



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E ESTIMATIVA DA
REATIVIDADE CRUZADA DE CEPAS DE *Streptococcus equi*
ISOLADAS DE EQÜINOS DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO
SUL**

CARINA MARTINS DE MORAES

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Gil Turnes como parte das exigências do programa de Pós Graduação em Veterinária, área de concentração em Veterinária Preventiva, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências (M.Sc.).

PELOTAS
RIO GRANDE DO SUL – BRASIL
FEVEREIRO DE 2005

CARINA MARTINS DE MORAES

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E ESTIMATIVA DA
REATIVIDADE CRUZADA DE CEPAS DE *Streptococcus equi*
ISOLADAS DE EQÜINOS DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO
SUL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Gil Turnes, como parte das exigências do programa de Pós Graduação em Veterinária, área de concentração em Veterinária Preventiva, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências (M.S).

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Carlos Gil Turnes (DMVP/ FV / UFPel)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira (DCV / FV / UFPel)

Prof. Dr. Fábio Leivas Leite (DMP / IB / UFPel)

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Gil Turnes (orientador)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira (coorientador)

Prof. Dr. Agueda Palmira Castagna de Vargas (DVP/ FV / UFSM)

Prof. Dr. Flávia da Cruz MCBride (DMVP/ FV / UFPel)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela oportunidade de vencer mais esta etapa importante de minha vida profissional.

Aos meus pais e irmã, pelo apoio incondicional durante o decorrer deste trabalho, me incentivando sempre e compreendendo minhas ausências.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Gil Turnes, pelos ensinamentos técnicos e pessoais durante todo o período e por disponibilizar todo o necessário para que este trabalho fosse concluído.

Ao coorientador Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira pelo apoio e amizade que teve início ainda durante a graduação e pelo exemplo de profissional a seguir.

Ao coorientador Dr. Fábio Leivas Leite pelo acompanhamento durante diversas etapas do projeto, sempre disposto a acrescentar melhorias e resolver problemas.

A professora Dr. Flávia MCBride pelo companheirismo e colaboração de grande valia nas questões envolvendo este e outros trabalhos, rotina do laboratório e orientações profissionais.

A professora Dr. Agueda Vargas, por me acolher com tanto respeito e carinho no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da UFSM e pela grande colaboração na execução deste trabalho. Estendo meus agradecimentos aos estagiários e funcionários deste laboratório, que hoje são meus grandes amigos (especialmente a Daniele, Niura, Mariana) por terem feito meus dias em Santa Maria muito felizes.

Aos companheiros do Laboratório de bacteriologia: João Rodrigo, Michele, Marcela, Luciano e em especial a Nice e Otávio, por toda a ajuda indispensável durante a execução deste experimento.

Aos colegas do Cenbiot, por criarem um ambiente de trabalho agradável e pelos bons momentos compartilhados.

A todos os amigos do Laboratório de Inspeção de Leite e Derivados, por estarem sempre ao meu lado e ao professor e amigo Cláudio Dias Timm, por

todos ensinamentos repassados e oportunidades concedidas.

Aos eternos amigos Fabi e Milton, por me darem suporte e ombro amigo desde a graduação e dividirem comigo todos os momentos, angústias, alegrias durante todo este período e as amigas sempre presentes, Dani e Talita por me incentivarem sempre.

Aos colegas de pós- graduação Bruna e Friedrich, pelos bons momentos e experiências compartilhadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
SUMÁRIO.....	ix
SUMMARY.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Definição da doença.....	3
2.2 Etiologia e características do agente.....	8
2.3 Imunidade.....	11
2.4 Vacinas.....	12
2.5 Importância e principais linhas de pesquisa.....	15
3 HIPÓTESE.....	15
4 OBJETIVOS.....	16
5. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E ESTIMATIVA DA REATIVIDADE CRUZADA DE CEPAS DE <i>Streptococcus equi</i> ISOLADAS DE EQUINOS DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL.....	17
5.1 Resumo.....	17
5.2 Introdução.....	18

5.3 Materiais E Métodos.....	19
5.3.1 Exame de Animais com Suspeita Clínica de Adenite Eqüina e coleta de material.....	19
5.3.2 Caracterização de cepas de <i>Streptococcus equi</i>	19
5.3.3 Produção de vacinas de <i>Streptococcus equi</i>	20
5.3.4 Imunização de camundongos.....	20
5.3.5 Titulação de anticorpos.....	21
5.3.5.1 Preparação do antígeno.....	21
5.3.5.2 Teste de ELISA.....	22
5.3.7.3 Índice de reatividade cruzada (IRC).....	22
5.4 RESULTADOS.....	23
5.4.1 Animais com suspeita clínica de Adenite eqüina.....	23
5.4.2 Isolamento bacteriano.....	23
5.4.3 Resposta às vacinas.....	24
5.4.4 IRC.....	26
5.5 DISCUSSÃO.....	26
5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
6. CONCLUSÕES.....	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Vacinas testadas.....	21
TABELA 2 Identificação dos animais com diagnóstico clínico de Adenite Eqüina	23
TABELA 3 Resultados dos testes bioquímicos de utilização de açucares de 13 cepas de <i>Streptococcus equi</i>	24
TABELA 4 IRC das cepas de campo de <i>S. equi</i> , e relação com as vacinas comerciais.....	26

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Gráfico mostrando as variações individuais na resposta imune dos animais dos diferentes grupos inoculados com vacinas de *S. equi* produzidas a partir de cepas de campo no dia 56.....24

FIGURA 2 Soroconversão dos diferentes grupos inoculados com vacinas de *S. equi*.....25

SUMÁRIO

MORAES, CARINA MARTINS, Universidade Federal de Pelotas, fevereiro de 2005. **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E ESTIMATIVA DA REATIVIDADE CRUZADA DE CEPAS DE *Streptococcus equi* ISOLADAS DE EQÜINOS DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL.** Orientador: Carlos Gil Turnes. Co-orientadores: Carlos Eduardo Wayne Nogueira e Fábio Leivas Leite.

Streptococcus equi é o agente causador da Adenite eqüina, uma das mais disseminadas e comuns enfermidades que acomete eqüinos. Essa doença altamente contagiosa apresenta como principais sinais clínicos febre e linfadenite com formação de abscessos na região de garganta. Vacinas contra a enfermidade tem sido usadas, mas não conferem proteção eficiente contra o agente. No presente trabalho foram caracterizadas 13 cepas de *Streptococcus equi* isoladas de materiais provenientes de 35 eqüinos com manifestações clínicas de Adenite Equina na região sul do Rio Grande do Sul. Prepararam-se vacinas monovalentes com as cepas de *S. equi* isoladas. Camundongos Balb/c isogênicos foram vacinados com as vacinas produzidas e com duas vacinas comerciais para garrotilho nos dias 0 e 14. Coletaram-se amostras de sangue nos dias 0, 14, 28 e 56. Titularam-se anticorpos pelo teste de ELISA, e estimaram-se os índices de reatividade cruzada. De 35 amostras coletadas, 13 foram de *S. equi*, das quais cinco produziram ácido a partir de algum açúcar, comportando-se como cepas atípicas. Destas, quatro só fermentaram açúcares em meio enriquecido com soro eqüino inativado. Os IRC demonstraram que as cepas de *S. equi* estudadas pertencem a um mesmo sorogrupo, entanto os IRC das vacinas comerciais variaram de 23 a 46 com as cepas de campo, demonstrando baixa reatividade.

Palavras-chave: *Streptococcus equi*, vacina, IRC.

SUMMARY

MORAES, CARINA MARTINS, Universidade Federal de Pelotas, February 2005. **CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF CROSS REACTIVITY OF STRAINS OF *Streptococcus equi* RECOVERED FROM HORSES IN SOUTHERN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL.** Advisor : Carlos Gil Turnes. Co-advisors: Carlos Eduardo Wayne Nogueira e Fábio leivas Leite.

Streptococcus equi is the causative agent of strangles, one of the most widespread and costly horse diseases. The disease is highly contagious, and common symptoms are fever and lymphadenitis with abscesses in the neck region. Vaccines against strangles have been used but do not confer efficient protection against infection with *Streptococcus equi*. In this paper, Strains of *Streptococcus equi* recovered from thirty-five horses with clinical Strangles in southern Rio Grande do Sul, Brazil, were characterized. Monovalent inactivated vaccines were produced with the strains. Groups of isogenic Balb/c mice were vaccinated on days 0 and 14 with the vaccines and with two commercial vaccines for strangles. Blood samples were collected on days 0, 14, 28, 56 and 70. Antibodies were titrated through ELISA using homologous and heterologous antigens, and Cross Reactivity Indices estimated. Thirteen strains of *S. equi* were recovered from the thirty-five samples studied. Five of them produced acid from some of the carbohydrates used, behaving as atypical strains. Four of these only metabolised the carbohydrate when equine serum was added. Cross Reactivity Indices showed that the strains studied belonged to the same serogroup. Cross Reactivity Indices among the strains recovered and the vaccines, on the contrary, varied from 23 to 46, showing very low reactivity among them.

Key-words: *Streptococcus equi*, vaccine, CRI.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o terceiro maior rebanho eqüino do mundo, com um plantel de 5,9 milhões de animais, segundo números da Food and Agriculture Organization (FAO) de 2002, ficando atrás apenas da China (8,2 milhões) e do México (6,2 milhões). No país, a eqüinocultura é responsável por 1,2 milhão de empregos, ocupando diretamente mais de 500 mil pessoas. O setor forma hoje, uma importante cadeia do agronegócio, com forte interação dos setores ligados ao lazer, cultura e turismo, sendo uma das cadeias produtivas que oferece mais oportunidades de trabalho, conquistando posição de destaque na economia nacional, embora o potencial econômico da atividade seja pouco conhecido. A capacidade dos criadores em produzirem animais de qualidade, com visão mercadológica, incrementa a perspectiva de crescimento desse setor da pecuária. Um exemplo é a exportação brasileira de eqüinos puro-sangue árabe, que ocupa 2º lugar no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos (CNA, 2003).

Em vista desta realidade, a prevenção e diagnóstico das doenças infecciosas nesses rebanhos têm crucial importância. Os distúrbios do aparelho respiratório ocupam o segundo lugar nas patologias dos eqüinos, atrás dos distúrbios do sistema músculo esquelético, na limitação do desenvolvimento atlético. Ocorrem grandes perdas econômicas quando os programas de treinamento de eqüinos são interrompidos em razão de enfermidades

respiratórias. Portanto, a detecção precoce de problemas respiratórios é essencial para o rápido retorno dos animais a sua atividade, sendo, porém, ainda mais importante na prevenção de complicações secundárias que podem encerrar prematuramente a carreira do animal (AINSWORTH, 2000).

Dentre as afecções do trato respiratório superior de cavalos, a Adenite Eqüina, uma doença bacteriana de alta morbidade, é uma das mais comumente enfrentadas pelos animais, principalmente nas regiões mais frias do país, como o Rio Grande do Sul. Dados epidemiológicos da enfermidade, métodos padronizados eficazes para diagnóstico e produtos eficientes para o seu controle não estão disponíveis no estado. Maiores estudos sobre esta enfermidade são necessários para que perdas importantes no setor sejam evitadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Definição da doença

A Adenite Eqüina, também conhecida como “garrotilho”, é uma enfermidade bacteriana causada pelo *Streptococcus equi*, bactéria β hemolítica pertencente ao grupo C de Lancefield, que atinge o trato respiratório superior de eqüinos acometendo animais de todas as idades, principalmente os jovens (SWEENEY, 1993; TIMONEY *et al*, 1997a). O termo garrotilho foi estabelecido porque cavalos afetados e não tratados pareciam estar sendo estrangulados (garroteados), pois os linfonodos tornavam-se aumentados, obstruindo a faringe (SWEENEY, 1993).

Esta enfermidade foi uma das primeiras moléstias eqüinas descritas em publicações em veterinária. Em 1664, Solleysell descreveu o garrotilho como uma afecção que os cavalos jovens tinham que padecer para se proteger. Convencido da natureza contagiosa da doença, este autor recomendou o isolamento dos animais afetados, tendo enfatizado que a fonte mais comum de infecção para cavalos consistia nos baldes de água que eram empregados pelos animais infectados (SWEENEY, 1993).

A enfermidade acomete principalmente eqüídeos, embora o agente já

tenha sido também isolado de camelos (YIGEZU, 1997). Meningite causada por *S. equi* subsp. *zooepidemicus* resultante de contato com cavalo é relatada por DOWNAR *et al.* (2001), e vários autores identificaram fatores de virulência de *S. equi* em humanos (BISNO *et al.*, 1996; NICHOLSON *et al.*, 2000). Existem diferentes cepas do agente quanto à expressão de fatores de virulência, o que influi diretamente na resposta imune e na severidade dos sinais clínicos.

A Adenite Eqüina se caracteriza por aumento de volume de linfonodos da região de garganta, descarga nasal purulenta, febre e tosse. Eqüinos de todas as idades são suscetíveis, embora a enfermidade seja mais comum em animais com menos de cinco anos de idade e especialmente em potros (AINSWORTH, 2000).

A doença tem morbidade alta e baixa letalidade, o que tem grande relevância em locais com grandes concentrações de eqüinos. Os cavalos acometidos por essa doença apresentam, em consequência dos sinais clínicos, perda de *performance* gerando gastos com tratamento e mão de obra.

A transmissão da enfermidade se dá de forma direta (contato de animais doentes com animais suscetíveis) ou indireta (fômites). O contato direto inclui cavalos que estão incubando a doença, os que já estão se recuperando da enfermidade e portadores. Infecção por contato indireto se dá pelo uso compartilhado de bucais e outros utensílios e pela contaminação do ambiente, como pastagens, aguadas e estábulos (PRESCOTT & WRIGTH, 2000).

As manifestações clínicas da doença iniciam em geral após duas semanas da exposição ao agente. Os animais demonstram os sinais clínicos típicos de um processo infeccioso generalizado (depressão, inapetência, febre). Nos casos típicos de garrotilho passa-se a observar descarga nasal profusa, tosse produtiva, dor à palpação da região mandibular e aumento de volume de linfonodos, principalmente submandibulares. Os animais adotam posição de pescoço estendido pela dor na região da garganta (SWEENEY, 1993; AINSWORTH, 2000).

Com a progressão da doença, há desenvolvimento de abscessos principalmente dos linfonodos retrofaríngeos e submandibulares, que causam

obstrução local pela compressão. Os abscessos fistulam em 7 a 14 dias, liberando no ambiente pus contaminado com o agente. Em geral, após ruptura do abscesso, o animal se recupera rapidamente (KOWALSKI, 2000).

A enfermidade ocorre quando, após contaminação de forma direta ou indireta, o *S. equi* invade a mucosa nasofaríngea, fixando-se às células epiteliais da mucosa nasal e bucal de eqüinos, causando uma faringite aguda e rinite. Caso o hospedeiro não consiga conter este processo, o agente invade as glândulas nasais e tecido linfático faríngeo (os linfonodos retrofaríngeos e submandibulares são os mais comumente afetados), ocasionando um processo inflamatório com liberação da secreção nasal inicialmente serosa, passando a mucopurulenta e a purulenta em alguns dias. Os linfonodos afetados desenvolvem os abscessos que fistulizam e drenam para o exterior, para a faringe ou para a bolsa gutural. Após a drenagem, *S. equi* é liberado em descargas nasais purulentas contaminando o ambiente por semanas (KOWALSKI, 2000; PRESCOTT & WRIGTH, 2000).

Embora a patogenia da enfermidade seja conhecida, a regulação de muitos eventos-chave deste processo, tais como a adesão da bactéria, a invasão do epitélio do hospedeiro e a interação entre o microorganismo e fagócitos, não são ainda bem conhecidos (SLATER, 2003).

O agente se mantém na população em animais portadores. Durante os surtos de garrotilho alguns animais se convertem em portadores assintomáticos do agente, sendo possível isolar *S. equi* após o desaparecimento dos sinais clínicos da doença. Estes animais são potenciais fontes de infecção, podendo disseminar o microorganismo por muitos meses (NEWTON *et al*, 1997). *S. equi* pode permanecer viável nas descargas purulentas por várias semanas ou meses, e os estábulos permanecem contaminados por muito tempo se não forem cuidadosamente limpos e desinfetados. Vinte por cento dos animais que estão convalescendo ou que aparentemente estão recuperados, apresentam o agente na secreção nasal. Estresse, transporte, excesso de trabalho, infecções virais e parasitoses, aumentam a suscetibilidade dos animais e podem desencadear a enfermidade em animais com infecção latente (SCHILD, 2001).

Embora esta enfermidade se apresente geralmente na forma clássica,

alguns cavalos, em especial os animais mais velhos, podem desenvolver uma doença mais branda sem abscedação ou com a formação de abscessos de menor tamanho. Isso em geral é o resultado de uma resposta imune parcial gerada pela infecção por *S. equi*, ou pela infecção por uma cepa de baixa virulência (PESCOTT & WRIGHT, 2000).

Casos de morte por Adenite Eqüina estão geralmente ligados a complicações. Garrotilho bastardo, empiema da bolsa gutural, pneumonia aspirativa e púrpura hemorrágica são as complicações mais comuns.

O garrotilho bastardo produz-se pela disseminação da infecção por *S. equi* a outros linfonodos, além dos submaxilares, submandibulares e retrofaríngeos. Embora os abscessos possam ocorrer em qualquer parte do corpo, os locais mais comuns são os pulmões, mesentério, fígado, baço, rins e cérebro. A prevalência desta forma da enfermidade é baixa, mas quando ocorre, é difícil estabelecer um tratamento bem sucedido e o animal acometido pode morrer (SWEENEY, 1993). As causas desta forma da doença ainda não são adequadamente conhecidas, embora terapia antimicrobiana inadequada durante a fase de expectoração e fistulação de linfonodos possam contribuir para sua ocorrência (KOL *et al.*, 2003). A ruptura desses abscessos pode causar infecção generalizada, levando à morte.

Vários autores citam casos de adenite bastarda. KOL *et al* (2003) relatam dois casos atípicos de garrotilho. Em um dos casos foi observado por radiografia uma grande massa na região caudal ao coração, de onde foi isolado *S. equi*. No outro, os autores observaram a presença de abscessos na região mesentérica, de onde também isolaram o agente. Originalmente, a denominação de garrotilho bastardo se aplicava a uma linfadenopatia não supurativa dos linfonodos retrofaríngeos e submandibulares em cavalos velhos, não estando relacionada a metástases, e até hoje o termo gera controvérsias entre os autores.

A púrpura hemorrágica é uma vasculite aguda imuno-mediada que ocorre em geral em animais convalescentes de Adenite Eqüina. Este processo se dá pela precipitação de complexos imunes, formados por anticorpos do animal e frações do agente, que se fixam em capilares e causam uma

inflamação que determina o aparecimento de edema severo dos membros, cabeça e outras partes do corpo. A púrpura hemorrágica pode produzir-se, também, após a aplicação de vacinas. GALÁN & TIMONEY (1985) propuseram pela primeira vez, que a púrpura hemorrágica se tratava de uma enfermidade mediada por imunocomplexos. PUSTERLA *et al* (2003) relatam 53 casos de púrpura hemorrágica em eqüinos, sendo 17 destes expostos ou infectados com *S. equi* e cinco vacinados com proteína M.

O empiema das bolsas guturais pode ocorrer durante o curso clínico da enfermidade ou no período de convalescença. Os eqüinos possuem duas bolsas guturais, que são grandes sacos de mucosa com capacidade de 300 mL, localizados ventralmente ao divertículo da tuba auditiva, situadas entre a base do crânio e a faringe. Infecção persistente da bolsa gutural pode levar a aspiração de pus e, em alguns casos, a formação de um concremento sólido chamado condróide. Animais com esse tipo de infecção persistente são portadores e constituem a maior fonte de disseminação do agente entre animais suscetíveis (KOWALSKI, 2000).

O diagnóstico de Adenite Eqüina pode ser confirmado por isolamento do microorganismo, através de pus coletado por suabe nasal ou por punção de abscessos.

Técnicas de biologia molecular para identificação de várias espécies de *Streptococcus*, dentre elas, a reação de polimerase em cadeia (PCR), são bastante utilizadas por serem simples e rápidas. A técnica de PCR detecta o agente vivo ou morto, podendo ser coletado da faringe ou bolsa gutural, permitindo, quando associada à cultura bacteriana, a detecção de até 90% dos portadores (HARRINGTON *et al*, 2002).

TIMONEY & ARTIUSHIN (1997) detectaram *S. equi* por PCR em suabes e lavados nasais. AL-GHAMDI *et al* (2000) concluíram que uma seqüência repetitiva detectada por PCR é útil para a tipificação desta bactéria. KAWATA *et al* (2004) desenvolveram um procedimento que consiste de duas reações de PCR, com uso de sete e oito primers simultaneamente, onde o tamanho de cada amplicon indica uma espécie de *Streptococcus*.

Testes de ELISA também podem ser utilizados no diagnóstico indireto

da enfermidade. Existe apenas um kit comercial em nível mundial para o diagnóstico por ELISA (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine), que utiliza como antígeno proteína M específica de *S. equi*. O teste não distingue entre resposta vacinal e infecção, mas a comparação dos títulos de anticorpos fornece indicação do *status* de exposição ou infecção ao agente. Os títulos são classificados como negativo (sem anticorpos para proteína M específica de *S. equi*, o que pode ocorrer em cavalos com exposição recente ao agente), fraco positivo (baixo nível de anticorpos), positivo moderado (anticorpos em nível intermediário, que pode ocorrer em cavalos com 2-3 semanas pós-exposição), forte positivo (anticorpos em altos níveis, que pode ocorrer em animais com 4-12 semanas pós-infecção ou vacinados), e positivo muito forte (ocorre geralmente em eqüinos com púrpura hemorrágica ou garrotilho bastardo).

O garrotilho pode ser facilmente diagnosticado e tratado, mas sua profilaxia torna-se complicada, porque as vacinas disponíveis no mercado são pouco eficazes, apenas reduzindo em cerca de 50% a severidade da doença e a morbidade durante os surtos. A doença pode ocorrer em todas as épocas do ano, mas as condições climáticas de frio e umidade facilitam a sobrevivência do agente e sua disseminação, o que faz com que os animais que vivem nos estados mais frios e úmidos do país, como o Rio Grande do Sul, estejam mais propícios à infecção.

O tratamento da enfermidade é feito geralmente de acordo com o estágio da doença. Animais que apresentam sintomatologia de infecção por *S. equi* sem abscedação de linfonodos devem ser tratados com penicilina G. Em casos onde há formação do abscesso, a administração do antibiótico é contra indicada porque retarda sua evolução. Nesses casos devem usar-se substâncias revulsivas para facilitar a formação do abscesso, para depois ser lancetado e irrigado com solução de Iodo a 2%. Animais expostos ao microorganismo podem ser tratados com penicilina para prevenir a enfermidade, enquanto o animal estiver exposto ao agente. As complicações devem ser tratadas com terapia de suporte adequada e altos níveis de antimicrobianos.

2.2 - Etiologia e características do agente

Os *Streptococcus* são bactérias Gram-positivas, catalase negativas, em forma de cocos que se dividem em apenas um plano, que por não se separarem facilmente após a divisão tendem a formar cadeias. Constituem a principal população de microorganismos da cavidade oral, além de estarem envolvidos em diversas doenças dos animais domésticos. Entre os sistemas de nomenclatura desenvolvidos para esta espécie destacam-se aqueles baseados nas características da hemólise e dos antígenos de superfície (grupos sorológicos de Lancefield).

Os isolados eqüinos mais freqüentes e importantes de estreptococos β -hemolíticos são *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. equi* subsp. *equi* e *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Dentre estes, o *S. equi* subsp. *zooepidemicus* é o microorganismo mais freqüentemente isolado, mas o *S. equi* subsp. *equi* é o patógeno economicamente mais importante por causa da elevada patogenicidade (KOWALSKI, 2000). Neste trabalho *S. equi* subsp. *equi* será denominado *S. equi*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* será denominado *S. zooepidemicus* e *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* será denominado *S. equisimilis*, de acordo com nomenclatura citada por EUZEBY.

S. zooepidemicus produz colônias mucóides, devido à cápsula de ácido hialurônico sintetizada em Agar Sangue após 18-24 horas de cultivo, com 1 a 3 mm de diâmetro. A cápsula é freqüentemente hidrolisada por uma hialuronidase produzida pelo próprio microorganismo durante o cultivo, o que resulta numa colônia achatada, transparente e opaca. *S. equi* da mesma forma produz um tipo mucóide de colônia por causa da cápsula de ácido hialurônico, caracterizadas por apresentar uma cor dourada cor-de-mel em ágar sangue.

É necessário distinguir precisamente *S. equi* e *S. zooepidemicus* para instaurar rapidamente o tratamento específico antes que *S. equi* se dissemine no lote de animais (KOWALSKI, 2000). A diferenciação laboratorial destas bactérias é baseada na fermentação de lactose, sorbitol e trealose. *S. equi* não fermenta nenhum destes carboidratos, *S. zooepidemicus* fermenta lactose e

sorbitol, e *S. equisimilis*, trealose (KUWAMOTO *et al*, 2001). Foram encontradas, porém, cepas atípicas de *S. equi* fermentadoras de trealose, sorbitol e/ou lactose (GRANT *et al*, 1993), o que dificulta a caracterização dos agentes.

Devido à dificuldade de identificação, desenvolveram-se kits de identificação em microplaca, para distinguir entre *S. equi* e outros *Streptococcus* do grupo C de Lancefield (KUWAMOTO *et al*, 2001). Existe no mercado um sistema de diferenciação dos *Streptococcaceae* e microorganismos semelhantes conhecido como API 20 STREP, constituído por 20 testes bioquímicos com elevado poder discriminatório, que permite diferenciar a maioria dos *Streptococcus*, *Enterococcus* e microorganismos semelhantes mais comuns (BioMérieux Brasil S/A, São Paulo, SP).

Acreditava-se que isolados de *S. equi* eram sorologicamente e geneticamente homogêneos, mas a existência de cepas diferentes foi relatada por TIMONEY *et al*. (1984;1997).

Em uma revisão sobre as bases moleculares da infecção por *S. equi*, HARRINGTON *et al*. (2002) agruparam os fatores de virulência deste agente em aqueles que promovem aderência bacteriana, os que contribuem na evasão do sistema imune e os envolvidos na aquisição de nutrientes. Embora seja difícil enquadrar fatores em categorias específicas, já que alguns deles tem múltipla função. Fatores de virulência de *S. equi* incluem cápsula de ácido hialurônico, hialuronidase, streptolisina O, streptoquinase, receptores para Fc de IgG, peptidoglicano e proteína M antifagocítica (TIMONEY, 1993). LANNERGARD (2003) descreveu um colágeno móvel da parede celular de *S. equi* denominado CNE, como outro possível fator de virulência. Foram também identificadas em *S. equi* duas proteínas extracelulares que se ligam a fibronectina, denominadas FNE (LINDMARK *et al*, 1996; LINDMARK *et al*, 2001) e SFS (LINDMARK *et al*, 1999). Essas proteínas são muito importantes na virulência do agente, por estarem relacionadas à capacidade de aderência do agente ao hospedeiro.

ANZAI *et al* (1999) descreveram a produção de uma importante atividade mitogênica e pirogênica em isolados de *S. equi* da América do Norte,

Japão e Irlanda, e sugeriram que proteínas análogas a exotoxinas pirogênicas de *S. pyogenes* possam contribuir para a grande virulência de *S. equi*, já que estas não estão presentes em *S. zooepidemicus*. ARTIUSHIN *et al.* (2002) caracterizaram dois mitógenos pirogênicos, denominados SePE-H e SePE-I, e testaram a imunogenicidade destas proteínas, confirmando que elas conferem uma maior patogenicidade ao *S. equi*.

Diferentes níveis de patogenicidade em vivo e resistência a fagocitose de cepas de *S. equi* com variados níveis de expressão de cápsula foi descrito por ANZAI *et al* (1999). Neste trabalho foram comparadas três cepas de *S. equi*, uma não capsulada, uma que produzia cápsula de tamanho médio e uma com cápsula grande, comprovando que a cepa não capsulada não foi capaz de resistir à fagocitose por neutrófilos eqüinos e não produziu doença clínica, enquanto as outras foram resistentes à fagocitose e produziram enfermidade típica.

Dentre os fatores de virulência, a proteína M tem especial importância. Esta é uma proteína de membrana que possui atividade antifagocítica e de aderência, e está presente em algumas cepas de *Streptococcus* (TIMONEY & MUKHTAR, 1993). Foi caracterizada pela primeira vez por GALÁN & TIMONEY (1987), que clonaram seu gene estrutural e a expressaram em *Escherichia coli*. GALÁN & TIMONEY (1988) compararam isolados de *S. equi* dos Estados Unidos da América e Europa isolados num período de 10 anos, e concluíram que existe somente um tipo de proteína M específica de *S. equi* denominada SeM.

Segundo TIMONEY *et al* (1997), porém, *S. equi* possui genes que codificam dois tipos de proteína M, uma própria deste microorganismo (SeM), e outra homóloga à proteína M SzP produzida por *S. zooepidemicus* (SzPSe). SzP e SzpSe apresentam grande homologia (85% de identidade entre os aminoácidos que as constituem), mas SeM e SzPSe tem uma relação distante, possuindo somente um peptídeo sinal e a região de ancoragem à parede celular em comum. Neste trabalho, determinou-se a seqüência de aminoácidos da proteína SeM e comparou-se com a da proteína SzPSe, comprovando que soros de camundongos imunizados com a proteína SzPSe não reagiram com a

proteína SeM em testes de opsonização, indicando ausência de imunidade cruzada, o que tem relevância na resposta imune contra uma ou outra proteína M (HARRINGTON *et al*, 2002). A atividade antifagocítica da proteína M está associada com sua capacidade de inibir a deposição do componente C3b do sistema complemento na superfície da bactéria, assim como de se ligar ao fibrinogênio, inibindo a fagocitose (HARRINGTON *et al*, 2002).

CHANTER *et al* (2000) descreveram pela primeira vez uma proteína M truncada em *S. equi*, resultante de deleções em diferentes porções entre a seqüência sinal e a região repetitiva no gene da proteína M, equivalente a aproximadamente 20% da proteína naturalmente expressada. Mesmo com a porção do gene deletada, a virulência da proteína é mantida. Comprovaram que cerca de 80% dos animais portadores apresentaram agentes com esta alteração.

2.3 - Imunidade

Após a recuperação de um surto de garrotilho, aproximadamente 75% dos animais infectados apresenta um período longo de resistência à infecção, apesar de poderem ocorrer re-infecções tão precocemente como 6 meses após o desaparecimento da doença clínica (PRESCOTT & WRIGHT, 2000).

Os anticorpos de mucosa contra proteína M, que necessitam de estímulo tópico, desaparecem mais precocemente que os circulantes. Estes anticorpos podem evitar a aderência do microorganismo à mucosa, e seus baixos níveis fazem com que o sistema imunológico tenha uma resposta ineficiente contra o agente. O leite das éguas que se recuperam de garrotilho contem IgG e IgA contra a proteína M, ainda que o nível de anticorpos dependa da imunocompetência da égua.

SHEORAN *et al* (1997) concluíram que embora as vacinas induzam respostas sorológicas qualitativa e quantitativamente similares a aquelas encontradas em animais convalescentes, não há indução de resposta de mucosa adequada.

2.4 - Vacinas

A Adenite Eqüina não é eficientemente controlada nas propriedades mediante um programa de vacinação. Há diversas vacinas atualmente em uso que incluem bacterinas ou vacinas com componentes da proteína M. Entretanto, as vacinas disponíveis são pouco eficientes (TIMONEY, 1993), já que não mais que 50% dos animais vacinados ficam imunes. Mesmo a imunização não induzindo resistência populacional aceitável, os animais imunizados respondem muito mais rápido e com níveis mais altos de anticorpos circulantes do que de anticorpos de mucosa (SWEENEY, 1993; KOWALSKI, 2000; PRESCOTT & WRIGTH, 2000).

A incapacidade das vacinas em impedir totalmente a ocorrência de garrotilho pode se dar, em parte, devido à inadequada estimulação ou persistência dos anticorpos bactericidas no soro, ou porque a proteção nos eqüinos não seja mediada por anticorpos bactericidas séricos, mas por anticorpos nasofaríngeos produzidos localmente (SWEENEY, 1993).

Em nível mundial existem várias vacinas contra Adenite Eqüina, com diferentes formulações e vias de administração. As bacterinas são geralmente formuladas com um adjuvante como hidróxido de alumínio (Equibac II, Fort Dodge Animal Health, USA). As vacinas de proteína M são preparadas por extração com ácido quente (Strepvax, Boehringer Ingelheim, Alemanha) ou com tratamento de células íntegras de *S. equi* por uma mutanolisina, enzima hidrolítica da parede celular (Strepguard, Bayer Corporation, Alemanha). A empresa australiana CSL Ltd. Produz uma vacina com extrato de células de *S. equi* (Equivac S), apresentada também associada a toxóide tetânico (Equivac 2 in 1).

Em 1998 foi lançada ao mercado mundial a primeira vacina de aplicação intranasal contra o garrotilho contendo uma cepa de *S. equi* replicante atenuada (Pinnacle I.N, Fort Dodge Animal Health, USA). O produto teria a vantagem de não produzir os efeitos colaterais causados pela administração de vacinas por via intramuscular ou subcutânea. Embora trabalhos ressaltem a eficiência desta vacina (JACOBS *et al*, 2000), atualmente algumas publicações

relatam reações adversas com este imunógeno ([HERBERT, 2001](#)).

Recentemente, foi lançada a primeira vacina britânica contra Adenite Equina (Equilis StrepE, Intervet, UK), constituída por uma cepa mutante por deleção, de *S. equi*. Segundo os fabricantes a nova vacina protege cerca de 75% dos vacinados e é aplicada na submucosa.

Independentemente do produto, são necessárias no mínimo três injeções de vacina de proteína M para o desenvolvimento de imunidade adequada. Embora a administração intramuscular de vacinas de proteína M reduza a incidência e a severidade dos sinais clínicos de garrotilho, sua aplicação pode provocar altas taxas de reação local, incluindo abscedação (HARRINGTON *et al*, 2002).

A proteína M 58 KDa tem sido identificada como o principal antígeno específico e de proteção contra *S. equi*. Esse antígeno não mostra variação, o que leva a acreditar que a baixa eficácia das vacinas que contém essa proteína se dá pelo modo de sua apresentação ao sistema imune de cavalos (SHEORAN *et al*, 1997). Com o propósito de melhorar a resposta imune às vacinas, realizaram-se vários trabalhos. NALLY *et al* (2001) comunicaram que o uso de sucrose acetato isobutirato (SAIB) como veículo para vacina intranasal a base de proteína M aumenta a resposta imune. SHEORAN *et al* (2002) utilizaram toxina colérica na construção de uma vacina intranasal, visto que esta toxina é um potente imunógeno ao nível de mucosa. Os autores concluíram que esta construção é imunogênica, mas os anticorpos produzidos contra o agente não protegem contra a enfermidade.

Por ter propriedades antifagocíticas, a cápsula de *S. equi* também foi estudada para construção de vacinas. CHANTER *et al* (1999) identificaram em *S. equi* e *S. zooepidemicus* uma proteína associada ao hialuronato (HAP), anteriormente identificada em *S. equisimilis*, como um imunógeno capaz de interferir na estrutura da cápsula, e utilizaram esta proteína para proteger contra desafio experimental em camundongos, observando uma redução dos sinais clínicos em camundongos desafiados com *S. equi*. WALKER & TIMONEY (2002) induziram uma mutação específica do gene da hialuronidase sintetase em uma cepa virulenta não encapsulada, que tem sido usada como

vacina intranasal (cepa Pinnacle) para abolir permanentemente a cápsula e fornecer um marcador genético facilmente reconhecível. FLOCK *et al* (2004) avaliaram antígenos extracelulares do agente (FNZ, EAG e SFS) como componentes de vacina contra garrotilho, usando como modelo biológico camundongos e concluíram que esses antígenos são candidatos promissores para uma vacina eficaz contra a enfermidade.

Até o momento, três laboratórios brasileiros fabricam vacinas contra a Adenite Eqüina. Uma das vacinas contém amostras de *S. equi*, *S. pyogenes*, *Micrococcus pyogenes* e *Pasteurella multocida* (Laboratório Prado S/A, Curitiba, PR). Essa vacina, aplicada por via subcutânea, é indicada como curativa e preventiva da enfermidade, e veicula antibióticos. Outro laboratório (Hertape Ltda, Juatuba, MG) fabrica uma vacina indicada apenas na prevenção do garrotilho, administrada por via intramuscular, composta por uma suspensão de *S. equi* em soro fisiológico inativada por calor. Um terceiro laboratório (Leivas Leite S/A, Pelotas, RS) produz uma vacina indicada para imunização ativa, constituída por cultivos totais de *S. equi* inativados por formol, para aplicação subcutânea (ANDREI, 1999).

2.5 - Importância e atuais linhas de pesquisa

No estado do Rio Grande do Sul encontram-se haras de grande importância para a criação de eqüinos em nível nacional, localizados principalmente no município de Bagé. A produção de animais de alto padrão zootécnico por estes estabelecimentos faz com que enfermidades como a Adenite Eqüina devam ser controladas, facilitando assim a produção de eqüinos e sua comercialização. Somente através do conhecimento do genótipo e fenótipo das cepas existentes na região será possível a produção de vacinas eficazes.

Um maior entendimento sobre a base molecular e virulência do agente são os objetivos principais dos atuais estudos sobre Adenite Eqüina. Além disso o controle de animais portadores, o diagnóstico eficiente para detecção destes animais e produção de novas vacinas, também são alvo de pesquisa.

Vários trabalhos foram desenvolvidos buscando novas tecnologias para o controle e diagnóstico da Adenite Equina. MAY *et al* (2004) desenvolveram um sistema de mutação *in vivo* por transposon *himar 1*, que teve por objetivos criar um procedimento de mutação de *S. equi* e a criação de uma biblioteca genômica de mutantes. KARLSTROM *et al* (2004) construíram uma biblioteca genômica através do uso seqüências sinais para identificação de proteínas extracelulares de *S. equi*. Neste mesmo trabalho e pela mesma técnica os autores caracterizaram uma proteína semelhante ao colágeno denominada SclC, similar a outras duas proteínas já identificadas em *S. pyogenes*.

Pesquisa envolvendo técnicas avançadas de biologia molecular serão possivelmente o caminho para resolução de problemas e melhor compreensão dos eventos envolvidos na patogenia da Adenite Equina.

3. Hipótese

Cepas de *Streptococcus equi* causadoras de Adenite Equina clínica na região sul do Rio Grande do Sul são antigenicamente homogêneas, induzem níveis de anticorpos diferentes e possuem reatividade cruzada.

4. Objetivos

- Caracterizar fenotipicamente cepas de *Streptococcus equi* isoladas de eqüinos com enfermidade clínica na região sul do Rio Grande do Sul.
- Avaliar a produção de anticorpos contra as diferentes cepas de *Streptococcus equi* isoladas na região.
- Determinar os Índices de Reatividade Cruzada de cepas de campo isoladas na região.
- Estimar a relação antigênica das cepas de campo com duas vacinas comerciais.

5. Caracterização fenotípica e estimativa da reatividade cruzada de cepas de *Streptococcus equi* isoladas de eqüinos da região Sul do Rio Grande do Sul

Resumo

Caracterizaram-se 13 cepas de *Streptococcus equi* isoladas de materiais provenientes de 35 eqüinos com manifestações clínicas de Adenite Equina na região sul do Rio Grande do Sul. Coletaram-se suabes nasais para cultura bacteriológica e isolamento bacteriano. Os microorganismos com características compatíveis com *Streptococcus equi* foram classificados por testes de produção de ácidos de açúcares com e sem adição de soro eqüino inativado para enriquecimento do meio, e a caracterização foi confirmada pelo kit API 20 STREP (BioMérieux Brasil S/A). Prepararam-se vacinas monovalentes com as cepas de *S. equi*. Camundongos Balb/c isogênicos foram vacinados com as vacinas produzidas e com duas vacinas comerciais para garrotilho nos dias 0 e 14. Coletaram-se amostras de sangue nos dias 0, 14, 28 e 56. Titularam-se anticorpos pelo teste de ELISA, e estimaram-se os índices de reatividade cruzada. De 35 amostras coletadas, 13 foram de *S. equi*, das quais cinco produziram ácido a partir de algum açúcar, comportando-se como cepas atípicas. Destas, quatro só fermentaram açúcares em meio enriquecido com soro eqüino inativado. Os IRC demonstraram que as cepas de *S. equi* estudadas pertencem a um mesmo sorogrupo, entanto os IRC das vacinas comerciais variaram de 23 a 46 com as cepas de campo, demonstrando baixa reatividade.

Palavras-chave: *Streptococcus equi*, vacina, IRC, caracterização.

INTRODUÇÃO

A Adenite Eqüina (também conhecida como “garrotilho”), é uma enfermidade bacteriana contagiosa, causada por *Streptococcus equi*, microorganismo β hemolítico do grupo C de Lancefield, que atinge o trato respiratório superior de eqüinos acometendo animais de todas as idades, principalmente os jovens entre um e cinco anos de idade (TIMONEY *et al.*, 1997). Caracteriza-se por apresentar secreção mucopurulenta das vias aéreas superiores e linfadenite com formação de abscessos (SWEENEY, 1993).

A doença tem baixa letalidade, porém sua morbidade é alta, o que tem grande relevância no que diz respeito a locais com grandes concentrações de eqüinos. Os cavalos doentes apresentam perda de *performance* e geram gastos com tratamento e mão de obra.

A enfermidade é facilmente diagnosticada e tratada clinicamente, mas sua profilaxia se torna complicada, pois vacinas disponíveis no mercado não são plenamente eficazes para impedir a ocorrência da doença, apenas reduzindo em cerca de 50% sua severidade e a morbidade durante os surtos (KOWALSKI, 2000). O garrotilho pode ocorrer em todas as épocas do ano, mas as condições climáticas de frio e umidade facilitam a sobrevivência do agente e sua disseminação, o que faz com que os animais que vivem nos estados mais frios e úmidos do país, como o Rio Grande do Sul, estejam mais propícios à infecção.

Outros estreptococos β -hemolíticos isolados freqüentemente de eqüinos são *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* e *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (KOWALSKI, 2000). Essas duas bactérias podem ser isoladas de amostras de doença clínica em cavalos, ou associadas a *S. equi* em lesões de garrotilho, considerando-se patógenos secundários. A distinção entre esses microorganismos somente pela característica de suas colônias se torna difícil (KUWAMOTO, 2001).

A identificação dessas três bactérias é tradicionalmente feita com base na fermentação de lactose, sorbitol e trealose. *S. equi* não fermenta nenhum destes açúcares, *S. zooepidemicus* fermenta lactose e sorbitol, e *S. equisimilis* trealose

(KUWAMOTO, 2001). Foram detectadas, porém, cepas atípicas de *S. equi* que fermentam açúcares (GRANT, 1993), o que dificulta ainda mais caracterização dos agentes da enfermidade.

Fatores de virulência de *S. equi* incluem cápsula de ácido hialurônico, hialuronidase, streptolisina O, streptoquinase, receptores para Fc de IgG, peptidoglicano e proteína M antifagocítica (HARRINGTON, 2002). Dentre estes fatores, a proteína M, caracterizada pela primeira vez por GALÁN & TIMONEY (1987), tem especial importância, já que é uma proteína de membrana que possui atividade antifagocítica e de aderência, e está presente em algumas cepas de *Streptococcus* (TIMONEY & MUKHTAR, 1993).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar cepas de *Streptococcus* isoladas de eqüinos com enfermidade clínica na região sul do Rio Grande do Sul, avaliar a produção de anticorpos, e estimar os índices de reatividade cruzada entre elas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Exame de animais com suspeita clínica de Adenite Eqüina e coleta de material

Animais com suspeita clínica de garrotilho foram examinados e amostras de secreção nasal foram coletadas por meio de suabe estéril para isolamento bacteriológico. Os animais apresentavam produção abundante de secreção nasal e tosse.

2. Caracterização de cepas de *Streptococcus equi*

As amostras foram semeadas em agar sangue desfibrinado de ovino a 10% e as placas incubadas a 37°C por 48 horas. Registraram-se as características das colônias e da hemólise, e realizou-se bacterioscopia de cultivos corados pelo Gram, e o teste de catalase em lâmina utilizando água oxigenada com 10 vol. As colônias constituídas por cocos Gram positivos, catalase negativos, foram multiplicadas em agar sangue. Estas culturas foram

suspensas em solução salina na concentração equivalente ao tubo 5 da escala de Mac Farland, e após utilizadas para realização de testes bioquímicos.

Cada isolado foi semeado em trealose, sorbitol e lactose, sem e com adição de 10% de soro eqüino estéril inativado a 60°C por 50 min, e identificado pelo kit API 20 STREP (BioMérieux Brasil S/A, São Paulo, SP), de acordo com as instruções do fabricante. Determinou-se a fermentação de açúcares após 48 horas de incubação, e a do API 20 STREP as 4 e 24 horas de cultura.

O kit API 20 STREP utiliza como indicadores taxonômicos os testes Voges proskauer, ácido pirúvico, esculina, ácido piroglutâmico, α e β galactosidase, β giucuronisidase, fosfatase alcalina, Leucina amino peptidase, arginina, além das provas de fermentação de açúcares (Ribose, arabinose, manitol, sorbitol, lactose, trealose, inulina, rafinose e amido).

Considerou-se cepas de *S. equi*, aquelas que concordaram com as características enunciadas pelo API 20 STREP.

3. Produção de vacinas de *Streptococcus equi*

Prepararam-se vacinas com 10 cepas isoladas de animais com Adenite Eqüina. Para isso, as cepas de *S. equi* foram cultivadas em meio Infusão de cérebro e coração (BHI) acrescido de 1% de peptona, a 37°C durante a noite. Após, as culturas foram centrifugadas, e os precipitados suspensos em salina estéril e titulados mediante a técnica de diluições seriadas e plaqueamento em agar sangue.

Para a elaboração das vacinas, 5ml de salina estéril contendo $2,5 \times 10^8$ UFC de culturas de cada cepa, foram adicionadas de formol na concentração de 1:5000 e incubadas durante 24 horas a 37°C. Por último incorporou-se hidróxido de alumínio a 10% como adjuvante.

4. Imunização de camundongos

Fêmeas Balb-c isogênicas divididas aleatoriamente em 13 grupos de

quatro animais foram utilizados no experimento. Cada grupo foi inoculado por via subcutânea com 1/20 da dose para cavalos indicada por fabricantes de vacinas comerciais (CFR 9, 1996) de uma das vacinas elaboradas, nos dias 0 e 14 do experimento. Dois grupos foram vacinados com vacinas comerciais seguindo o mesmo protocolo utilizado nos outros grupos, e um grupo permaneceu como controle. Coletou-se sangue nos dias 0, 14, 28, 56 e 70 para obtenção de soro e posterior titulação de anticorpos.

As vacinas utilizadas são comunicadas na Tabela 1

Tabela 1 - Vacinas testadas

Grupo	Vacinas
1	Cepa 2
2	Cepa 7
3	Cepa 25
4	Cepa 30
5	Cepa 32
6	Cepa 26
7	Cepa 8
8	Cepa 35
9	Cepa 14
10	Cepa 29
11	Vacina comercial A
12	Vacina comercial B

5. Titulação de anticorpos

a) Preparação do antígeno

Cepas de *S. equi* utilizadas na elaboração das vacinas foram semeadas em agar sangue desfibrinado de ovino a 10% e incubadas a 37°C durante a noite. O cultivo das placas foi transferido para recipientes contendo 50 ml de Infusão de cérebro e coração (BHI) acrescido de 1% de peptona, e cultivado a 37°C durante a noite. A cultura foi centrifugada e o precipitado ressuspendido em salina estéril. A concentração bacteriana foi determinada mediante a técnica de diluições seriadas em salina estéril a 0,9% e plaqueamento em agar

sangue . Cultivos contendo $2,5 \times 10^8$ UFC, correspondente a absorvância 1,5 a 480 nm, inativado por formol na concentração de 1:5000 a 37° C, durante 24 horas foi suspenido em tampão carbonato-bicarbonato e foram utilizados como antígeno.

Foram utilizados como antígenos para análise das vacinas comerciais a própria vacina concentrada duas vezes em tampão carbonato-bicarbonato.

b) Teste de ELISA

Os anticorpos foram titulados mediante ELISA utilizando os antígeno descritos em 5 a. Placas de poliestireno (Greiner Labortechnik, Alemanha) foram sensibilizadas com o antígeno suspenido em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 durante a noite, em refrigeração. Posteriormente as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (tampão salina fosfatada pH 7,6 contendo Tween 20 a 0,05 %). Após, *pool* dos soros de cada grupo obtido nas diferentes coletas de sangue, diluído 1:50 em PBS-T, foram colocados na placa e incubados a 37°C por 1,5 horas, e soro anti Ig de camundongo conjugado com peroxidase (Peroxidase conjugated rabbit anti mouse immunoglobulins, Dako Co., California, USA), acrescentado. A reação foi revelada usando Orto Fenil Diamina (3,4 mg em 10 mL de tampão fosfato citrato) à qual foram adicionados 5 µL de água oxigenada de 30 vol. A leitura da densidade ótica foi feita a 450 nm em leitor de ELISA (Dynatech MR 700, Alemanha), 10 min após adicionar o revelador.

c) Índice de reatividade cruzada (IRC)

O índice de reatividade cruzada bilateral (Arrowsmith, 1977) foi utilizado para estimar as relações antigênicas entre os isolados. O IRC foi determinado pela seguinte equação:

$$\text{IRC} = 100 \times \sqrt{r \times r'}$$

onde r é obtido pelo quociente da DO (densidade ótica) do soro A com

antígeno B sobre a DO do soro A com antígeno A, e r' é obtido pelo quociente da DO do soro B com antígeno A sobre a DO do soro B com antígeno B.

Isolados que apresentaram $IRC \geq 70$ foram colocados em um mesmo sorogrupo.

RESULTADOS

1. Animais com suspeita clínica de Adenite Eqüina

Foi possível observar nos animais examinados neste trabalho todos os sinais característicos da enfermidade. Onze (31,4 %) apresentaram abscedação em outros linfonodos além dos da região da garganta (Garrotilho bastardo), e um (2,9 %) empiema da bolsa gutural. As informações dos 35 eqüinos com diagnóstico clínico de garrotilho estudados constam na tabela 2.

Tabela 2- Identificação dos animais com diagnóstico clínico de Adenite Eqüina

PROPRIEDADE	CATEGORIA	Nº ANIMAIS	LOCALIZAÇÃO	MATERIAL COLETADO	SINAIS CLÍNICOS
A	AJ	1	Laranjal/Pelotas	S	T, SN,A
B	P- AJ	5	Passo do Salso/Pelotas	S	T, SN,A, E
C	AJ	1	Passo do Salso/Pelotas	S	SN
D	P-AJ	6	B. Sta. Bárbara/Pelotas	S	SN,A
E	AJ	1	Sítio Floresta/Pelotas	S	SN
F	AJ	1	Interior Pelotas	S	SN
G	AJ	8	Laranjal/Pelotas	S	SN,A
H	AJ	1	Haras/Bagé	S	SN
I	AJ	1	São Sepé	S	SN
J	P	10	Haras/Bagé	S/P	SN, GB

P (Potro): animal de 12-20 meses de idade; AJ (Adulto jovem): animal de 5-10 anos de idade
SN: secreção nasal; T: tosse; A: adenite; E: empiema de bolsa gutural; GB: garrotilho bastardo;
S: Swab nasal; S/P: Swab nasal e pús

2. Isolamento bacteriano

Das 35 amostras coletadas, 13 (37,14%) foram caracterizadas como *S. equi* e 18 (51,42%) apresentaram flora polimicrobiana, não sendo possível isolar os estreptococos. De quatro amostras (11,42%) foram isolados cocos

Gram positivos β hemolíticos, catalase negativos, que não foi possível caracterizar pelo API 20 STREP, sendo classificados como *Streptococcus sp.*

Na Tabela 3 comunicam-se os resultados dos testes de utilização de açúcares com a adição de soro, referidos aos do API 20 STREP. Das 13 amostras de *S. equi* isoladas, cinco (38,5%) fermentaram algum dos açúcares, e sendo que quatro delas só fermentaram os açúcares quando foi adicionado soro equino inativado.

Tabela 3 - Resultados dos testes bioquímicos de utilização de açúcares e do API 20 STREP de 13 cepas de *Streptococcus equi*

AMOSTRA	TREALOSE		SORBITOL		LACTOSE		API STREP, % id.
	CS	SS	CS	SS	CS	SS	
2	-	-	-	-	-	-	<i>S. equi</i> , 99,9 %
7	-	-	-	-	-	-	<i>S. equi</i> , 99,9 %
8*	+	-	-	-	+	-	<i>S. equi</i> , 99,9 %
10	-	-	-	-	-	-	<i>S. equi</i> , 99,6 %
14	-	-	-	-	-	-	<i>S. equi</i> , 99,9 %
24*	+	-	+	-	-	-	<i>S. equi</i> , 99,6 %
25*	+	-	-	-	-	-	<i>S. equi</i> , 99,6 %
26*	-	-	-	-	+	+	<i>S. equi</i> , 99,6 %
28	-	-	-	-	-	-	<i>S. equi</i> , 99,9 %
29	-	-	-	-	-	-	<i>S. equi</i> , 99,9 %
30*	+	-	-	-	-	-	<i>S. equi</i> , 99,9 %
32	-	-	-	-	-	-	<i>S. equi</i> , 99,9 %
35	-	-	-	-	-	-	<i>S. equi</i> , 99,6 %

CS: Com soro; SS: Sem soro; %id: Percentual de identificação; +: produção de ácido; * Cepas atípicas.

Recuperaram-se cepas típicas e atípicas de *S. equi* nas propriedades D e J, mas não nas restantes.

3. Resposta às vacinas

A Figura 1 mostra a variação individual entre animais vacinados com o mesmo antígeno. O resultado demonstra que a maior resposta foi obtida nos animais do grupo 8.

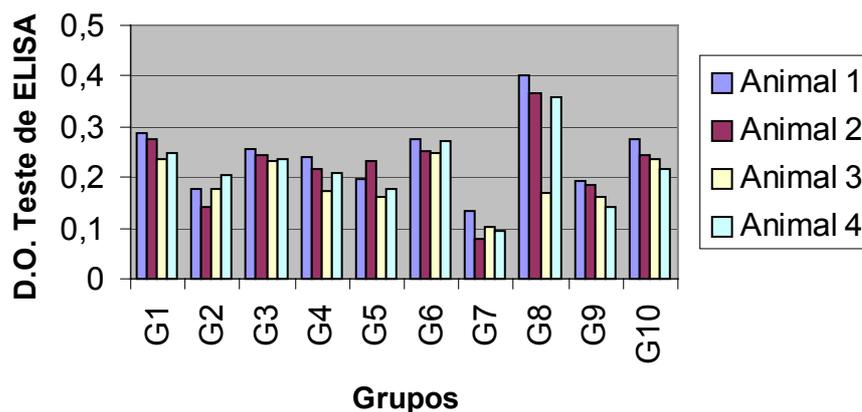


Figura 1- Variações individuais na resposta imune dos animais dos diferentes grupos inoculados com vacinas de *S. equi* produzidas a partir de cepas de campo no dia 56.

Cinco camundongos apresentaram lesões de pele na porção inferior do corpo e membros na ocasião da aplicação da segunda dose de vacina.

A figura 2 mostra o comportamento da resposta imune às diferentes vacinas durante o período de observação. Pode observar-se que a soroconversão induzida pela vacina utilizada no grupo 6 foi três vezes maior que a dos demais grupos, no entanto, salvo três vacinas que não produziram resposta (8, 9 e 10), as das outras vacinas seguiram uma tendência similar as restantes .

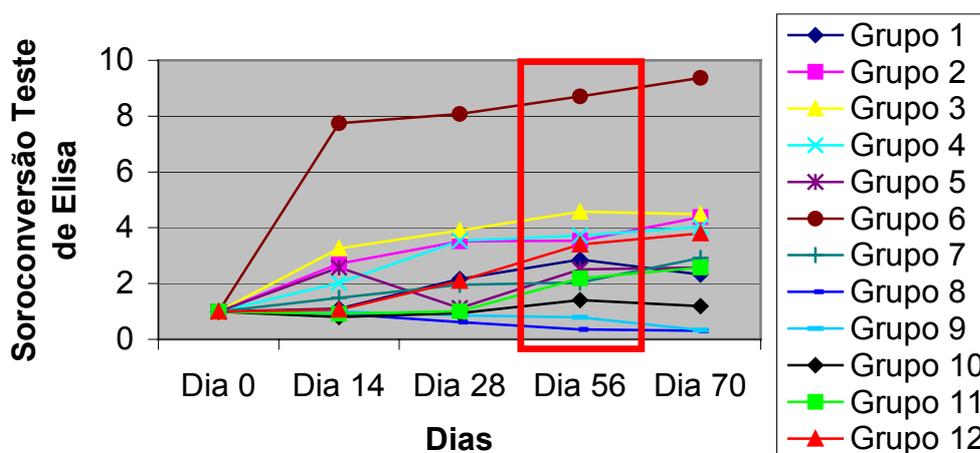


Figura 2- Soroconversão dos diferentes grupos inoculados com vacinas de *S.*

equi.

A Figura 2 mostra que a vacina comercial A (Grupo11) induziu soroconversão no dia 56 menor do que sete das dez cepas de campo estudadas, enquanto a vacina comercial B (Grupo 12) apresentou soroconversão menor do que as induzidas por quatro delas.

Os grupos 3, 4 e 7 foram imunizados com cepas atípicas. Pode-se observar através da figura 1 que o grupo 7 foi o grupo que apresentou menor soroconversão dentre os imunizados com cepa de campo.

5. IRC

Os Índices de Reatividade Cruzada (IRC) são comunicados na Tabela 5. Sete cepas de campo apresentaram IRC>70 entre si. A cepa 1 apresentou IRC<70 frente as cepas 7 e 10, entanto a cepa 3 apresentou IRC<70 com quatro cepas, ainda que salvo com a cepa 9, os índices com as outras cepas foram muito próximos.

Tabela 4 - IRC das cepas de campo de *S. equi*, e relação com as vacinas comerciais

cepas	2	7	25	30	32	26	8	35	14	29	VC A	VC B
2	100	93	75	111	80	83	67	77	76	61	44	27
7		100	83	88	103	75	83	75	71	113	41	32
25			100	76	69	67	74	66	61	98	40	31
30				100	96	104	120	105	94	134	43	33
32					100	88	123	90	99	92	39	23
26						100	116	72	224	87	34	35
8							100	117	115	131	46	40
35								100	100	103	30	29
14									100	97	41	27
29										100	33	43
VC A											100	83
VC B												100

VC A: Vacina comercial A; VC B: Vacina comercial B

As cepas utilizadas para fabricação de vacinas comerciais (11 e 12) demonstraram IRC inferior a 70 com todas as cepas estudadas, mas não entre elas.

Discussão

Foi possível observar nos animais examinados neste trabalho todos os sinais característicos da enfermidade, desde os mais leves até empiema da bolsa gutural. Embora estes animais apresentassem a doença clínica, foi possível confirmar o diagnóstico por isolamento bacteriano em apenas 37,14% dos casos, o que demonstra a dificuldade de se isolar o agente a partir de materiais de campo. Esses dados confirmam a comunicação pessoal de C. A. M. Silva, citada por SCHILD (2001), que afirma que a enfermidade pode ser confundida com outras doenças do trato respiratório de eqüinos e que muitas vezes o diagnóstico clínico é feito sem confirmação laboratorial, razão pela qual é difícil estimar a prevalência da doença. Dos onze animais com Garrotilho Bastardo, 10 eram potros pertencentes ao mesmo haras.

A identificação de *S. equi* depende da capacidade de produzir ácido a partir de açúcares, especialmente lactose, sorbitol e trealose. Resultados negativo em todos eles confirmam a espécie deste microorganismo, ainda que cepas atípicas podem produzir ácido a partir de algum destes substratos (Euszeby, 2004). *S. zooepidemicus* e *S. equisimilis*, outros dois *Streptococcus* β hemolíticos freqüentemente isolados de eqüinos, fermentam um ou mais destes açúcares, podendo induzir a caracterização incorreta quando não se utilizam outros testes discriminatórios (EUSZEBY, 2004). Na comparação com o sistema API 20 STREP, que incorpora outros indicadores taxonômicos, comprovou-se que cinco das treze (38,5%) amostras de *S. equi* isoladas produziram ácido destes açúcares sendo duas acidificadoras de trealose, uma de trealose e lactose, uma de trealose e sorbitol e uma de lactose. Cepas atípicas foram descritas por GRANT *et al.* (1993) e KUWAMOTO *et al.* (2000). GRANT *et al.* (1993) identificaram sete isolados atípicos de *S. equi*, cinco fermentadores de trealose, um fermentador de lactose e um fermentador de lactose e trealose, e alertaram para uma maior atenção em termos a identificação dos estreptococos isolados de eqüinos, visto que cepas atípicas podem ser identificadas como *S. zooepidemicus* ou *S. equisimilis*, que são agentes menos virulentos e que respondem melhor ao tratamento que o *S. equi* (BONNISTER *et al.*, 1985). Estas cepas atípicas, quando analisadas em

laboratório pelos padrões convencionais, se enquadram na classificação como outro estreptococo do grupo C de Lancefield, que não *S. equi*.

Streptococcus são bactérias com uma certa exigência de nutrientes para seu crescimento. O uso de soro eqüino inativado para enriquecimento dos meios de fermentação de açúcares para provas bioquímicas de identificação de estreptococos é preconizado por alguns autores (TIMONEY & MUKHATAR, 1993). Das cinco cepas atípicas isoladas em nosso trabalho, 30,8% só fermentaram os açúcares quando o meio de cultivo foi enriquecido com soro eqüino inativado, sugerindo que a adição do soro eqüino aos testes de caracterização pode dar maior precisão na caracterização de *S. equi*. Em nosso estudo comprovou-se que cepas típicas e atípicas estavam presentes em animais de duas propriedades, mas não nas doze restantes (Tabela 3).

Um dos principais problemas relacionados com o garrotilho é a limitada proteção conferida pelas vacinas que estão disponíveis no mercado. Vacinas produzidas no Brasil utilizam a bactéria completa e, por tanto, qualquer variação entre cepas está diretamente ligada à resposta vacinal.

O índice de reatividade cruzada (IRC) foi utilizado neste trabalho para estimar as relações antigênicas entre as cepas recuperadas de animais com manifestações clínicas de Garrotilho. Isolados com $IRC \geq 70$ foram considerados pertencentes ao mesmo sorogrupo. Este procedimento, que é rotineiramente utilizado para estimar a reatividade cruzada dos vírus da Febre Aftosa (FMDV) (ARROWSMITH, 1977), também foi utilizado em trabalhos com *Bordetella bronchiseptica* (OLIVEIRA & GIL-TURNES, 1988; MARTINS & GIL-TURNES, 1994) e *Moraxella bovis* (CONCEIÇÃO *et al.*, 2002).

No presente trabalho pode-se observar que só duas cepas apresentaram $IRC < 70$, a cepa 1 frente a outras duas, e a cepa 3 com outras quatro. As restantes tiveram $IRC > 70$ entre elas, sugerindo homogeneidade antigênica. Por sua vez, os IRC das duas vacinas com as cepas de campo variaram de 30 a 46 e de 23 a 43, respectivamente, sugerindo uma marcada diferença antigênica com as cepas de campo, mas não entre elas, já que o IRC foi 83.

Os IRC das cepas estudados variaram de 61 a 224, indicando que

mesmo as duas cepas com IRC<70 com as restantes, tinham um elevado índice de reatividade cruzada. IRC maior que 100 significa que o título do soro é mais alto com antígeno heterólogo do que com o próprio antígeno, possivelmente devido a diferenças na avidéz dos soros, reportado por MOREAU *et al.* (1977) com vírus da Febre Aftosa e por MARTINS & GIL TURNES (1994) com *Bordetella bronchiseptica*, e observado freqüentemente quando são utilizados soros policlonais.

Os resultados de IRC das vacinas comerciais sugerem que as cepas utilizadas nesses produtos não induzem proteção adequada frente a cepas de campo presentes no Rio Grande do Sul, o que confirma as observações em condições de campo.

Alguns dos camundongos utilizados neste trabalho apresentaram lesões de pele na parte inferior do corpo e membros 15 dias após receberem a segunda dose da vacina produzida a partir de cepas de campo. Na avaliação sorológica individual utilizando soros coletados no 56º dia de experimento, comprovou-se que estes animais apresentaram soroconversões 1,5 e 2,5 vezes superiores, respectivamente, aquelas obtidas pelo animal que apresentou menor soroconversão em seu grupo. Isto sugere que essas lesões podiam estar relacionadas a uma reação imunológica frente ao agente. Uma das complicações da Adenite Eqüina relatada por vários autores é a púrpura hemorrágica, um processo inflamatório imunomediado dos vasos, que ocorre em média quatro semanas após contato com *S. equi*. A enfermidade se caracteriza por edema e lesões de partes baixas do corpo e membros (PRESCOTT & WRIGHT, 2000), sinais similares aos encontrados nos animais de nosso trabalho.

Pode-se concluir neste trabalho que existem cepas atípicas (fermentadoras de sorbitol, trealose ou lactose) e com diferenças sorológicas de *S. equi* dentre as encontradas no Rio Grande do Sul. A adição de soro eqüino inativado no meio de cultura permite detectar cepas atípicas aqui caracterizadas.

Conclui-se também que as cepas utilizadas para fabricação de vacinas comerciais pertencem a sub grupos diferentes das cepas de campo da região,

apresentando baixo índice de reatividade cruzada para estas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZAI, T; TIMONEY, J.F; KUWAMOTO, Y; FUJITA, Y; WADA, R; INOUE, T. In vivo pathogenicity and resistance to phagocytosis of *Streptococcus equi* strains with different levels of capsule expression. **Veterinary Microbiology** n. 67, p. 277-286, 1999.

ARROWSMITH, A.E.M. A survey of Foot and Mouth Disease Virus type O strains from Far East. **Develop. Biol. Standard**. n.35, p.221-230, 1977.

BONNISTER, 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.

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

CODE OF FEDERAL REGULATIONS 9. Animals and animal products. **Standards requirements**, parte 1, seção 113, 1996. United States Government Printing Office, Washington.

CONCEIÇÃO, F,R. **Caracterização Antigênica e Molecular de Isolados de Moraxella bovis Recuperados em Surto de Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina Ocorridos entre 1974 e 2001 na Argentina, Brasil e Uruguai**, Pelotas, 2002. 96f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária, UFPel, 2002.

EUZÉBY, J.P. **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire**. Capturado em 28/01/2005. Disponível on-line: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/equi.html>

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.

GRANT, S.T.; EFSTRATION, A.; CHANTER, N. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. **Veterinary Record** v.133, p.215-216, 1993.

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

KOWALSKI, J.J. Mecanismo da Doença Infecçiosa. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro : Rio de Janeiro, 2000, p.54-56.

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

MARTINS, P.R.S., GIL TURNES, C.,. Antigenic relationships of isolates of *Bordetella bronchiseptica* from swine with atrophic rhinitis. **Revista de Microbiologia**. v.25, n.2, p.86-89, 1994.

MOREAU, Y., STELLMANN, C., BRUN, A., LOMBARD, M., MOUSSA, A.,. Classification des souches de virus Aphteux selon un modele parente dominance pour une meilleure comprehension du concept de sous type serologique et immunologique. **Development Biological Standardization**. n.35, p.195-203, 1977.

OLIVEIRA A.S., GIL TURNES C. Studies on the antigenic relationships of six

adherent isolates of *Bordetella bronchiseptica*. **Veterinary Microbiology**. n.18, p. 327-333.1988.

PRESCOTT, J; WRIGHT, T, B. Strangles in horses. 2000. **Ontario - Ministry of Agriculture and Food**. capturado em 08/08/2003. Disponível on-line <http://www.stranglesinhorse.html>.

SHILD, A.L. Infecção por *Streptococcus equi* . In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. Varela Editora e Livraria LTDA, São Paulo, 2001, p.265-269.

SWEENEY, C.R. *Streptococcus equi*. In: SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. Editora Manole LTDA, São Paulo, 1993, p.531-533.

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

TIMONEY, J.F; ARTIUSHIN, S.C; BOSCHWITZ, J.S. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-like proteins SeM and SzPSe. **Infection and Immunity**. n. 65, p. 3600-3605,1997.

CONCLUSÕES

1. Existem cepas atípicas de *S. equi* fermentadoras de sorbitol, trealose ou lactose no Rio Grande do Sul;
2. Existem cepas com diferenças sorologias dentre as encontradas no estado;
3. A adição de soro eqüino inativado ao meio de cultura permite detectar cepas atípicas de *S. equi*.
4. As cepas utilizadas para fabricação de vacinas comerciais pertencem a grupo sorológico diferente das cepas de campo da região;
5. As vacinas comerciais testadas apresentam baixo índice de reatividade cruzada para as cepas de campo isoladas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-GHAMDI, G.M.; KAPUR, V.; AMES, T.; TIMONEY, J.F.; LOVE, D.N.; MELLENCAMP, M.A. Use of repetitive sequence-based polymerase chain reaction for molecular epidemiologic analysis of *Streptococcus equi* subspecies *equi*. **American Journal in Veterinary Research**. v. 61, n. 6, p. 699-705, 2000.

ANDREI, E. **Compêndio Veterinário - Dicionário Brasileiro de Medicamentos Veterinários**. 32º Edição, Andrei Editora, São Paulo, 2002, p.699.

AINSWORTH, D.M.; BILLER, D.S. Sistema Respiratório. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina Interna Equina**. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p.229-230, 2000.

ANZAI, T; TIMONEY, J.F; KUWAMOTO, Y; FUJITA, Y; WADA, R; INOUE, T. In vivo pathogenicity and resistance to phagocytosis of *Streptococcus equi* strains with different levels of capsule expression. **Veterinary Microbiology** n. 67, p. 277-286, 1999.

ARROWSMITH, A.E.M.,. A survey of Foot and Mouth Disease Virus type O strains from Far East. **Development Biological Standardization**. 35, 221-230,

1977.

ARTIUSHIN, S.C.; TIMONEY, J.F.; SHEORANT, A.S.; MUTHUPALANI, S.K. Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE-H and SePE-I of *Streptococcus equi*. **Microbial Pathogenesis**. n. 32, p. 71-85, 2002.

BONNISTER, 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.

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

BISNO, A. L.; COLLINS, C.M.; TURNER, J.C. M protein of group C streptococci isolated from patients with acute pharyngitis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 34, n.10, p.2511-2515, 1996.

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

CHANTER, N.; WART C.L.; TALBOT, N.C.; FLANAGANT, J.A.; BINNS, M.; HOUGHTON, S.B.; SMITH, K.C.; MUNFORD, J.A. recombinant hialuronate associated protein as a protective immunogen against *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus* challenge in mice. **Microbial Pathogenesis**. n. 27, p. 133-143, 1999.

CHANTER, N.; TALBOT, N.C.; NEWTON, R.; HENSON, D.; VERHEYEN, K. *Streptococcus equi* with truncated M-proteins isolated from outwardly healthy horses. **Microbiology**. n. 146, p. 1361-1369, 2000.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS 9. Animals and animal products.

Standards requirements, parte 1, seção 113, 1996. United States Government Printing Office, Washington.

CNA, 2003. **Confederação da agricultura e pecuária do Brasil cria comissão para o setor de agronegócio do cavalo**. Capturado em: 10/02/2005. Disponível on-line <http://www.cna.org.br/AgropecuariaAgora/Agora03/aq297.htm>

CONCEIÇÃO, F.R. **Caracterização Antigênica e Molecular de Isolados de Moraxella bovis Recuperados em Surto de Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina Ocorridos entre 1974 e 2001 na Argentina, Brasil e Uruguai**, Pelotas, 2002. 96f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária, UFPel, 2002.

DOWNAR, J.; WILLEY, B.M.; SUTHERLAND, J.W.; MATHEW, K.; LOW, D.E. Streptococcal meningitis resulting from contact with an infected horse. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, n.6, p. 2338-2339, 2001

EUZÉBY, J.P. **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire**. Capturado em 28/01/2005. Disponível on-line: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/equi.html>

FLOCK, M.; JACOBSSON, K.; FRYKBERG, L.; HIRST, T.R.; FRANKLIN, A.; GUSS, B.; FLOCK, J.I. Recombinant *Streptococcus equi* proteins protect mice in challenge experiments and induce immune response in horses. **Infection and Immunity**.v.72, n.6, p. 3228-3236, 2004.

GALÁN, J.E.; TIMONEY, J.F. Immune complexes in purpura hemorrhagica of the horse contain IgA and M antigen of *Streptococcus equi*. **Journal of Immunology**. v 135, n. 5, p. 3134-3137, 1985.

GALÁN, J.E.; TIMONEY, J.F. Molecular analysis of the M protein of *Streptococcus equi* and cloning and expression of the M protein gene in

Escherichia coli . **Infection and Immunity**. v 55, n. 12, p. 3181-3187,1987.

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.

GRANT, S.T.; EFSTRATION, A.; CHANTER, N. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. **Veterinary Record** v.133, p.215-216, 1993.

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

HERBERT, K.S. Strangles Vaccine Report. 2001. **The Horse**. Capturado em 27/12/2004. disponível on-line <http://www.thehorse.com>

JACOBS, A. A., GOOVAERTS, D., NUIJTEN, P.J., THEELEN, R.P., HARTFORD, O.M., FOSTER, T.J. Investigations towards an efficacious and safe strangles vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated *Streptococcus equi*. **Veterinary Record**. v 20, n. 147, p. 563-567, 2000.

KAWATA, K.; ANZAI, T.; SENNA, K.; KIKUNCHI, N.; EZAWA, A.; TAKAHASHI, T. Simple and rapid PCR method for identification of streptococcal species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. **FEMS Microbiology Letters**. n. 237, p. 57-64, 2004.

KOL, A; LEVI, O; ELAD, D; STEINNAM, A. Complicated strangles: Two case reports and a literature review. **Israel Journal of Veterinary Medicine**. v.58, n 4, 2003. [http:// www.isrvma.org](http://www.isrvma.org).

KOWALSKI, J.J. Mecanismo da Doença Infecciosa. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro : Rio de Janeiro, 2000, p.54-56.

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

LANNERGARD, J.; FRYKBERG, L.; GUSS, B. CNE, a collagen-binding protein of *Streptococcus equi*. **FEMS Microbiology Letters** n. 222, p. 69-74, 2003.

LINDMARK, H.; GUSS, B. SFS, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus equi*, inhibits the binding between fibronectin and collagen. **Infection and Immunity**. v. 67, n. 5, p. 2383-2388, 1999.

LINDMARK, H.; NILSSON, M.; GUSS, B. Comparison of fibronectin-binding protein FNE from *Streptococcus equi* with FNZ from *S. equi* subspecies *zooepidemicus*, reveals a major and conserved difference. **Infection and Immunity**. v. 69, n. 5, p. 3159-3163, 2001.

MAY, J.P.; WALKER, C.A.; MASKELL, D.J.; SLATER, J.D. Development of an in vivo *Himar 1* transposon mutagenesis system for use in *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **FEMS Microbiology Letters** n.238, p. 401-409, 2004.

MARTINS, P.R.S., GIL TURNES, C. Antigenic relationships of isolates of *Bordetella bronchiseptica* from swine with atrophic rhinitis. **Revista de Microbiologia**. v.25, n.2, p.86-89, 1994.

MOREAU, Y., STELLMANN, C., BRUN, A., LOMBARD, M., MOUSSA, A., Classification des souches de virus Aphteux selon un modele parente dominance pour une meilleure comprehension du concept de sous type serologique et immunologique. **Development Biological Standardization**. n.35, 1977, p.195-203.

NALLY, J.E; ARTIUSHIN, S; SHEORAN, A S; BERNS, P.J; SIMON, B; GILLEY,

R.M; GIBSON, J; SULIVAN, S; TIMONEY, J.F. Induction of mucosal and systemic antibody specific for SeMF3 of *Streptococcus equi* by isobutirate based delivery system. **Vaccine** n.19, p. 492-497, 2001.

NEWTON, J.R.; WOOD, J.L.N.; DUNN, K.A. DE BRAWERE, M.N.; CHANTER, N. Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*. **Veterinary Record**. p. 84-90, 1997.

NICHOLSON, M, L.; FERDINAND, L.; SAMPSON, J.S.; BENIN, A.; BALTER, S.; PINTO, S.W.L.; DOWELL, S.F.; FACKLAM, R.R.; CARLONE, G.M.; BEALL, B. Analysis of immunoreactivity to a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* M-like protein to confirm an outbreak of post streptococcal glomerulonephritis, and sequences of M-like proteins from isolates obtained from different host species. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, n.11, p.4126-4130, 2000.

OLIVEIRA A.S., GIL TURNES C. Studies on the antigenic relationships of six adherent isolates of *Bordetella bronchiseptica*. **Veterinary Microbiology**. n.18, p. 327-333, 1988.

PRESCOTT, J.; WRIGHT, T, B. Strangles in horses. 2000. **Ontario - Ministry of Agriculture and Food**. capturado em 08/08/2003. Disponível on-line <http://www.stranglesinhorse.html>.

Pusterla, N.; Watson, J.L.; Affolter, V.K.; Magdesian, K.G.; Wilson, W.D.; Carlson, G.P. Purpura haemorrhagica in 53 horses. **Veterinary Record**. v.4, n.153, p.118-21, 2003.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Mosby, 1993, p 127-136.

SHEORAN, A.S.; SPONSELLER, B.T.; HOLMES, M A.; TIMONEY, J.F. Serum

and mucosal antibody isotype responses to M-like protein (SeM) of *Streptococcus equi* in convalescent and vaccinated horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology** n. 59, p. 239-251, 1997.

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

SCHILD, A.L. Infecção por *Streptococcus equi* . In: RIET-CORREA, F.; SHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. Varela Editora e Livraria LTDA, São Paulo, 2001, p.265-269.

SLATER, J.D. Strangles, bastard strangles, vives and glanders: archaeological relics in a genomic age. **Equine Veterinary Journal**. v.2, n. 35, p.118-120. 2003.

SWEENEY, C.R. *Streptococcus equi*. In: SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. Editora Manole LTDA, São Paulo, p.531-533, 1993.

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

TIMONEY, J.F.; ARTIUSHIN, S.C.; BOSCHWITZ, J.S. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-like proteins SeM and SzPSe. **Infection and Immunity**. n. 65, p. 3600-3605,1997.

TIMONEY, J.F.; ARTIUSHIN. Detection of *Streptococcus equi* in equine nasal swabs and washes by DNA amplification. **Veterinary Record** . n. 141, p. 446-447, 1997.

WALKER, J.A.; TIMONEY, J.F. Construction of a stable non-mucoid deletion

mutant of the *Streptococcus equi* Pinnacle vaccine strain. **Veterinary Microbiology** n. 89, p. 311-321, 2002.

YIGEZU L.M.; ROGER F.; KIREDJIAN, M.; TARIKU. S. Isolation of *Streptococcus equi* subspecies equi (strangles agent) from an Ethiopian camel. 1997. **Veterinary Record**. v. 23, n. 140, 608 p.