm formation has often been associated with chronic infections (Costerton, 1999; Moscoso et al., 2009) and antimicrobial resistance (Stewart e Costerton, 2001) due to the formation and persistence of cellular aggregates surrounded by a polymer matrix excreted by microorganisms after their adhesion to a certain surface (Flemming et al., 2016).

Studies about *S. equi* isolated from carrier horses are limited, specially focusing on their susceptibility profile. It is known that bacterial resistance is an important issue and multiresistant strains have been increasingly isolated (Magiorakos et al., 2012). As the most used antimicrobials in the treatment of strangles are penicillins, cephalosporins and sulfamethoxazole+trimethoprim (Mallicote, 2015), continuous use may lead to the selection of resistant strains.

Considering the importance of the new findings regarding the persistence mechanisms of *S. equi* in carrier horses, it is necessary to evaluate the profile of Brazilian isolates. In this way, the present study aimed to demonstrate phenotypic and genotypic differences between *S. equi* isolates from diseased animals and carriers in terms of sugars fermentation pattern, morphology of colony, capsule presence, antimicrobial susceptibility profile, ability to form biofilm and presence of encoding virulence factors genes.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

For this study were used 42 *S. equi* strains from diseased horses, previously characterized for the M protein allele by Libardoni et al. (2013), 18 strains from carrier horses, also molecularly characterized (Libardoni et al., 2016) and the *S. equi* reference strain ATCC® 39506. All the 60 strains evaluated were isolated from horses bred in Rio Grande do Sul state and belong to the Bacteriology Laboratory strains collection of the Federal University of Santa Maria (LABAC-UFSM), where they were stored lyophilized at -20 ° C.

2.2. Colony morphology and fermentation of sugars

The lyophilized strains were grown on blood agar base (Lab M Limited ®) with 5% (v/v) defibrinated sheep blood for 24 hours at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. Characteristics of the colonies as presence of beta hemolysis, color and appearance were evaluated and held Gram staining and catalase test were done for confirmation. The samples were inoculated in red phenol base broth (Acumedia®) with 1% (w/v) carbohydrates to evaluate their ability to ferment ribose, lactose, trehalose and sorbitol. The readings were performed in 24 and 48 hours (MacFaddin, 2000).

2.3. Capsule visualization by negative staining

For capsule visualization the methodology of Anzai et al. (1999) was followed. Each strain cultured in Todd Hewitt broth (THB) (Himedia®) overnight at 37°C was diluted 1:100

in Todd Hewitt broth supplemented with 0.2% yeast extract (Kasvi®) and 10% complement-inactivated (56°C for 30 minutes) horse serum (LaborClin® Lot 61025007). After 3 hours incubation at 37°C under agitation (60rpm) 15µl of culture were mixed with equal volumes of India ink for performing a smear slide. The smear was fixed by drying at room temperature, stained with 1% gentian violet and observed using an optical microscope (100x objective) in oil immersion. The isolates were classified as absence of capsule, little or much capsule.

2.4. Antimicrobial susceptibility test

The antimicrobial susceptibility profile was determined using disc diffusion method according with document VET01-A4 (CLSI, 2013a) and supplement VET01S (CLSI, 2015). The following classes and their respective antimicrobials were tested: 1) aminoglycosides - streptomycin (10µg) and gentamycin (10µg); 2) beta-lactams - ampicillin (10µg), cephalothin (30µg), ceftiofur (30µg) and penicillin G (10IU); 3) quinolones - enrofloxacin (5µg); 4) phenicols - florfenicol (30µg); 5) macrolides - erythromycin (15µg); 6) ansamycins - rifampicin (5µg); 7) folate pathway inhibitors - sulfamethoxazole+trimethoprim (1.25/23.75µg); and 8) tetracyclines - tetracycline (30µg).

A suspension of each strain in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Himedia®) with turbidity identical to the 0.5 McFarland scale ($1-2 \times 10^8$ CFU/ml) was seeded with a sterile swab in Petri dish (140x15mm) containing Muller Hinton agar with 5% (v/v) defibrinated sheep blood (Laborclin® Lot 70306008). The discs impregnated with the above-mentioned antimicrobials (Laborclin®) were then manually dispensed. The plates were incubated at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. Quality control of the susceptibility tests was carried out using standard strains of *Escherichia coli* (ATCC® 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC®

25923) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC[®] 27853) seeded in petri dishes (140x15mm) containing Muller Hinton agar medium (Laborclin[®] Lot 70306008).

The inhibition diameter zones were read after 22±2 hours of incubation and the susceptibility profile was determined according to the parameters of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) for beta-hemolytic streptococci isolated from horses. Three of the antimicrobials tested had no pattern of interpretation for beta-hemolytic streptococci. The following standards were then used: for enrofloxacin the isolates were classified as sensitive (halo ≥23mm), intermediate (halo 19-22mm) and resistant (halo ≤18mm), based on the interpretation pattern for swine respiratory disease - *Streptococcus suis*. For florfenicol the strains were considered sensitive (halo ≥22 mm), intermediate (halos 19-21mm) and resistant (halo ≤18mm) based on the interpretation pattern for swine respiratory disease - *Streptococcus suis* and for streptomycin isolates were classified as sensitive (halo ≥15mm), intermediate (halos 12-14mm) and resistant (halo ≤11mm) based on the interpretation pattern for human isolates of enterobacteria (CLSI, 2013b).

The multiple antimicrobial resistance index (IRMA) was calculated according to the methodology described by Krumperman (1983), by the ratio between the number of antimicrobials to which each isolate was resistant and the total number of antimicrobials tested. It was also calculated the resistance index for classes of antimicrobials (IRCA) by the ratio of number of antimicrobial classes against which each strain was resistant and the total number of antimicrobials classes tested. Strains were considered multidrug resistant when resistance to at least one agent was observed in three or more antimicrobials classes (IRCA≥0.375) (Magiorakos et al., 2012).

2.5. Biofilm formation

To evaluate the ability of biofilm formation by *S. equi* were followed the recommendations of Stepanovic et al. (2007) with some modifications. Strains were grown on agar base (Lab M Limited[®]) with 5% (v/v) defibrinated sheep's blood for 24 hours at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. Subsequently some colonies of each strain were inoculated in 5ml of Todd Hewitt broth supplemented with 0.2% yeast extract (Kasvi[®]), 10% complement-inactivated (56°C for 30 minutes) horse serum (LaborClin[®] Lot 61025007) and 1% (w/v) of glucose (Synth) (THB+YE+HS+gli), according to methodology suggested by Bustos et al. (2016). After overnight incubation at 37°C optical density (OD) was measured in the Ultrospec[™] 10 Cell Density Meter (Amersham Biosciences) at 600nm and the inoculum purity was evaluated by Gram staining. The OD of all inocula was adjusted to 1.0±0.2.

The assays were performed on 96-well flat bottom culture plates (Kasvi[®]), in which were added 198µl of fresh THB+YE+HS+gli medium and 2µl of the bacterial inoculum (1:100 dilution). Assays were performed in quadruplicate and on every plate was included a negative control (THB+YE+HS+gli medium) and a repeatability control of the tests, the *S. equi* standard strain ATCC[®]39506.

After incubation for 48 hours at 37°C the medium was removed from the plates and each well washed three times with 200µl of sterile distilled water. The plate was dried near the flame and then stained with 150µl of 1% (w/v) gentian violet aqueous solution for 15 minutes. The dye excess was removed from the wells and three washes were performed with 200µl of sterile distilled water. After drying near the flame, the contents fixed in each well were resuspended with 200µl of ethanol 95% (v/v). OD reading was performed on the Multiskan[™] FC microplate photometer (Thermo Scientific[™]) at 550nm.

The biofilm formation capacity of each strain was determined according to the method proposed by Stepanovic *et al.* (2007). For each plate was defined the corrected OD (OD_c) with which the mean OD of each quadruplicate (OD_x) was compared. OD_c was calculated as the mean of the negative control plus three times the standard deviation thereof. Strains that presented OD_x ≤ OD_c were considered non-biofilm forming. When OD_c < OD_x ≤ 2xOD_c the isolates were classified as weak biofilm forming. Moderate biofilm forming were obtained when 2xOD_c < OD_x ≤ 4xOD_c and strong biofilm forming when OD_x > 4xOD_c.

2.6. Detection of virulence associated genes

Each strain was cultured in 2ml of BHI broth overnight. The broth was centrifuged at 13000rpm for 5 minutes, the supernatant was discarded and the pellet suspended in 1ml of mili-Q water. This wash was repeated 3 times before perform DNA extraction using CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) protocol after their treatment with 5μL of proteinase K (20 mg/mL) for 60min at 37°C, according to Sambrook and Russell (2001) Then, the nucleic acid was extracted with buffered phenol-chloroform. Precipitation was performed with isopropanol (overnight) and ethanol 70°GL. After drying, the pellet was resuspended in 100μL of ultrapure water.

The DNA templates were tested by single PCR targeting the loci/genes: equibactin (siderophore) – *eqbE* (1063bp) and *eqbG* (201bp), operons *has* (hyaluronic acid capsule) – *hasA-hasB* portion (1912bp) and *hasB-hasC* portion (892bp), and superantigenic toxins – *seeH* (503bp) and *seeI* (520bp). The respective primers used were: ZM435 (5'- CCG AAT TTG TCC AAG TGG TAT G) and ZM436 (5'-GCA CTC CGT TAT ACT CAC TG) according to Webb *et al.* (2013) and ICESe2GC2F (5'- TTA CCT CCA TTA CTT GAC AAT CCA T) and ICESe2GC2R (5'-GAT TTG CAA CAT GAA ACA TTT ACA G) according to

Cordoni *et al.* (2015); *hasAB-F* (5'-CAT TGT TCA TCG GTC AGA G), *hasAB-R* (5'-CTT TGG CAG GCA ATA G), *hasBC-F* (5'-GGT CTA GAT GCT CAG C) and *hasBC-R* (5'-CTC TAG GGT GGC TCT G) according to Harris *et al.* (2015); *seeH-F* (5'-AGC ATG ATT CTA ACT TAA TTG AAG CCG), *seeH-R* (5'-TAG CAT GCT ATT AAA GTC TCC ATT GCC), *seeI-F* (5'-GAA GGT CCG CCA TTT TCA GGT AGT TTG) and *seeI-R* (5'-GCA TAC TCT CTC TGT CAC CAT GTC CTG) according to Alber *et al.* (2004) (Table 1).

The PCR reactions were performed in a final volume of 25 μ L containing 5 μ L of Buffer GoTaq[®] (Promega), 10mM of each primer, 20mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 1U of GoTaq DNA[®] Polymerase, 1 μ L of DNA template (\cong 100ng) and ultrapure water. For all reactions a positive control (*S. equi* reference strain ATCC[®] 39506) and a negative control (ultrapure water) were used. The amplification products were observed in agarose gel stained with GelRed[™] (Biotium-Uniscience). Two PCR products of each gene were sequenced by ACTGene Análises Moleculares LTDA (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) using the automatic sequencer ABI- PRISM 3100 Genetic Analyzer armed with 50cm capillaries and POP6 polymer (Applied Biosystems) with the purpose of confirming their identity.

2.7. Statistical analysis

Due to the lack of normality in the data, the IRMA, IRCA and multiresistant values were compared among the strains of *S. equi* of diseased horses and carriers by the chi-square test. Analyses were performed using SAS (2009) version 9.2. Statistical significance was defined at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Morphology of colony and sugars fermentation

All strains showed beta-hemolysis, negative reaction in the catalase test and chains of Gram-positive cocci. *S. equi* strains from diseased animals (92.9%) presented predominantly mucoid and honey color, while those from carriers animal (100%) presented grayish-white color and dry appearance. The results of carbohydrates fermentation are shown in Table 2 where it is possible to evidence atypical patterns in 100% of equine carrier strains (18/18) and only in 7.1% of diseased animals (3/42). These 21 strains were able to ferment ribose, 12 of them also used lactose, 12 trehalose and 11 sorbitol.

3.2. Hyaluronic acid capsule

Through the negative staining with India ink it was possible to evaluate the presence of capsule in the analyzed *S. equi* strains. Strains of diseased animals had predominantly a large capsule (39/42), whereas those of carriers had a small amount or absence of capsule (Table 2). Figure 1 shows the three capsule patterns observed in the strains of this study.

3.3. Antimicrobial susceptibility

All *S. equi* strains evaluated in this study were susceptible to cephalothin and rifampicin. Forty-two strains from diseased animals (100%) and 16 (88.8%) from carriers showed sensitivity to ceftiofur. Most of the strains were resistant to enrofloxacin (59/60), streptomycin (46/60) and gentamicin (46/60). The strains of carrier animals also showed considerable re-

sistance to penicillin (9/18), tetracycline (9/18), ampicillin (8/18) and sulfamethoxazole+trimethoprim (7/18). In the diseased animals strains, however, were observed lower rates of resistance to penicillin (3/42), sulfamethoxazole+trimethoprim (4/42), ampicillin (4/42) and tetracycline (1/42). Susceptibility profiles of strains from diseased and carrier animals can be seen in Figure 2. Standard strains used as quality control had inhibition diameter zone within the threshold range established by CLSI (2015).

The mean IRMA of diseased animals strains was 0.234 (0.000-0.750) and of carriers 0.403 (0.083-0.750), with difference between the two groups ($p = 0.0006$). Results by antimicrobial class followed the same standard, mean IRCA was 0.262 (0.000-0.875) and 0.451 (0.125-0.875) for diseased and carrier equine strains, respectively ($p < 0.0001$). The proportion of multiresistant strains was higher in the carrier ($13/18 = 72.2\%$) than in the diseased ($5/42 = 11.9\%$) strains group ($p < 0.0001$).

3.4. Biofilm production

Thirty-three (78.6%) strains of diseased animals were able to produce biofilm *in vitro*. Of these, 10 were classified as strong biofilm forming, 11 moderate and 12 as weak. Already in animal carriers strains, 17 (99.4%) were able to form biofilm. Five of these were strong, eight moderate and four weak biofilm forming. The respective percentages are shown in Figure 3. The standard strain of *S. equi* ATCC[®] 39506 was strong biofilm forming in all plates, demonstrating that there was repeatability in tests execution.

3.5. Virulence associated genes

For the genes of equibactin loci, none of the isolates from carrier animals had the *eqbE* gene while 95.2% (2/42) of the *S. equi* isolates from diseased animals present this gene. All 60 strains showed the *eqbG* gene.

For the superantigens encoding genes, 93% (39/42) and 83% (15/18) of isolates from diseased and carrier horses, respectively, showed the *seeH* gene. In 7% (3/42) of the isolates from diseased animals the *seeH* amplified product showed a different size than expected and in 17% (3/18) of the isolates from carriers animals the *seeH* gene was not present. As with the positive control, all 60 strains showed *seeI* gene and the amplification product was the expected size (520bp).

For the genes involved in capsule production (*has* operon), the *hasA/B* portion was observed in 98% (41/42) of the isolates from diseased animals and only in 33% (6/18) of carriers. That is, 67% (12/18) of the isolates of carriers do not have this portion. The *hasB/C* portion was observed in all isolates of both groups, however in 61% (11/18) of the isolates of carriers and in 2% (1/42) of the isolates of diseased animals the amplified product presented a different size than expected. These data are best illustrated in Table 3.

4. Discussion

Although *S. equi* is a pathogen restricted to a single host (Waller et al., 2011) and survives during a short time in the environment, strangles is a worldwide widespread disease. A possible explanation for this discrepancy would be the equilibrium that the bacteria established with the equines, causing an acute disease with low mortality rate followed by persistent infection for long periods, which allows its survival and transmission to new susceptible

hosts (Harris et al., 2015). Despite being an old disease, control of strangles is far from being achieved. Therefore, understanding the mechanisms of persistence in the host could indicate the key points / targets for the efficient control of this disease.

Using only phenotypic identification methods *S. equi* may be identified incorrectly, particularly in view of atypical strains with unexpected profile of sugars fermentation. In this study, were found 21 atypical strains capable of fermenting ribose. This finding disagree with previous results, where atypical strains would be able to ferment only trehalose and / or lactose (Grant et al., 1993), but not ribose. In addition, 11 strains analyzed also fermented sorbitol, formerly considered a differential between *S. equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) (Bannister et al., 1985). We emphasize, however, that the strains examined in this study were previously characterized as *S. equi* by amplification and sequencing of the N-terminal region of gene encoding the M protein (seM) (Libardoni et al. 2013, Libardoni et al. 2016), which is unique to *S. equi* (Timoney et al. 1997, Kelly et al. 2006, Lindahl et al. 2011).

Although phenotypic techniques are being replaced by molecular techniques for diagnostic purposes, the fermentation profile of sugars is also important, since this is closely related to the pathogenicity of streptococci (Shelburne et al., 2008). Comparisons between *S. zooepidemicus* and *S. equi* genomes suggest that *S. equi* evolved from *S. zooepidemicus* (Jorm et al., 1994; Webb et al., 2008) and one of the steps of this differentiation resulted in the loss of the ability to ferment lactose, trehalose and sorbitol, which would also have reduced their ability to colonize mucosal surfaces (Holden et al., 2009). Utilization of different carbohydrates plays an important role in the ability of streptococci to colonize mucosal surfaces (Shelburne 3rd et al., 2008) and reduction of its metabolic capabilities could further reduce the potential of *S. equi* to persist on the equines (Waller et al., 2011). However, since in order

to persist in equines *S. equi* must colonize the mucosa of upper respiratory tract and guttural pouches, it could also have recovered the ability to ferment these carbohydrates.

A recent study demonstrated that strains of *S. zooepidemicus* capable of using arbutin, a carbohydrate present in the diet of some animals, were positively selected to cause mastitis in sheep and goats (Steward et al., 2017). Likewise, strains of *S. equi* with the ability to ferment ribose, trehalose, lactose and / or sorbitol could also have been selected to persist in horses after the acute stage of strangles.

In addition, the fact that *S. equi* is located in unusual niche on equine carriers and probably with less nutrients available could also explain the absence of capsule (Waller et al., 2011). A study evaluating the ability of group A streptococci to colonize human oropharynx demonstrated that when this pathogen is installed in the respiratory mucosa the production of virulence factors and metabolic pathways are altered, aiming to improve the persistence capacity of this microorganism in saliva (Shelburne III et al., 2005). In this sense, when colonizing the respiratory mucosa *S. equi* would regulate capsule production and increase the ability to ferment carbohydrates as a survival strategy. Further studies, based on the monitoring of horses with persistent infection, are necessary to confirm this hypothesis.

The hyaluronic acid capsule is an important virulence factor of *S. equi* (Harrington et al., 2002) and contributes to protection against phagocytosis (Woolcock 1974, Anzai et al. 1999, Timoney et al. 2014). In this study, the strains of diseased animals that showed too much capsule in negative staining also had mucoid colonies when cultured in blood agar. Therefore, our findings agree with the literature. In addition, studies of gene expression quantification of the locus *has* demonstrated that *S. equi* isolated from carrier animals express significantly lower amounts of these genes, producing less capsule and decreasing the virulence of these strains (Harris et al. 2015, Waller 2016). None of the carrier isolates showed the *eqbE* gene and two thirds also do not have the *hasA-B* portion of the *has* operon, which could ex-

plain the smaller amount of capsule in these strains. Thus, our results reinforce the recent findings on this field, since *S. equi* isolates from carrier animals had dry colonies and the capsule was small or absent.

The antimicrobials of choice for the treatment of beta-hemolytic streptococci are penicillin G (Giguère et al., 2013), ampicillin, cefazolin, ceftiofur and alternatively sulfamethoxazole+trimethoprim, erythromycin, rifampicin and chloramphenicol (Wilson, 2001). Studies in Brazil and Argentina have shown that, in general, *S. equi* isolates are sensitive to penicillin and sulfamethoxazole+trimethoprim (Kirinus et al., 2011; Bustos et al., 2017). However, considerable resistance to penicillin (50%) and sulfazothrin (38.8%) were observed in the present study. This could be explained by the fact that these are the most commonly used antimicrobials in the treatment of equine adenitis. The isolates of equine carriers showed higher antimicrobial resistance indices compared to the isolates of diseased horses, showing that in addition to the differences observed in relation to sugar fermentation and capsule production, these isolates may also present a different antimicrobial susceptibility profile. The percentage of isolates resistant to gentamicin and streptomycin was high in both groups of isolates, which could be explained by the antimicrobial action of the aminoglycosides to be directed primarily to aerobic organisms (Giguère et al., 2013). Thus, the resistance of *S. equi* to aminoglycosides can be explained by the microaerophilic nature of this microorganism (Quinn et al., 2011), reflecting the conditions of incubation in atmosphere with 5% CO₂ (CLSI, 2013c). Differing results regarding the susceptibility of *S. equi* to aminoglycosides can be justified by the absence of incubation in atmosphere containing 5% CO₂ (Kirinus et al., 2011; Pansani et al., 2016).

The capacity of biofilm formation by *S. equi* is still an unexplored subject, although it is well studied in human *Streptococcus pneumoniae* (Allegrucci et al., 2006; Moscoso et al., 2009; Domenech et al., 2012) and *Streptococcus pyogenes* (Fiedler et al., 2013). Since iso-

lates of carrier horses produce small amounts of capsule, the biofilm formation capacity could be a compensatory mechanism for evading the immune system. However, contrary to what has been observed for *S. pneumoniae* (Moscoso et al., 2006, 2009; Domenech et al., 2009), this hypothesis was not proven in this study, since strains isolated from diseased equines with normal capsule production were also able to form biofilm *in vitro*. Thus, the presence or absence of capsule did not interfere with the ability of *S. equi* to form biofilm. This is the first study on the capacity of biofilm formation in Brazilian isolates of *S. equi*. Studies with Argentine isolates also demonstrated the capacity of biofilm formation by this bacteria (Bustos, 2015; Bustos et al., 2016), and likewise did not observe differences between isolates of diseased animals and carriers.

5. Conclusion

There are phenotypic differences between *S. equi* isolates from diseased horses and carriers on the ability to ferment ribose, lactose, trehalose and sorbitol, capsule presence and antimicrobial susceptibility profile. *S. equi* isolates from diseased horses and carriers have similar ability to form biofilm *in vitro* under the conditions analyzed. Therefore, the presence or absence of capsule does not interfere in biofilm formation by *S. equi*. Strains isolated from animal carriers lost genes associated with virulence factors, such as the siderophore equibactin and the hyaluronic acid capsule. Further studies, based on complete genome sequencing, could elucidate which other genes are involved in the phenotype changes of the carrier strains.

Conflicts of interest: none

Acknowledgements - The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the Masters scholarship and the resources of the Edital Universal 14/2014 – Concession 455454/2014-0.

References

- Alber, J., El-Sayed, A., Lämmler, C., Hassan, A.A., Weiss, R., Zschöck, M., 2004. Multiplex polymerase chain reaction for identification and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* and *Streptococcus equi* subsp. *equi*. J. Vet. Med. B 51, 455–458. doi:10.1111/j.1439-0450.2004.00799.x
- Allegrucci, M., Hu, F.Z., Shen, K., Hayes, J., Ehrlich, G.D., Post, J.C., Sauer, K., 2006. Phenotypic Characterization of *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Development. J. Bacteriol. 188, 2325–2335. doi:10.1128/JB.188.7.2325
- Anzai, T., Timoney, J.F., Kuwamoto, Y., Fujita, Y., Wada, R., Inoue, T., 1999. In vivo pathogenicity and resistance to phagocytosis of *Streptococcus equi* strains with different levels of capsule expression. Vet. Microbiol. 67, 277–286. doi:10.1016/S0378-1135(99)00051-6
- Bannister, M.F., Benson, C.E., Sweeney, C.R., 1985. Rapid Species Identification of Group C Streptococci Isolated from Horses. J. Clin. Microbiol. 21, 524–526.
- Boyle, A.G., Timoney, J.F., Newton, J.R., Hines, M.T., Waller, A.S., Buchanan, B.R., 2018. *Streptococcus equi* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles-Revised Consensus Statement. J. Vet. Intern. Med. doi:10.1111/jvim.15043
- Bustos, C.P., 2015. Adenitis equina: aislamiento y caracterización de *Streptococcus equi* subsp. *equi* de la provincia de Buenos Aires. Universidad de Buenos Aires.
- Bustos, C.P., Lanza, N.S., Marfil, M.J., Etchecopaz, A.N., Muñoz, A.J., Moras, E.V., Guida, N., 2016. Expression of capsule and biofilm formation by *Streptococcus equi* subsp. *equi*, in: 10th IEIDC Abstracts / Journal of Equine Veterinary Science. p. S94. doi:10.1016/j.jevs.2016.02.201
- Bustos, C.P., Marfil, M.J., Lanza, N.S., Guida, N., 2017. Sensibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Streptococcus equi* subsp. *equi* de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev. Argent. Microbiol. doi:10.1016/j.ram.2017.05.006
- CLSI, 2015. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 3rd ed. CLSI supplement VET01S. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI, 2013a. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests

- for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Fourth Edition. CLSI document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI, 2013b. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI, 2013c. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Fourth Edition. CLSI document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cordoni, G., Williams, A., Durham, A., Florio, D., Zanoni, R.G., La Ragione, R.M., 2015. Rapid diagnosis of strangles (*Streptococcus equi* subspecies *equi*) using PCR. Res. Vet. Sci. 102, 162–166. doi:10.1016/j.rvsc.2015.08.008
- Costerton, J.W., 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science (80-). 284, 1318–1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318
- Domenech, M., García, E., Moscoso, M., 2012. Minireview: Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. Microb. Biotechnol. 5, 455–465. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00294.x
- Domenech, M., García, E., Moscoso, M., 2009. Versatility of the capsular genes during biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. Environ. Microbiol. 11, 2542–2555. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01979.x
- Fiedler, T., Riani, C., Koczan, D., Standar, K., Kreikemeyer, B., 2013. Protective Mechanisms of Respiratory Tract Streptococci against *Streptococcus pyogenes* Biofilm Formation and Epithelial Cell Infection. Appl. Environ. Microbiol. 79, 1265–1276. doi:10.1128/AEM.03350-12
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nat. Rev. Microbiol. 14, 563–575. doi:10.1038/nrmicro.2016.94
- Giguère, S., Prescott, J.F., Dowling, P.M., 2013. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Fifth. ed. John Wiley & Sons, Inc, Somerset, NJ, EUA.
- Grant, S.T., Efstratiou, A., Chanter, N., 1993. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. Vet. Rec. 133, 215–216. doi:http://dx.doi.org/10.1136/vr.133.9.215
- Harrington, D.J., Sutcliffe, I.C., Chanter, N., 2002. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. Microbes Infect. 4, 501–510. doi:10.1016/S1286-4579(02)01565-4
- Harris, S.R., Robinson, C., Steward, K.F., Webb, K.S., Paillot, R., Parkhill, J., Holden, M.T.G., Waller, A.S., 2015. Genome specialization and decay of the strangles pathogen, *Streptococcus equi*, is driven by persistent infection. Genome Res. 25, 1360–1371. doi:10.1101/gr.189803.115
- Heather, Z., Holden, M.T.G., Steward, K.F., Parkhill, J., Song, L., Challis, G.L., Robinson, C., Davis-Poynter, N., Waller, A.S., 2008. A novel streptococcal integrative conjugative

- element involved in iron acquisition. *Mol. Microbiol.* 70, 1274–1292.
doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06481.x
- Holden, M.T.G., Heather, Z., Paillot, R., Steward, K.F., Webb, K., Ainslie, F., Jourdan, T., Bason, N.C., Holroyd, N.E., Mungall, K., Quail, M.A., Sanders, M., Simmonds, M., Willey, D., Brooks, K., Aanensen, D.M., Spratt, B.G., Jolley, K.A., Maiden, M.C.J., Kehoe, M., Chanter, N., Bentley, S.D., Robinson, C., Maskell, D.J., Parkhill, J., Waller, A.S., 2009. Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi* host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens. *PLoS Pathog.* 5.
doi:10.1371/journal.ppat.1000346
- Jorm, L.R., Love, D.N., Bailey, G.D., McKay, G.M., Briscoe, D.A., 1994. Genetic structure of populations of beta-haemolytic Lancefield group C streptococci from horses and their association with disease. *Res. Vet. Sci.* 57, 292–299.
- Kelly, C., Bugg, M., Robinson, C., Mitchell, Z., Davis-Poynter, N., Newton, J.R., Jolley, K.A., Maiden, M.C.J., Waller, A.S., 2006. Sequence variation of the SeM gene of *Streptococcus equi* allows discrimination of the source of strangles outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 44, 480–486. doi:10.1128/JCM.44.2.480-486.2006
- Kirinus, J.K., Pötter, L., Gressler, L.T., Leite, F.L.L., Vargas, A.P.C., 2011. Perfil fenotípico e susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus equi* isolados de equinos da região Sul do Brasil. *Pesqui. Vet. Bras.* 31, 231–238.
- Krumperman, P.H., 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 165–170.
- Kuwamoto, Y., Anzai, T., Wada, R., 2001. Microplate Sugar-Fermentation Assay Distinguishes *Streptococcus equi* from Other Streptococci of Lancefield's Group C. *J. Equine Sci.* 12, 47–49. doi:10.1294/jes.12.47
- Libardoni, F., Machado, G., Gressler, L.T., Kowalski, A.P., Diehl, G.N., dos Santos, L.C., Corbellini, L.G., de Vargas, A.C., 2016. Prevalence of *Streptococcus equi* subsp. *equi* in horses and associated risk factors in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Res. Vet. Sci.* 104, 53–57. doi:10.1016/j.rvsc.2015.11.009
- Libardoni, F., Vielmo, A., Farias, L., Matter, L.B., Pötter, L., Spilki, F.R., de Vargas, A.C., 2013. Diversity of seM in *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from strangles outbreaks. *Vet. Microbiol.* 162, 663–9. doi:10.1016/j.vetmic.2012.09.010
- Lindahl, S., Söderlund, R., Frosth, S., Pringle, J., Båverud, V., Aspán, A., 2011. Tracing outbreaks of *Streptococcus equi* infection (strangles) in horses using sequence variation in the seM gene and pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 153, 144–9. doi:10.1016/j.vetmic.2011.03.027
- MacFaddin, J.F., 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012.

- Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Mallicote, M., 2015. Update on *Streptococcus equi* subsp *equi* infections. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 31, 27–41. doi:10.1016/j.cveq.2014.11.003
- Moscoso, M., García, E., López, R., 2009. Pneumococcal biofilms. *Int. Microbiol.* 12, 77–85. doi:10.2436/20.1501.01.84
- Moscoso, M., García, E., López, R., 2006. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: Role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J. Bacteriol.* 188, 7785–7795. doi:10.1128/JB.00673-06
- Newton, J.R., Wood, J.L., Dunn, K.A., DeBrauwere, M.N., Chanter, N., 1997. Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*. *Vet. Rec.* 140, 84–90.
- Pansani, A.M., Gatto, I.R.H., Frias, D.F.R., Kozusny-Andreani, D.I., 2016. Prevalência e resistência a antibióticos de *Streptococcus equi* da cavidade nasal de equinos hípidos no município de Fernandópolis, São Paulo, Brasil. *Acta Vet. Bras.* 10, 144–149.
- Quinn, P., Markey, B., Leonard, F., FitzPatrick, E., 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SAS, 2009. *Statistical Analysis System. SAS/STAT user guide.*
- Shelburne, S.A., Davenport, M.T., Keith, D.B., Musser, J.M., 2008. The role of complex carbohydrate catabolism in the pathogenesis of invasive streptococci. *Trends Microbiol.* 16, 318–325. doi:10.1016/j.tim.2008.04.002
- Shelburne 3rd, S.A., Keith, D., Horstmann, N., Sumbly, P., Davenport, M.T., Graviss, E.A., Brennan, R.G., Musser, J.M., 2008. A direct link between carbohydrate utilization and virulence in the major human pathogen group A *Streptococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1698–1703. doi:10.1073/pnas.0711767105
- Shelburne III, S.A., Sumbly, P., Sitkiewicz, I., Granville, C., Deleo, F.R., Musser, J.M., 2005. Central role of a bacterial two-component gene regulatory system of previously unknown function in pathogen persistence in human saliva. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 16037–16042.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* 115, 891–899. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Steward, K.F., Robinson, C., Holden, M.T.G., Harris, S.R., Ros, A.F., Pérez, G.C., Baselga, R., Waller, A.S., 2017. Diversity of *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus* strains

- isolated from the Spanish sheep and goat population and the identification, function and prevalence of a novel arbutin utilisation system. *Vet. Microbiol.* 207, 231–238. doi:10.1016/j.vetmic.2017.06.020
- Stewart, P.S., Costerton, J.W., 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135–138. doi:10.1016/S0140-6736(01)05321-1
- Sweeney, C.R., Timoney, J.F., Newton, J.R., Hines, M.T., 2005. *Streptococcus equi* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 123–134. doi:0891-6640/05/1901-0021/\$3.00/0
- Timoney, J.F., 1993. Strangles. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 9, 365–374.
- Timoney, J.F., Artiushin, S.C., Boschwitz, J.S., 1997. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-like proteins SeM and SzPSe. *Infect. Immun.* 65, 3600–3605.
- Timoney, J.F., Suther, P., Velineni, S., Artiushin, S.C., 2014. The Antiphagocytic Activity of SeM of *Streptococcus equi* Requires Capsule. *J. Equine Sci.* 25, 53–56. doi:10.1294/jes.25.53
- Waller, A.S., 2016. Strangles : a pathogenic legacy of the war horse. *Vet. Rec.* 178, 91–92. doi:10.1136/vr.i123
- Waller, A.S., 2014. New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses. *Vet. Clin. North Am. - Equine Pract.* 30, 591–607. doi:10.1016/j.cveq.2014.08.007
- Waller, A.S., 2013. Strangles: Taking steps towards eradication. *Vet. Microbiol.* 167, 50–60. doi:10.1016/j.vetmic.2013.03.033
- Waller, A.S., Paillot, R., Timoney, J.F., 2011. *Streptococcus equi*: A pathogen restricted to one host. *J. Med. Microbiol.* 60, 1231–1240. doi:10.1099/jmm.0.028233-0
- Webb, K., Barker, C., Harrison, T., Heather, Z., Steward, K.F., Robinson, C., Newton, J.R., Waller, A.S., 2013. Detection of *Streptococcus equi* subspecies *equi* using a triplex qPCR assay. *Vet. J.* 195, 300–304. doi:10.1016/j.tvjl.2012.07.007
- Webb, K., Jolley, K.A., Mitchell, Z., Robinson, C., Newton, J.R., Maiden, M.C.J., Waller, A., 2008. Development of an unambiguous and discriminatory multilocus sequence typing scheme for the *Streptococcus zooepidemicus* group. *Microbiology* 154, 3016–3024. doi:10.1099/mic.0.2008/018911-0
- Wilson, W.D., 2001. Rational Selection of Antimicrobials for Use in Horses, in: *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 2001.* p. 75–93.
- Wood, J.L., Dunn, K., Chanter, N., de Brauwere, N., 1993. Persistent infection with *Streptococcus equi* and the epidemiology of strangles. *Vet. Rec.* 133, 375. doi:10.1136/vr.133.15.375-A
- Woolcock, J.B., 1974. The capsule of *Streptococcus equi*. *J. Gen. Microbiol.* 85, 372–375.

Figure captions

Fig.1. Negative staining with India ink showing isolates with absence of capsule (A), few capsule (B) and lots of capsule (C). The arrows indicate the location of the capsule, involving Gram-positive cocci. Optical microscope. 1000x magnification.

Fig.2. Antimicrobials susceptibility profile of *S. equi* isolated from diseased and carrier horses. Bars indicate the proportion of isolates resistant to each antimicrobial.

Fig.3. Result of the in vitro biofilm formation capacity test for isolates of diseased horses and carriers. The results are expressed as percentage of isolates for each category.

Table 1. List of the primers used in this study.

Gene	Primer	Sequence (5' - 3')	Size of PCR product (bp)	Author
<i>eqbE</i>	ZM435	CCGAATTTGTCCAAGTGGTATG	1063	Webb et al. (2013)
	ZM436	GCACTCCGTTATACTCACTG		
<i>eqbG</i>	ICESE2F	TTACCTCCATTACTTGACAATCCAT	201	Cordoni et al. (2015)
	ICESE2R	GATTTGCAACATGAAACATTTACAG		
<i>hasAB</i>	hasA F1	CATTGTTTCATCGGTCAGAG	1912	Harris et al. (2015)
	hasB R2	CTTTGGCAGGCAATAG		
<i>hasBC</i>	hasB F2	GGTCTAGATGCTCAGC	892	Harris et al. (2015)
	hasC R1	CTCTAGGGTGGCTCTG		
<i>seeH</i>	<i>seeH</i> -F	AGCATGATTCTAACTTAATTGAAGCCG	503	Alber et al. (2004)
	<i>seeH</i> -R	TAGCATGCTATTAAGTCTCCATTGCC		
<i>seel</i>	<i>seel</i> -F	GAAGGTCCGCCATTTTCAGGTAGTTTG	520	Alber et al. (2004)
	<i>seel</i> -R	GCATACTCTCTCTGTCACCATGTCCTG		

Table 2. Phenotypic characteristics of the 60 *S. equi* isolates used in this study and the ATCC® 39506.

Group	Type (n)	Morphology of colonies		Sugars Fermentation				Capsule
		Color	Mucoid	Ribose	Lactose	Trehalose	Sorbitol	
Diseased horses strains n=42	A (39)	honey	Yes	-	-	-	-	much
	B (2)	white-gray	little	+	+	-	+	little
	C (1)	honey	Yes	+	-	+	-	little
Carrier horses strains n=18	B (7)	white-gray	little	+	+	-	+	little
	D (8)	white-gray	No	+	-	+	-	absent
	E (2)	white-gray	No	+	+	+	+	absent
	F (1)	white-gray	No	+	+	+	-	absent
Control	<i>S. equi</i> ATCC® 39506	honey	Yes	-	-	-	-	much

(-):inability to ferment the sugar. (+):ability to ferment the sugar.

Table 3. PCR results for *hasA/B*, *hasB/C*, *eqbE*, *eqbG*, *seeH* and *seeI* genes of the 60 *S. equi* isolates used in this study and the ATCC® 39506.

Group	Result	<i>hasA/B</i>	<i>hasB/C</i>	<i>eqbE</i>	<i>eqbG</i>	<i>seeH</i>	<i>seeI</i>
Diseased horses strains n=42	+	41	41	40	42	39	42
	-	1		2			
	+*		1			3	
Carrier horses strains n=18	+	6	7		18	15	18
	-	12		18		3	
	+*		11				
<i>S. equi</i> ATCC® 39506		+	+	+	+	+	+

+: presence of the gene;

-: absence of the gene;

+*: amplicon size different from the expected.

Figure 1.

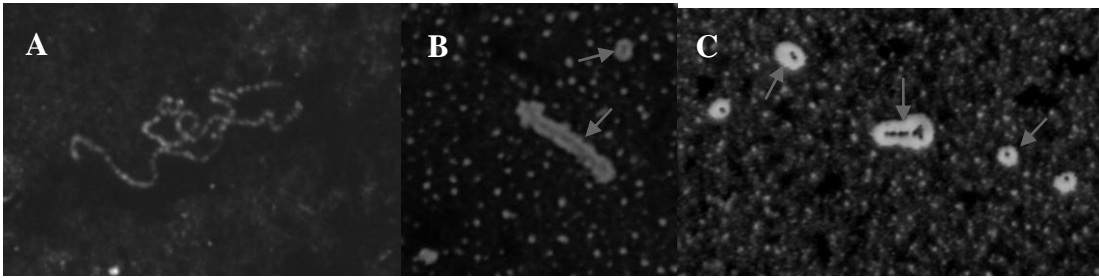


Figure 2.

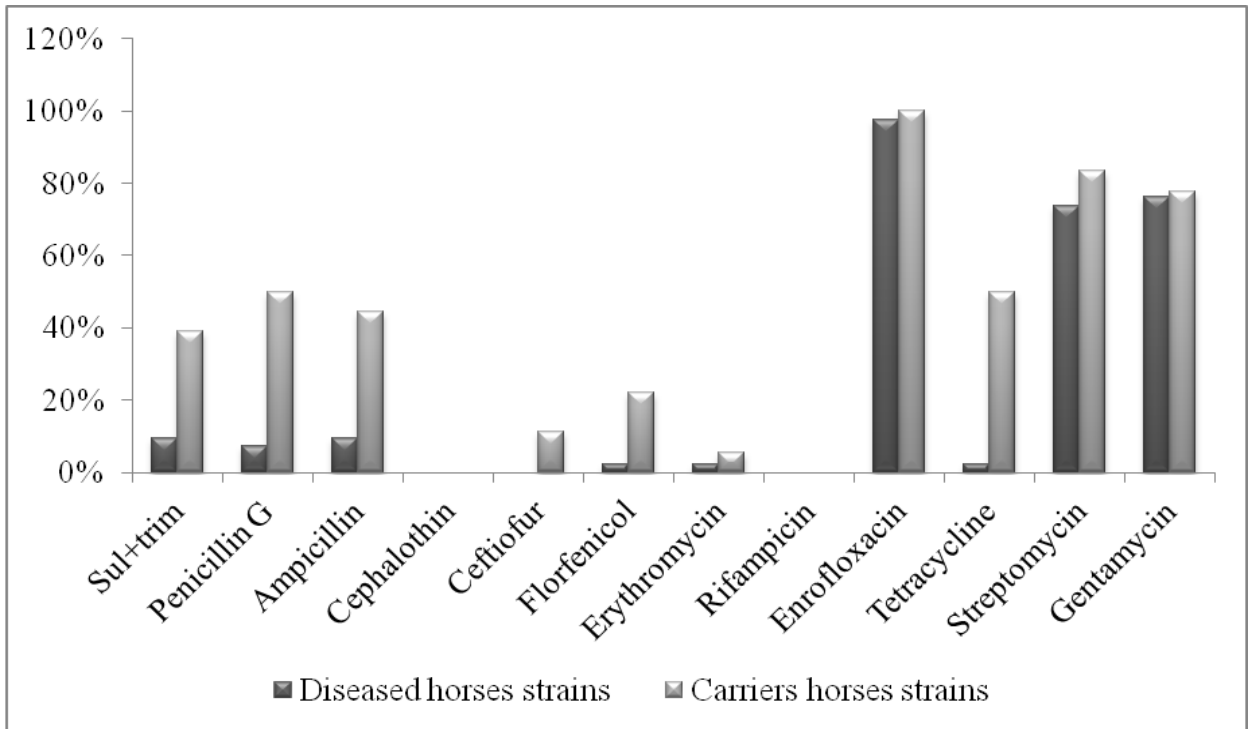
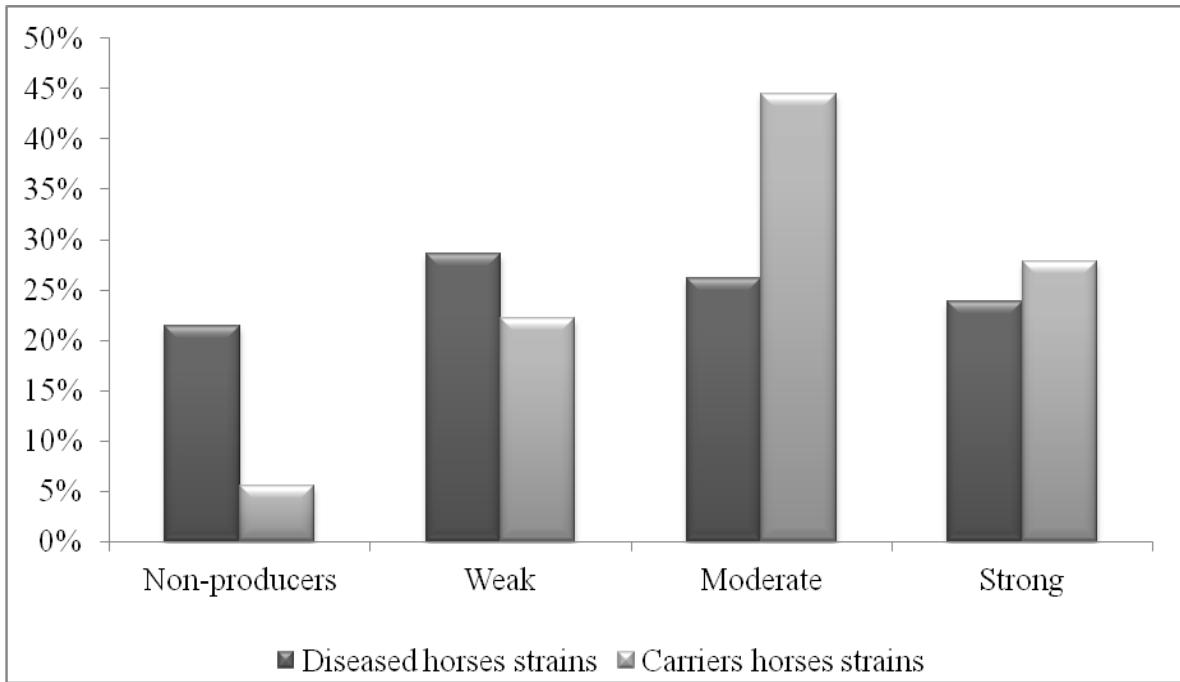


Figure 3.



Highlights

- Isolates from carrier animals produced little or no capsule;
- All *S. equi* isolated from carrier horses fermented at least two sugars;
- 72% of the strains isolated from carriers were multiresistant;
- Most isolates produced biofilm, regardless of whether they have or not capsule;
- All *S. equi* isolated from carrier horses presented deletion of the *eqbE* gene.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

S. equi isolados de equinos portadores do estado do Rio Grande do Sul são diferentes dos isolados de animais doentes por apresentarem colônias com aparência seca, coloração branco-acinzentada e pouca ou nenhuma quantidade de cápsula. Essas cepas demonstram maior habilidade de fermentar açúcares, o que pode ser uma vantagem evolutiva, uma forma de adaptação ao hospedeiro. Possuem também maior índice de resistência aos antimicrobianos. Foi observada uma elevada proporção de cepas multirresistentes nos isolados de equinos portadores.

Foi demonstrada a capacidade de isolados de animais doentes e portadores formarem biofilme *in vitro* e esta habilidade em *S. equi* parece não estar associada à presença de cápsula ou ao *status* de portador.

Os isolados brasileiros de animais portadores seguem o mesmo padrão de perda de genes já reportado na literatura internacional, apresentando deleções em genes envolvidos na produção da cápsula e associados à aquisição de ferro (equibactin). Isto reforça a teoria de que após a doença clínica *S. equi* sofre modificações para permanecer nos equídeos, que são seus únicos hospedeiros naturais.

Testes moleculares para caracterização de *S. equi* baseados na detecção dos genes *eq-bE* e *seeH* não devem ser utilizados isoladamente, uma vez que poderiam gerar resultados falsos negativos diante de isolados que apresentem deleções, como os descritos neste estudo e na literatura internacional.

Estudos mais aprofundados, baseados no sequenciamento total do genoma de algumas cepas, podem demonstrar se ocorrem modificações em outros loci gênicos em isolados de animais portadores.

REFERÊNCIAS

- 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 B**, v. 51, p. 455–458, 2004.
- ALBER, J. *et al.* Dissemination of the superantigen encoding genes *seeL*, *seeM*, *szel* and *szeM* in *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 1–2, p. 135–141, 2005.
- ALLEGRUCCI, M.; SAUER, K. Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 5, p. 2030–2038, 2007.
- ANZAI, T.; TIMONEY, J. F.; *et al.* In vivo pathogenicity and resistance to phagocytosis of *Streptococcus equi* strains with different levels of capsule expression. **Veterinary Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 277–286, 1999.
- ANZAI, T.; SHEORAN, A. S.; *et al.* *Streptococcus equi* but not *Streptococcus zooepidemicus* produces potent mitogenic responses from equine peripheral blood mononuclear cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 67, n. 3, 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, n. 12, p. 2167–2171, 2005.
- APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 526–530, 2008.
- ARTIUSHIN, S. C. *et al.* Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE-H and SePE-I of *Streptococcus equi*. **Microbial Pathogenesis**, v. 32, n. 2, p. 71–85, 2002.
- BANNISTER, M. F.; BENSON, C. E.; SWEENEY, C. R. Rapid Species Identification of Group C Streptococci Isolated from Horses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 524–526, 1985.
- BARNETT, T. C. *et al.* Streptococcal toxins: Role in pathogenesis and disease. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 1721–1741, 2015.
- BLANK, L. M.; HUGENHOLTZ, P.; NIELSEN, L. K. Evolution of the hyaluronic acid synthesis (*has*) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic streptococci. **Journal of Molecular Evolution**, v. 67, n. 1, p. 13–22, 2008.
- 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.

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

BOYLE, A. G. *et al.* *Streptococcus equi* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles-Revised Consensus Statement. **Journal of veterinary internal medicine**, fev. 2018.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA N. 50, DE 24 DE SETEMBRO DE 2013. MAPA -MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2013.

BUSTOS, C. P. *et al.* **Expression of capsule and biofilm formation by *Streptococcus equi* subsp. *equi*** 10th IEIDC Abstracts / Journal of Equine Veterinary Science. **Anais...**2016

BUSTOS, C. P.; MARFIL, M. J.; *et al.* Sensibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Streptococcus equi* subsp. *equi* de la provincia de Buenos Aires, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, n. xx, 2017a.

BUSTOS, C. P.; MESPLET, M.; *et al.* **SEM ALLELE TYPES OF *STREPTOCOCCUS EQUI* SUBSP. *EQUI* IDENTIFIED IN BUENOS AIRES PROVINCE, ARGENTINA** Workshop: Getting to Grips with Strangles and other Streptococcal Diseases. **Anais...**Gallatin Gateway, Montana: Havemeyer Foundation, Inc., 2017

BUSTOS, C. P.; MARFIL, M. J.; *et al.* Estudio de la capacidad productora de biofilm en *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **Revista Veterinaria**, v. 28, n. 1, p. 3–8, 2017b.

CAMILLI, R.; PANTOSTI, A.; BALDASSARRI, L. Contribution of serotype and genetic background to biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 97–102, 2011.

CEPEA. **ESTUDO DO COMPLEXO DO AGRONEGÓCIO CAVALO**. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/documentos/texto/estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo-a-relatorio-completo.aspx>>. Acesso em: 29 jan. 2017.

CHANTER, N. Streptococci and enterococci as animal pathogens. **Society for Applied Bacteriology symposium series**, v. 26, p. 100S–109S, 1997.

_____. 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. 125–35, 1997.

CHANTER, N. *et al.* *Streptococcus equi* with truncated M-proteins isolated from outwardly healthy horses. **Microbiology**, v. 146, n. 6, p. 1361–1369, 2000.

CHARBONNEAU, A. R. L. *et al.* **Simultaneous identification of every gene in *Streptococcus equi* subspecies *equi* by TraDIS** 10th IEIDC Abstracts / Journal of Equine

Veterinary Science. **Anais...**Elsevier Ltd, 2016

CLABOUGH, D. *Streptococcus equi* infection in the horse: a review of clinical and immunological considerations. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 5, p. 279–283, 1987.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Fourth Edition. CLSI document VET01-A4.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013a.

_____. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013b.

_____. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 3rd ed. CLSI supplement VET01S.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

COMMONS, R. J. *et al.* Streptococcal superantigens: Categorization and clinical associations. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 1, p. 48–62, 2014.

CORDONI, G. *et al.* Rapid diagnosis of strangles (*Streptococcus equi* subspecies *equi*) using PCR. **Research in Veterinary Science**, v. 102, p. 162–166, 2015.

COSTERTON, J. W. *et al.* Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711–745, 1995.

COSTERTON, J. W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, p. 1318–1322, 1999.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, n. 1, p. 86–95, jan. 1978.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847–867, 2000.

DOMENECH, M.; GARCÍA, E.; MOSCOSO, M. Versatility of the capsular genes during biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 2542–2555, 2009.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 167–19, 2002.

FAO. **Agricultural Data – FAOSTAT.** Disponível em:

<<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 29 jan. 2017.

FIEDLER, T. *et al.* Protective mechanisms of respiratory tract streptococci against *Streptococcus pyogenes* biofilm formation and epithelial cell infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1265–1276, 2013.

FISCHETTI, V. A. *et al.* Structure, function, and genetics of streptococcal M protein. **Reviews Of Infectious Diseases**, v. 10 Suppl 2, n. 2, p. S356–S359, 1988.

FLANAGAN, J. *et al.* Characterization of the haemolytic activity of *Streptococcus equi*. **Microbial pathogenesis**, v. 24, n. 4, p. 211–221, 1998.

FLEMMING, H.-C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FRASER, J. D.; PROFT, T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. **Immunological Reviews**, v. 225, n. 1, p. 226–243, 1 out. 2008.

GALÁN, J. E.; TIMONEY, J. F. Cloning of M protein gene of *Streptococcus equi* in *Escherichia coli*: expression of opsonic and purpuragenic determinants. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 12, p. 3181–3187, 1987.

GALÁN, 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.

GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. Fifth ed. Somerset, NJ, EUA: John Wiley & Sons, Inc, 2013.

GRANT, S. T.; EFSTRATIOU, A.; CHANTER, N. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. **Veterinary Record**, v. 133, n. 9, p. 215–216, 28 ago. 1993.

GROSS, M. Antibiotics in crisis. **Current biology : CB**, v. 23, n. 24, p. R1063-5, dez. 2013.

GUTIÉRREZ, M.; ARIAS, P. Strangles : the most prevalent infectious respiratory disease in horses. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 8, n. 1, p. 143–159, 2013.

HARRINGTON, D. J.; SUTCLIFFE, I. C.; CHANTER, N. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p. 501–510, 2002.

HARRIS, S. R. *et al.* Genome specialization and decay of the strangles pathogen, *Streptococcus equi*, is driven by persistent infection. **Genome Research**, v. 25, n. 9, p. 1360–1371, 2015.

HEATHER, Z. *et al.* A novel streptococcal integrative conjugative element involved in iron acquisition. **Molecular Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 1274–1292, 2008.

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.

IBGE. **Censo Agropecuário 2015**. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=censoagro>>. Acesso em: 29 jan. 2017.

IVENS, P. A. S. *et al.* Molecular characterisation of “strangles” outbreaks in the UK: The use of M-protein typing of *Streptococcus equi* ssp. equi. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, n. 3, p. 359–364, 2011.

JORM, L. R. *et al.* Genetic structure of populations of beta-haemolytic Lancefield group C streptococci from horses and their association with disease. **Research in veterinary science**, v. 57, n. 3, p. 292–299, nov. 1994.

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.

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, 2011.

KOTB, M. Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 3, p. 411–426, 1995.

KUWAMOTO, Y.; ANZAI, T.; WADA, R. Microplate Sugar-Fermentation Assay Distinguishes *Streptococcus equi* from Other Streptococci of Lancefield’s Group C. **Journal of Equine Science**, v. 12, n. 2, p. 47–49, 2001.

LAUS, F. *et al.* Clinical and epidemiological investigation of chronic upper respiratory diseases caused by beta-haemolytic Streptococci in horses. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 247–260, 2007.

LIBARDONI, F. *et al.* Diversity of seM in *Streptococcus equi* subsp. equi isolated from strangles outbreaks. **Veterinary microbiology**, v. 162, n. 2–4, p. 663–9, 2013.

_____. Prevalence of *Streptococcus equi* subsp. equi in horses and associated risk factors in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 104, p. 53–57, 2016.

LÓPEZ-ÁLVAREZ, M. R. *et al.* Immunogenicity of phospholipase A 2 toxins and their role in *Streptococcus equi* pathogenicity. **Veterinary Microbiology**, 2017.

LUSHNIAK, B. D. Antibiotic resistance: a public health crisis. **Public health reports (Washington, D.C. : 1974)**, v. 129, n. 4, p. 314–316, 2014.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MAGIORAKOS, A.-P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 268–281, mar. 2012.

MALLICOTE, M. Update on *Streptococcus equi* subsp *equi* infections. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practic**, v. 31, n. 1, p. 27–41, 2015.

MAPA. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio Caval**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>>. Acesso em: 29 jan. 2017.

MCLEAN, R. *et al.* Localised mitogenic activity in horses following infection with *Streptococcus equi*. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 100–104, 2015.

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.

MORAES, C. M. DE *et al.* Adenite equina: sua etiologia, diagnóstico e controle. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1944–1952, 2009.

MOSCOSO, M.; GARCÍA, E.; LÓPEZ, R. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: Role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 22, p. 7785–7795, 2006.

_____. Pneumococcal biofilms. **International Microbiology**, v. 12, p. 77–85, 2009.

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, jan. 1997.

_____. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*. **Equine veterinary journal**, v. 32, n. 6, p. 515–526, 2000.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual review of microbiology**, v. 54, p. 49–79, 2000.

OGGIONI, M. R. *et al.* Switch from planktonic to sessile life: A major event in pneumococcal pathogenesis. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1196–1210, 2006.

PAILLOT, R. *et al.* Contribution of each of four superantigens to *Streptococcus equi*-induced mitogenicity, gamma interferon synthesis, and immunity. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 4, p. 1728–1739, 2010.

PANSANI, A. M. *et al.* Prevalência e resistência a antibióticos de *Streptococcus equi* da cavidade nasal de equinos hígidos no município de Fernandópolis, São Paulo, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 2, p. 144–149, 2016.

PARKINSON, N. J. *et al.* Molecular epidemiology of strangles outbreaks in the UK during 2010. **The Veterinary record**, v. 168, n. 25, p. 666, 2011.

POULIN, A. *et al.* **ELIMINATION OF EQUINE STREPTOCOCCI FROM SOILED HORSE BEDDING** Workshop: Getting to Grips with Strangles and other Streptococcal Diseases. **Anais...**Gallatin Gateway, Montana: Havemeyer Foundation, Inc., 2017

PROFT, T. *et al.* Two Novel Superantigens Found in Both Group A and Group C *Streptococcus*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1361–1369, 2003.

PROFT, T.; FRASER, J. D. Bacterial superantigens. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 133, n. 3, p. 299–306, 1 set. 2003.

PROFT, T.; FRASER, J. D. Streptococcal superantigens. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 93, n. 1, p. 1–23, 2007.

QUINN, P. *et al.* **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2nd. ed. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2011.

RIBEIRO, M. G.; VARGAS, A. C. Garrotilho. *In*: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. (Eds.). **Doenças infecciosas em animais de produção e companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 327–339.

ROBINSON, C. *et al.* **Genome decay of *S. equi* and its practical implications: the requirement for multiple diagnostic targets** 10th IEIDC Abstracts / Journal of Equine Veterinary Science. **Anais...**Elsevier Ltd, 2016

SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. **Genome Biology**, v. 4, n. 6, p. 219, 2003.

SCHÜTZ, J. W. The *Streptococcus* of Strangles. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 1, n. 3, p. 191–208, 1888.

SHEORAN, A. .; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J. . 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.

SMEESTERS, P. R.; MCMILLAN, D. J.; SRIPRAKASH, K. S. The streptococcal M protein: A highly versatile molecule. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 275–282, 2010.

SPAULDING, A. R. *et al.* Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 422–447, 2013.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135–138, 2001.

STOODLEY, P. *et al.* Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187–209, 2002.

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, n. 1, p. 123–134, 2005.

TIMONEY, J. F. Strangles. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 9, n. 2, p. 365–374, ago. 1993.

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

TIMONEY, J. F. *et al.* The Antiphagocytic Activity of SeM of *Streptococcus equi* Requires Capsule. **Journal of Equine Science**, v. 25, n. 2, p. 53–56, 2014.

TIMONEY, J. F.; KUMAR, P. Early pathogenesis of equine *Streptococcus equi* infection (strangles). **Equine veterinary journal**, v. 40, n. 7, p. 637–642, 2008.

TIMONEY, J. F.; KUMAR, P.; MUTHUPALANI, S. Interaction of *Streptococcus equi* with the equine nasopharynx. **International Congress Series**, v. 1289, p. 267–270, 2006.

TIMONEY, J. F.; MUKHTAR, M. M. The protective M proteins of the equine group C streptococci. **Veterinary Microbiology**, v. 37, n. 3–4, p. 389–395, 1993.

TODD, A. G. Strangles. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 23, n. July, p. 212–229, 1910.

TONPITAK, W.; SORNKLIEN, C.; WUTTHIWITHAYAPHONG, S. Characterization of a *Streptococcus equi* ssp. *equi* Isolate From a Strangles Outbreak in Thailand. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 38, p. 30–32, 2016.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1 : Causes and Threats. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.

VERHEYEN, K. *et al.* Elimination of guttural pouch infection and inflammation in asymptomatic carriers of *Streptococcus equi*. **Equine veterinary journal**, v. 32, n. 6, p. 527–532, nov. 2000.

WALLER, A. S. Strangles: Taking steps towards eradication. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 1–2, p. 50–60, 2013.

_____. New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 30, n. 3, p. 591–607, 2014.

_____. Strangles : a pathogenic legacy of the war horse. **Veterinary Record**, v. 178, p. 91–92, 2016.

WALLER, A. S.; PAILLOT, R.; TIMONEY, J. F. *Streptococcus equi*: A pathogen restricted to one host. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 1231–1240, 2011.

WALLER, A. S.; ROBINSON, C. *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus equi* evolution: the role of CRISPRs. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 6, p. 1437–43, 2013.

WEBB, K. *et al.* Development of an unambiguous and discriminatory multilocus sequence typing scheme for the *Streptococcus zooepidemicus* group. **Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 3016–3024, 2008.

_____. Detection of *Streptococcus equi* subspecies equi using a triplex qPCR assay. **Veterinary Journal**, v. 195, n. 3, p. 300–304, 2013.

WEESE, J. S. *et al.* Guidelines for antimicrobial use in Horses. *In*: GUARDABASS, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. (Eds.). . **Guide to Antimicrobial Use in Animals**. [s.l.] Blackwell Publishing Ltd, 2008. p. 161–182.

WHITE, J. *et al.* The V β -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: Stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. **Cell**, v. 56, n. 1, p. 27–35, 1989.

WHO. **Antimicrobial resistance**. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

WOOD, J. L. *et al.* Persistent infection with *Streptococcus equi* and the epidemiology of strangles. **The Veterinary record**, v. 133, n. 15, p. 375, out. 1993.

WOOLCOCK, J. B. The capsule of *Streptococcus equi*. **Journal of General Microbiology**, v. 85, p. 372–375, 1974.

_____. Immunity to *Streptococcus equi*. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, n. 12, p. 554–9, 1975a.

____. Studies in atypical *Streptococcus equi*. **Research in veterinary science**, v. 19, n. 2, p. 115–119, set. 1975b.

WOOLDRIDGE, K. G.; WILLIAMS, P. H. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 325–348, 1993.

ZHANG, Y. *et al.* Genetic and biochemical characterization of genes involved in hyaluronic acid synthesis in *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 8, p. 3611–3620, 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE A – RESULTADO DOS TESTES FENOTÍPICOS

	Cepa	Cor	Mucóide	Ribose	Lactose	Trealose	Sorbitol	Cápsula	
	99/94	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	291/94	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	204/02	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	78/03	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	126/03	Branco acincentada	Não	+	+	-	+	Ausente	
	366/03	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	566/05	Mel	Sim	+	-	+	-	Pouca	
	628/06	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	702/06	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	732/06	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	171/07	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	246/07	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	37/08-1	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	37/08-V	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	47/08-2	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
Isolados de animais doentes (n=42)	47/08-4	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	53/08-2	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	53/08-3	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	128/08-N	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	152/08-1	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	152/08-2	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	152/08-3	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	162/08	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	272/08-J	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	62/09	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	90/09-1	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	90/09-2	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	90/09-3	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	91/09-H	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	91/09-Q	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	94/09-P	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	
	97/09-C	Branco acincentada	Sim/pouco	+	+	-	+	Pouca	
		113/09	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita
		261/09- 1	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita
		261/09- 4	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita
		280/09	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita
		68/10-C	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita
		68/10-F	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita
		77/10	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita
		105/10-D	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita
		105/10-AA	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita
	178/10	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita	

	Cepa	Cor	Mucóide	Ribose	Lactose	Trealose	Sorbitol	Cápsula
Isolados de animais portadores (n=18)	39/13 225-1	Branco acinentada	Pouco	+	+	-	+	Pouca
	40/13 182-1	Branco acinentada	Pouco	+	+	-	+	Pouca
	40/13 182-2	Branco acinentada	Não	+	+	+	-	Ausente
	42/13 53-2	Branco acinentada	Não	+	-	+	-	Ausente
	44/13 3-10	Branco acinentada	Não	+	-	+	-	Ausente
	45/13 77-1	Branco acinentada	Pouco	+	+	-	+	Pouca
	46/13 122-2	Branco acinentada	Não	+	+	+	+	Ausente
	50/13 233-8	Branco acinentada	Pouco	+	+	-	+	Pouca
	50/13 241-1	Branco acinentada	Não	+	+	+	+	Ausente
	51/13 93-1A	Branco acinentada	Pouco	+	+	-	+	Pouca
	51/13 93-4A	Branco acinentada	Pouco	+	+	-	+	Pouca
	53/13 258-10	Branco acinentada	Não	+	-	+	-	Ausente
	59/13 319-1A	Branco acinentada	Pouco	+	+	-	+	Pouca
	59/13 319-1B	Branco acinentada	Não	+	-	+	-	Ausente
	60/13 199-1	Branco acinentada	Não	+	-	+	-	Ausente
	60/13 218-1	Branco acinentada	Não	+	-	+	-	Ausente
	60/13 222-1	Branco acinentada	Não	+	-	+	-	Ausente
	73/13 295-7	Branco acinentada	Não	+	-	+	-	Ausente
	<i>S. equi</i> ATCC® 39506	Mel	Sim	-	-	-	-	Muita

+: capacidade de fermentar o açúcar; -: incapacidade de fermentar o açúcar.

APÊNDICE B – DIÂMETRO DOS HALOS (mm) DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

	Cepa	SUT	PEN	AMP	CFL	CTF	FLO	ERI	RIF	ENO	TET	EST	GEN
	99/94	20	24	24	24	25	24	24	24	15	25	10	10
	291/94	20	24	24	24	26	24	23	24	16	25	11	10
	204/02	19	24	24	27	24	23	23	24	16	24	10	10
	78/03	20	24	26	28	24	23	24	24	17	27	10	10
	126/03	10	24	22	23	24	22	20	22	14	20	9	9
	366/03	16	25	27	27	28	23	24	28	16	25	0	15
	566/05	25	29	28	28	30	23	23	24	17	23	10	13
	628/06	16	20	27	27	25	22	22	20	15	27	0	13
	702/06	19	24	24	25	24	23	23	25	15	26	10	10
	732/06	21	24	25	27	26	23	23	25	16	25	9	10
	171/07	19	24	26	26	25	23	23	24	16	24	10	10
	246/07	20	24	26	27	27	24	23	25	17	27	0	10
	37/08-1	18	25	24	25	26	23	22	25	15	25	10	10
	37/08-V	19	24	26	26	25	23	23	25	16	25	12	10
	47/08-2	20	26	25	28	24	25	23	27	14	28	11	11
	47/08-4	20	25	25	27	25	25	26	28	16	30	11	11
	53/08-2	19	25	25	26	26	24	21	25	15	28	10	10
	53/08-3	14	24	22	25	24	25	22	22	13	27	10	10
	128/08-N	16	20	23	24	24	22	22	22	13	27	0	10
	152/08-1	20	30	35	35	35	24	24	30	15	28	10	12
	152/08-2	20	36	38	38	36	28	26	32	18	34	12	14
	152/03-3	17	30	32	32	35	23	24	28	14	28	12	12
	162/08	22	27	30	30	30	27	25	27	18	28	11	13
	272/08-J	17	25	25	25	28	25	24	27	17	28	10	12
	62/09	20	26	27	28	30	25	23	26	16	28	11	11
	90/09-1	20	33	34	35	34	25	25	28	16	28	12	13
	90/09-2	20	34	34	36	37	28	26	30	16	30	13	15
	90/09-3	21	32	32	36	36	28	27	26	16	28	12	12
	91/09-H	17	30	32	33	34	24	26	28	15	28	11	11
	91/09-Q	17	30	34	35	35	24	24	30	16	28	12	12
	94/09-P	17	25	28	28	28	24	25	30	18	26	11	12
	97/09-C	13	20	18	21	22	18	18	21	10	17	0	9
	113/09	15	30	30	30	30	24	23	26	14	28	12	15
	261/09-1	20	32	36	34	36	28	27	30	16	30	13	14
	261/09-4	17	30	34	34	34	24	25	30	15	28	10	12
	280/09	20	24	25	25	26	23	23	25	15	26	10	10
	68/10-C	20	24	25	27	28	23	23	25	16	28	11	11
	68/10-F	18	24	24	26	27	22	22	24	15	27	12	11
	77/10	25	30	31	34	38	29	28	32	20	33	13	13
	105/10-AA	19	24	24	24	23	23	22	23	15	23	10	10
	150/10-D	19	24	24	27	25	23	23	24	15	27	9	9
	178/10	22	26	28	30	34	26	26	27	16	28	10	12

Isolados de animais doentes (n=42)

	Cepa	SUT	PEN	AMP	CFL	CTF	FLO	ERI	RIF	ENO	TET	EST	GEN
Isolados de animais portadores (n=18)	39/13 225-1	16	20	21	21	22	20	19	20	15	18	8	9
	40/13 182-1	16	21	21	21	21	20	18	20	14	19	8	9
	40/13 182-2	18	27	30	32	30	20	21	25	18	20	11	16
	42/13 53-2	18	26	23	29	28	22	18	22	16	19	15	13
	44/13 3-10	16	24	25	25	26	17	16	19	15	18	9	12
	45/13 77-1	11	18	20	20	23	20	18	20	17	18	8	8
	46/13 122-2	14	22	22	18	24	18	16	18	16	16	8	10
	50/13 233-8	15	27	25	30	27	25	23	22	18	25	9	9
	50/13 241-1	11	23	21	24	25	18	15	18	15	16	11	11
	51/13 93-1A	11	17	18	19	20	19	18	18	13	16	8	9
	51/13 93-4A	0	23	22	23	24	22	21	24	14	18	8	10
	53/13 258-10	18	24	25	21	23	19	20	19	14	18	8	11
	59/13 319-1A	18	24	24	24	26	21	20	23	14	20	9	10
	59/13 319-1B	20	22	25	23	25	20	20	21	14	19	9	10
	60/13 199-1	23	34	30	32	34	26	26	26	18	22	12	15
	60/13 218-1	14	23	24	25	23	18	19	22	18	19	9	13
	60/13 222-1	18	24	24	26	26	20	18	20	18	16	12	10
	73/13 295-7	20	27	27	28	27	22	21	23	14	21	9	10
<i>S. equi</i> ATCC® 39506	18	24	25	26	24	22	22	26	15	23	9	10	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923)	25	28	29	33	28	24	26	28	27	28	16	25	
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922)	27	0	15	17	27	21	10	7	31	24	17	22	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 27853)	0	0	0	0	13	0	0	0	19	0	13	19	

SUT: sulfazotrin; PEN: penicilina G; AMP: ampicilina; CFL: cefalotina; CTF: ceftiofur; FLO: florfenicol; ERI: eritromicina; RIF: rifampicina; ENO: enrofloxacina; TET: tetraciclina; EST: estreptomicina; GEN: gentamicina.

APÊNDICE C – RESULTADOS DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTI-MICROBIANOS E VALORES DE IRMA E IRCA

Cepa / Atb	IvF	Beta-Lact.				Fen	Mac	Ans	Qui	Tet	Amg		IRMA	Cl. R	IRCA
	SUT	PEN	AMP	CHL	CTF	FLO	ERI	RIF	ENO	TET	EST	GEN			
99/94	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
291/94	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
204/02	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
78/03	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
126/03	R	S	R	S	S	S	I	S	R	I	R	R	0,417	4	0,500
366/03	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	0,167	2	0,250
566/05	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	I	0,167	2	0,250
628/06	I	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	I	0,250	3	0,375
702/06	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
732/06	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
171/07	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
246/07	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
37/08-1	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
37/08-V	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R	0,167	2	0,250
47/08-2	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
47/08-4	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
53/08-2	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
53/08-3	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,417	4	0,500
128/08-N	I	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,417	3	0,375
152/08-1	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
152/08-2	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	I	0,083	1	0,125
152/03-3	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R	0,167	2	0,250
162/08	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	I	0,167	2	0,250
272/08-J	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
62/09	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
90/09-1	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	I	0,083	1	0,125
90/09-2	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S	0,083	1	0,125
90/09-3	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R	0,167	2	0,250
91/09-H	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
91/09-Q	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R	0,167	1	0,125
94/09-P	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
97/09-C	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	0,750	7	0,875
113/09	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S	0,167	2	0,250
261/09-1	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	I	0,083	1	0,125
261/09-4	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
280/09	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
68/10-C	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
68/10-F	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R	0,167	2	0,250
77/10	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	I	0,000	0	0,000
105/10-AA	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
150/10-D	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
178/10	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250
Média doentes													0,234	2,1	0,262

Isolados de animais doentes (n=42)

Cepa / Atb	IvF	Beta-Lact.				Fen	Mac	Ans	Qui	Tet	Amg		IRMA	Cl. R	IRCA
	SUT	PEN	AMP	CFL	CTF	FLO	ERI	RIF	ENO	TET	EST	GEN			
39/13 225-1	I	R	R	S	S	I	I	S	R	R	R	R	0,500	4	0,500
40/13 182-1	I	R	R	S	R	I	I	S	R	I	R	R	0,500	3	0,375
40/13 182-2	I	S	S	S	S	I	S	S	R	I	R	S	0,167	2	0,250
42/13 53-2	I	S	R	S	S	S	I	S	R	I	S	I	0,167	2	0,250
44/13 3-10	I	S	S	S	S	R	I	I	R	R	R	R	0,417	4	0,500
45/13 77-1	R	R	R	S	S	I	I	S	R	R	R	R	0,583	5	0,625
46/13 122-2	R	R	R	S	S	R	I	I	R	R	R	R	0,667	6	0,750
50/13 233-8	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,333	3	0,375
50/13 241-1	R	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	R	0,750	7	0,875
51/13 93-1A	R	R	R	S	R	I	I	I	R	R	R	R	0,667	5	0,625
51/13 93-4A	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	0,583	5	0,625
53/13 258-10	I	S	S	S	S	I	I	I	R	R	R	R	0,333	3	0,375
59/13 319-1A	I	S	S	S	S	I	I	S	R	I	R	R	0,250	2	0,250
59/13 319-1B	S	R	S	S	S	I	I	S	R	I	R	R	0,333	3	0,375
60/13 199-1	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	I	S	0,083	1	0,125
60/13 218-1	R	R	S	S	S	R	I	S	R	I	R	I	0,417	5	0,625
60/13 222-1	I	S	S	S	S	I	I	S	R	R	I	R	0,250	3	0,375
73/13 295-7	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R	R	0,250	2	0,250
Média portadores													0,403	3,6	0,451
<i>S. equi</i> ATCC® 39506	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	0,250	2	0,250

Atb: antimicrobiano; IvF: inibidores da via do folato; Beta-Lact.: beta-lactâmicos; Fen: fenicolis; Mac: macrolídeos; Ans: ansamicinas; Qui: quinolonas; Tet: tetraciclina; Amg: aminoglicosídeos; SUT: sulfazotrin; PEN: penicilina G; AMP: ampicilina; CFL: cefalotina; CTF: ceftiofur; FLO: florfenicol; ERI: eritromicina; RIF: rifampicina; ENO: enrofloxacina; TET: tetraciclina; EST: estreptomicina; GEN: gentamicina. **n**: isolado multirresistente.

APÊNDICE D – RESULTADOS DO TESTE DE CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

	Cepa	Odx/ODc	Classificação		Cepa	Odx/ODc	Classificação
Isolados de animais doentes (n=42)	99/94	3,2	Moderado	Isolados de animais portadores (n=18)	39/13 225-1	8,5	Forte
	291/94	7,6	Forte		40/13 182-1	4,4	Forte
	204/02	5,2	Forte		40/13 182-2	2,2	Moderado
	78/03	2,8	Moderado		42/13 53-2	2,5	Moderado
	126/03	1,7	Fraco		44/13 3-10	2,1	Moderado
	366/03	1,7	Fraco		45/13 77-1	6,8	Forte
	566/05	3,2	Moderado		46/13 122-2	3,1	Moderado
	628/06	1,4	Fraco		50/13 233-8	1,0	Não produtor
	702/06	5,0	Forte		50/13 241-1	1,5	Fraco
	732/06	3,0	Moderado		51/13 93-1A	4,9	Forte
	171/07	1,7	Fraco		51/13 93-4A	3,5	Moderado
	246/07	1,7	Fraco		53/13 258-10	3,1	Moderado
	37/08-1	2,6	Moderado		59/13 319-1A	8,6	Forte
	37/08-V	3,8	Moderado		59/13 319-1B	3,5	Moderado
	47/08-2	2,4	Moderado		60/13 199-1	1,5	Fraco
	47/08-4	3,4	Moderado		60/13 218-1	2,5	Moderado
	53/08-2	2,6	Moderado		60/13 222-1	1,7	Fraco
	53/08-3	1,6	Fraco		73/13 295-7	1,1	Fraco
	128/08-N	6,0	Forte				
	152/08-1	0,8	Não produtor		<i>S. equi</i>		
	152/08-2	0,8	Não produtor		ATCC [®] 39506	16,0	Forte
	152/08-3	0,9	Não produtor				
	162/08	6,7	Forte				
	272/08-J	5,0	Forte				
	62/09	4,4	Forte				
	90/09-1	1,0	Não produtor				
	90/09-2	0,9	Não produtor				
	90/09-3	1,0	Não produtor				
	91/09-H	1,0	Não produtor				
	91/09-Q	1,0	Não produtor				
	94/09-P	5,0	Forte				
	97/09-C	23,0	Forte				
	113/09	1,3	Fraco				
	261/09- 1	1,0	Não produtor				
	261/09- 4	1,1	Fraco				
	280/09	4,5	Forte				
	68/10-C	1,8	Fraco				
	68/10-F	1,7	Fraco				
	77/10	1,7	Fraco				
	105/10-D	3,3	Moderado				
	105/10-AA	1,9	Fraco				
	178/10	2,2	Moderado				

APÊNDICE E – RESULTADOS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA OS DIFERENTES GENES

	Cepa	<i>hasA/B</i>	<i>hasB/C</i>	<i>eqbE</i>	<i>eqbG</i>	<i>seeH</i>	<i>seeI</i>
	99/94	+	+	+	+	+	+
	291/94	+	+	+	+	+	+
	204/02	+	+	+	+	+	+
	78/03	+	+	+	+	+	+
	126/03	+	+	-	+	+*	+
	366/03	+	+	+	+	+	+
	566/05	-	+*	-	+	+*	+
	628/06	+	+	+	+	+	+
	702/06	+	+	+	+	+	+
	732/06	+	+	+	+	+	+
	171/07	+	+	+	+	+	+
	246/07	+	+	+	+	+	+
	37/08-1	+	+	+	+	+	+
	37/08-V	+	+	+	+	+	+
	47/08-2	+	+	+	+	+	+
	47/08-4	+	+	+	+	+	+
	53/08-2	+	+	+	+	+	+
	53/08-3	+	+	+	+	+	+
	128/08-N	+	+	+	+	+	+
	152/08-1	+	+	+	+	+	+
	152/08-2	+	+	+	+	+	+
	152/08-3	+	+	+	+	+	+
	162/08	+	+	+	+	+	+
	272/08-J	+	+	+	+	+	+
	62/09	+	+	+	+	+	+
	90/09-1	+	+	+	+	+	+
	90/09-2	+	+	+	+	+	+
	90/09-3	+	+	+	+	+	+
	91/09-H	+	+	+	+	+	+
	91/09-Q	+	+	+	+	+	+
	94/09-P	+	+	+	+	+	+
	97/09-C	+	+	+	+	+*	+
	113/09	+	+	+	+	+	+
	261/09- 1	+	+	+	+	+	+
	261/09- 4	+	+	+	+	+	+
	280/09	+	+	+	+	+	+
	68/10-C	+	+	+	+	+	+
	68/10-F	+	+	+	+	+	+
	77/10	+	+	+	+	+	+
	105/10-D	+	+	+	+	+	+
	105/10-AA	+	+	+	+	+	+
	178/10	+	+	+	+	+	+

Isolados de animais doentes (n=42)

	Cepa	hasA/B	hasB/C	eqbE	eqbG	seeH	seeI
Isolados de animais portadores (n=18)	39/13 225-1	+	+	-	+	-	+
	40/13 182-1	+	+	-	+	-	+
	40/13 182-2	-	+	-	+	+	+
	42/13 53-2	-	+	-	+	+	+
	44/13 3-10	-	+	-	+	+	+
	45/13 77-1	+	+	-	+	-	+
	46/13 122-2	+	+	-	+	+	+
	50/13 233-8	-	+	-	+	+	+
	50/13 241-1	-	+	-	+	+	+
	51/13 93-1A	+	+	-	+	+	+
	51/13 93-4A	+	+	-	+	+	+
	53/13 258-10	-	+	-	+	+	+
	59/13 319-1A	-	+	-	+	+	+
	59/13 319-1B	-	+	-	+	+	+
	60/13 199-1	-	+	-	+	+	+
	60/13 218-1	-	+	-	+	+	+
	60/13 222-1	-	+	-	+	+	+
	73/13 295-7	-	+	-	+	+	+
	<i>S. equi</i> ATCC® 39506	+	+	+	+	+	+

+: presença do gene;

-: ausência do gene;

+*: banda/amplicon com tamanho diferente do esperado

ANEXOS

ANEXO A - PADRÕES DE INTERPRETAÇÃO DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Classe/ Antimicrobiano	Halo (mm)			Cepas de Referência		
	Sensível	Intermediário	Resistente	<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 27853)
Inibidores da via do folato (Folate Pathway Inhibitors)						
Sulfazotrim (25µg)	≥19	16-18	≤15	23-29	24-32	-
Beta-lactâmicos						
Penicilina G (10 UI)	≥24	-	-	-	26-37	-
Ampicilina (10µg)	≥24	-	-	15-22	27-35	-
Cefalotina (30µg)	≥18	15-17	≤14	21-27	29-35	-
Ceftiofur (30µg)	≥22	-	-	26-31	27-31	14-18
Fenicóis						
Florfenicol (30µg)	≥22	19-21	≤18	22-28	22-29	-
Macrolídeos						
Eritromicina (15µg)	≥21	16-20	≤15	-	22-30	-
Ansamícinas						
Rifampicina (5µg)	≥20	17-19	≤16	8-10	26-34	-
Quinolonas						
Enrofloxacina (5µg)	≥23	19-22	≤18	32-40	27-31	15-19
Tetraciclínas						
Tetraciclina (30µg)	≥23	19-22	≤18	18-25	24-30	-
Aminoglicosídeos						
Estreptomicina (10µg)*	≥15	12-14	≤11	12-20	14-22	-
Gentamicina (10µg)	≥15	13-14	≤12	19-26	19-27	17-23

Fonte: CLSI (2013), CLSI (2015); *CLSI (2013b)