

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

ALAIS MARIA DALL AGNOL

**COMPARAÇÃO ENTRE ISOLAMENTO BACTERIANO E PCR
DE *Streptococcus suis* TIPO 2 DETECTADOS EM TONSILAS DE
SUÍNOS DE ABATE EM SANTA CATARINA**

LAGES, 2014

ALAIS MARIA DALL AGNOL

**COMPARAÇÃO ENTRE ISOLAMENTO BACTERIANO E PCR
DE *Streptococcus suis* TIPO 2 DETECTADOS EM TONSILAS DE
SUÍNOS DE ABATE EM SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Eliana Knackfuss Vaz

Co-orientador: Ubirajara M. da Costa

LAGES, SC

2014

D144c Dall Agnol, Alais Maria
Comparação entre isolamento bacteriano e PCR de
Streptococcus suis tipo 2 detectados em tonsilas
de suínos de abate em Santa Catarina / Alais Maria
Dall Agnol. - Lages, 2014.
61 p.: il.; 21 cm

Orientadora: Eliana Knackfuss Vaz
Coorientador: Ubirajara M. da Costa
Bibliografia: p. 42-50
Dissertação (mestrado) - Universidade do
Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2014.

1. Suínos. 2. *Streptococcus suis* tipo 2. 3.
Fator extracelular. 4. PCR. 5. Isolamento
bacteriano.

I. Dall Agnol, Alais Maria. II. Vaz, Eliana
Knackfuss. III. Universidade do Estado de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do
CAV/ UDESC

ALAIS MARIA DALL AGNOL

**COMPARAÇÃO ENTRE ISOLAMENTO BACTERIANO E PCR
DE *Streptococcus suis* TIPO 2 DETECTADOS EM TONSILAS DE
SUÍNOS DE ABATE EM SANTA CATARINA**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Ciência
Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: _____

Prof. Dra. Eliana Knackfuss Vaz
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: _____

Prof. Dra. Sandra Ferraz
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: _____

Dr. Álvaro Menin
Instituto de Pesquisa e Diagnóstico Veterinário

LAGES/SC, 26 DE FEVEREIRO DE 2014

Dedico este trabalho ao meu pai Luis, que no decorrer desta minha caminhada partiu. Porém seu exemplo de amor a vida e ao trabalho permanecem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por iluminar meu caminho e pelas pessoas maravilhosas que encontrei nesta caminhada.

A toda a minha família pelo amor e dedicação, principalmente meus pais Noeli e Luis (*in memoriam*), minha irmã Aline e meus avós, Josephina e Angelo, pelo apoio e incentivo, sempre estiveram presentes e confiantes nas minhas decisões.

A minha orientadora professora Eliana Vaz pela orientação, pelo exemplo de profissionalismo, pelas experiências trocadas e amizade.

Ao meu co-orientador professor Bira pela orientação, por não desanimar nos intermináveis PCR e exemplo de bom humor diário. A Fabiana Forell pela ajuda no experimento.

Ao laboratório Cedima e a professora Sandra pelo exemplo de profissionalismo e sátiras.

A todos os meus amigos e colegas. Em especial a Fernanda pelo convívio diário e seu jeito que tornava os momentos muito engraçados. Ao Stéfano pela amizade e brincadeiras criativas, que serviram para alegrar os meus dias. Ao Elvis e Ediane pelo grupo de estudos de biologia molecular, pelos finais de semana de estudo e gastronomia. Aos colegas de mestrado Sheyla, Francine, Juliana Almeida, Rodrigo, Caroline, Giane, Monica e Camila, pela amizade e incentivo. Ao João Zuffo por todo apoio dispensado.

A todos do laboratório, especialmente a Marcella, Karine, Aline, Guilherme e Thaís, em especial a minha bolsista Sara que não mediu esforços em auxiliar no experimento.

A família Melo que foi minha segunda família em Lages, em especial a dona Maria e a Renata.

As minhas amigas Aline Pasquali que mesmo distante e “fugindo” de mim sempre esteve presente, também Juliana, Taís, Lilian e Débora.

Enfim, a todos que colaboraram nesta importante etapa da minha vida.

“... É difícil compreender o rumo da vida em alguns momentos. Mas de uma coisa não se pode esquecer: nada é à toa. Às vezes, o melhor parece ser o pior, e o certo aparenta ser errado, mas tudo faz parte, tudo contribui ao crescimento e tem um por que. Viver vai muito além de explicações e ultrapassa todo e qualquer entendimento.”

Autor desconhecido

RESUMO

DALL AGNOL, ALAIS MARIA. **Comparação entre isolamento bacteriano e PCR de *Streptococcus suis* tipo 2 detectados em tonsilas de suínos de abate em Santa Catarina.** 2014. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de concentração: Microbiologia) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

Streptococcus suis é um patógeno responsável por muitas perdas produtivas e econômicas à suinocultura, além da importância zoonótica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de *Streptococcus suis* tipo 2 a partir de tonsilas de suínos sadios no abate, comparando a técnica de isolamento bacteriano com a PCR e determinar a presença do fator protéico extracelular (EF). Foram coletadas tonsilas de 302 suínos provenientes de três frigoríficos, o isolamento foi realizado em Agar Sangue Columbia, após foi realizada a caracterização fenotípica. Esses isolados foram tipificados através da PCR para confirmação do gênero e da espécie, além da presença do gene capsular (tipo 2). Na comparação das técnicas foi realizado PCR diretamente das tonsilas para o gene 16S rRNA (*S. suis*), capsular (tipo 2) e também foi realizada pesquisa do gene *ef* (EF). Utilizando PCR diretamente das tonsilas, *S. suis* foi detectado em 100% das amostras, diferindo do isolamento em que 84,1% das amostras foram positivas. Na confirmação dos isolados sugestivos de *S. suis*, quatro deles foram negativos na PCR para o gene 16S rRNA. Na comparação para o tipo 2 a PCR demonstrou maior sensibilidade, detectando em 89,7% das tonsilas superando o isolamento, que detectou em 88% dos isolados. O gene *ef* foi detectado em 28,4% das amostras, sendo que em três amostras foi detectado o *ef* variante. Houve diferença significativa entre a PCR e o isolamento bacteriano para *S. suis*, demonstrando que a técnica molecular tem uma maior capacidade de detecção do que o isolamento.

Palavras chave: Suínos. *Streptococcus suis* tipo 2. Fator extracelular. PCR. Isolamento bacteriano.

ABSTRACT

DALL AGNOL, ALAIS MARIA. **Comparison between bacterial isolation and PCR for detection of *Streptococcus suis* type 2 in swine tonsils at slaughter in Santa Catarina.** 2014. 61 f. Dissertation (MSc in Animal Science) – University of the State of Santa Catarina. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2014.

Streptococcus suis is a important pathogen associated to many production and economical losses in the swine industry, in addition to its zoonotic importance. The aims of this study was evaluate the occurrence of *Streptococcus suis* type 2 in tonsil samples of healthy pigs at slaughter, comparing the bacterial isolation with PCR assay and to determine the presence of the EF factor (extracellular protein factor). Tonsil samples from 302 slaughtered pigs were collected from three abattoir. Isolation of *S. suis* was made in Columbia Blood Agar Base, and then bacterial phenotypic characterization was made using biochemical assays. The typification genus and species of the isolates was performed with the PCR technique for confirmation, and the presence of the capsular gene (type 2). In the comparison between the techniques, PCR was made directly from the tonsil samples for the 16SrRNA gene (*S. suis*), capsular genes (type 2) and also the *ef* gene. The pathogen was detected in 100% of the samples with the PCR, whereas only 84.1% were positive on the isolation technique. Upon confirmation of the *S. suis* isolates, four of them were negative to the 16S rRNA gene. PCR demonstrated higher sensibility on detecting the type 2 *S. Suis*, having 89.7% of positive samples against 88% from the isolates. The *ef* gene was detected in 28.4% of the samples, three of them being detected as the *ef* variant. Significant difference was found between the PCR and bacterial isolation for *S. suis*, detection demons that the molecular assay has a higher detection capability than isolation.

Keywords: Swine. *Streptococcus suis* type 2. Extracellular Factor. PCR. Bacterial isolation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com Gel Red [®] demonstrando produtos amplificados de <i>S. suis</i> (294 pb), tipo 2 (459 pb) e fator EF (626 pb).	46
--	----

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Testes e resultados utilizados para identificação dos isolados como <i>S. suis</i>	41
Tabela 2. Nome, sequência e tamanhos de fragmento gerados a partir dos oligonucleotídeos utilizados para a reação de PCR.	42
Tabela 3. Resultado das amostras analisadas para <i>S. suis</i> , Tipo 2 e fator EF por isolamento e PCR do homogeneizado de tonsilas.	44
Tabela 4. Resultado das amostras analisadas por frigoríficos para <i>S. suis</i> por isolamento e PCR do homogeneizado de tonsilas.	45
Tabela 5. Resultado das amostras analisadas por frigoríficos para Tipo 2 por isolamento e PCR do homogeneizado de tonsilas.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossômico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
EF	Fator protéico extracelular
min	Minuto
s	Segundo
CPS	Cápsula
MRP	Muramidase released protein
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CEDIMA	Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
pb	Pares de base
RAPD	Random Polimorphic Amplified DNA
CD4	Cluster of Differentiation Action 4
CD8	Cluster of Differentiation Action 8

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micras
kda	Quilodaltons
mL	Mililitro
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius
pmol	Picomol
μL	Microlitro
X	Veze
U	Unidade
ng	Nanograma
mM	Milimolar
μM	Micromolar
%	Porcentagem
X^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 ETIOLOGIA	27
2.2 EPIDEMIOLOGIA	28
2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA	29
2.3.1 Polissacarídeo Capsular (CPS)	30
2.3.2 Muramidase Released Protein (MRP) e Fator Protéico Extracelular (EF)	30
2.3.3 Suilisina	31
2.3.4 Adesinas	32
2.4 PATOGENIA	33
2.5 SINAIS CLÍNICOS E LESÕES	34
2.6 DIAGNÓSTICO	35
2.7 TRATAMENTO	36
2.8 CONTROLE.....	36
2.9 INFECÇÃO EM HUMANOS.....	37
3 ARTIGO	38
COMPARAÇÃO ENTRE ISOLAMENTO BACTERIANO E PCR DE <i>S. suis</i> TIPO 2 EF⁺ DETECTADOS EM TONSILAS DE SUÍNOS	38
CONPARISON BETWEEN BACTERIAL ISOLATION AND PCR FOR DETECTION OF <i>S. suis</i> TYPE 2 EF⁺ IN SWINE TONSILS	38
RESUMO	38
ABSTRACT	39
3.1 INTRODUÇÃO.....	39
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.2.1 Animais e coletas das amostras	40
3.2.2 Isolamento bacteriano e identificação	41
3.2.4 Extração de DNA	42
3.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase	42
3.2.5 Amplificação dos genes por PCR	42
3.2.6 Análise Estatística	43
3.3 RESULTADOS	44

3.4 DISCUSSÃO.....	46
3.5 CONCLUSÃO.....	47
3.6 AGRADECIMENTO	48
3.7 REFERÊNCIAS	48
4 REFERÊNCIAS DISSERTAÇÃO	53

1 INTRODUÇÃO

Dentre a variedade de carnes consumidas, a suína destaca-se por ser a mais consumida mundialmente, e consequentemente mais produzida (BeefPoint, 2013). Nesse contexto a suinocultura tem uma significativa importância para a economia mundial. Essa atividade no Brasil, a exemplo de outras cadeias produtivas do agronegócio, cresceu significativamente nos últimos anos. O rebanho nacional vem a cada ano sofrendo variações no número de animais, no entanto o rebanho industrial segue um constante crescimento. No ano de 2011 alcançou um total de 2,4 milhões de matrizes alojadas. A produção de carne suína atingiu a marca dos 3,49 milhões de toneladas em 2012, aumentando 2,5% comparada ao ano anterior (Suinocultura Industrial, 2012). E as exportações corresponderam a 581.477 toneladas, tendo um aumento de 12,6%. Além disso, o consumo per capita interno aumentou em 3,5 kg entre os anos de 2005 a 2011, em que o consumo atingiu 15,1 kg (ABIPECS, 2012).

A suinocultura do estado de Santa Catarina é a mais expressiva do país. Sendo responsável por 25% da produção nacional (ACCS, 2008) e 36% das exportações (ACCS, 2012). Essa alta participação nas exportações se deve principalmente ao status sanitário do estado, que é livre de febre aftosa sem vacinação, livre de Peste Suína Clássica e erradicou a Doença de Aujeszky (ACCS, 2008).

A consolidação do estado e do Brasil como grande produtor e exportador de carne suína estão diretamente ligados ao uso de tecnologias modernas, melhores índices de produtividade e qualidade do produto, bem como à adequação às exigências dos diferentes mercados importadores. No entanto, com essas modificações tecnológicas, houve uma maior concentração dos animais levando a predisposição ao estresse, o que propiciou a ocorrência de diversas enfermidades. Muitas doenças que não eram relevantes passaram a ter destaque na suinocultura moderna, constituindo-se em um grande problema, pois se mantêm apesar dos esforços de técnicos e pesquisadores ligados à suinocultura.

Mesmo que sejam consideradas totalmente conhecidas, algumas enfermidades são recorrentes e exigem vigilância constante e ininterrupta. Dentre os micro-organismos que causam prejuízos destaca-se o *Streptococcus suis*. Este patógeno é considerado emergente mundialmente, tem sido isolado em diversos países, causando prejuízos econômicos e produtivos, devido à mortalidade e aos gastos com

animais enfermos que podem chegar a milhões de dólares. Rebanhos com altos níveis sanitários e de produtividade também podem ser afetados, pois com a tecnificação das granjas ocorre o aumento da circulação de veículos, pessoas e o aumento da densidade de animais levando a uma maior disseminação do agente por aerossóis. Outro fator de destaque é sua importância como zoonose ocupacional, podendo afetar produtores de suínos, manipuladores de carne suína, médicos veterinários e até consumidores de carne crua.

Devido aos prejuízos que esse patógeno causa se faz necessário o uso de técnicas que ofereçam um diagnóstico rápido e preciso do agente. O método diagnóstico mais utilizado é o isolamento bacteriano, que oferece vantagens como obtenção do agente viável que pode ser usado para realização de outros testes fenotípicos, como o antibiograma, que auxilia no tratamento e controle dos animais doentes. Porém técnicas moleculares podem ser mais eficazes, como a PCR que é considerada mais rápida, sensível e específica, e também possui a vantagem da manipulação ser apenas do material genético e não do agente viável, o que reduz o risco de contaminação laboratorial.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a ocorrência de *Streptococcus suis* tipo 2 em tonsilas de suínos sadios no abate, comparando a técnica de isolamento bacteriano com a reação em cadeia da polimerase (PCR) e determinar a presença do fator EF e suas variantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Streptococcus suis (*S. suis*) é um patógeno responsável por grandes perdas produtivas e econômicas à suinocultura, devido a alterações como meningite, pneumonia e artrite, levando a diminuição do ganho de peso, morbidade, mortalidade e gastos com tratamento (RIVA *et al.*, 2008). Esse micro-organismo é prevalente no Brasil e no mundo, sendo a distribuição dos tipos capsulares variável em diferentes regiões, porém o tipo 2 é mais isolado (HIGGINS; GOTTSCHALK, 1999; PAGNANI *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2005).

2.1 ETIOLOGIA

O gênero *Streptococcus* sp. caracteriza-se pela morfologia de cocos Gram positivos, com aproximadamente 1 µm de diâmetro e na visualização ao microscópio se apresenta forma de cadeias de diferentes tamanhos. São catalase negativa, anaeróbicos facultativos e imóveis. Esse micro-organismo é fastidioso e necessita da adição de sangue ao meio de cultura para seu crescimento. O gênero *S. suis* possui como características para diferenciação de outras espécies do gênero, o tipo de hemólise, agrupamento de Lancefield e testes bioquímicos. A hemólise observada em agar sangue é geralmente alfa e ocasionalmente beta. O agrupamento de Lancefield é um teste sorológico baseado na presença do componente C grupo-específica, um polissacarídeo presente na parede celular da bactéria, o qual divide o gênero de A a G, sendo o *S. suis* pertencente ao grupo D de Lancefield. Esta classificação também pode ser feita por testes bioquímicos como fermentação de açúcares (QUINN *et al.*, 2005).

S. suis tem distribuição mundial e é dividido em 35 tipos com base no polissacarídeo capsular, descritos de 1 ao 34 e 1/2 (HIGGINS; GOTTSCHALK, 1999). Ao longo dos anos foram descritos todos os tipos, sendo que do tipo 3 ao 8 foram detectados em suínos mortos (PERCH; PEDERSEN; HENRICHSEN, 1983). Os tipos 23 ao 28 foram descritos por Gottschalk *et al.* (1991) todos isolados de suínos com sinais clínicos de meningite, pneumonia e septicemia. Posteriormente Higgins *et al.* (1995) relatou os últimos tipos descobertos, sendo classificados do 29 ao 34. Os tipos 29, 30, 32 e 34 foram isolados de suínos doentes, já o 31 foi isolado de um bezerro e o 33 de um cordeiro.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

As manifestações da doença geralmente ocorrem quando um suíno susceptível entra em contato com o micro-organismo eliminado de um portador. No entanto diversos fatores podem favorecer o aparecimento dos sinais clínicos como estresse, mistura de animais de diversas origens, mudanças bruscas de temperatura (mais de 6°C no mesmo dia), superlotação, pouca ventilação, suínos com diferentes idades numa mesma sala, fluxo contínuo de animais, o que impede o manejo de vazio sanitário (HIGGINS; GOTTSCHALK, 1999; GOTTSCHALK; KOBISCH; BERTHELOT-HÉRAULT, 2001; SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007). Doenças como salmonelose, circovirose, síndrome da reprodutiva e respiratória dos suínos e pleuropneumonia suína são consideradas fatores predisponentes para a manifestação da doença (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

As tonsilas de suínos podem ser colonizadas por uma ampla microbiota e frequentemente esses locais podem carregar assintomaticamente bactérias patogênicas, dentre esses patógenos o *S. suis* é encontrado fazendo parte da microbiota de animais sadios (MAROIS *et al.*, 2007; LOWE *et al.*, 2011). As tonsilas tornam-se colonizadas em até 24 horas após o nascimento (AMASS; CLARK; WU, 1995). O *S. suis* pode localizar-se no trato respiratório superior (FLORES *et al.*, 1993) e também pode ser encontrado em secreções vaginais de fêmeas (AMASS *et al.*, 1996), fezes, saliva e possivelmente no leite de fêmeas suínas (AMASS; CLARK; WU, 1995). Esse agente pode ser considerado como o principal micro-organismo isolado de tonsilas, sendo que O'Sullivan *et al.* (2011) identificou o *S. suis* como a bactéria mais frequente em tonsilas, correspondendo a 53%.

A prevalência desses tipos capsulares é variável em diferentes regiões, porém o tipo 2 é o mais prevalente no mundo (HIGGINS; GOTTSCHALK, 1999) e no Brasil (PAGNANI *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2005). Segundo Costa *et al.* (2005) o tipo 2 é o mais prevalente sendo isolado em 38% dos casos, seguido do tipo 14, 9, 7, 11, 8, 1, 1/2, 3, 5, 6 e 10. Já no trabalho de Pagnani *et al.* (2002) a porcentagem de isolados do tipo 2 é maior, cerca de 50%, seguido dos tipos 3, 7, 1 e 14. Os isolados do tipo 2 foram submetidas ao teste RAPD (Random Polimorphic Amplified DNA), em que foi observada a distribuição clonal, remetendo a possibilidade de haver um ancestral comum a todas as amostras, mesmo que a distância entre a origem das amostras fossem superior a 300 km. A prevalência do *S. suis* tipo 2 em animais sadios é

baixa (HIGGINS; GOTTSCHALK, 1999), sendo observada a prevalência de 10,2% por Bosco *et al.* (2000), 23% por Faria *et al.* (2010) e 27% Lara *et al.* (2007).

A transmissão do *S. suis* não é bem elucidada, mas os leitões podem se infectar logo após o nascimento e até mesmo durante o parto, devido ao contato com as bactérias das secreções vaginais da porca (AMASS, CLARK; WU, 1995; AMASS *et al.*, 1996; CLOUTIER *et al.*, 2003). Quando os sinais clínicos são observados na maternidade a transmissão local é essencialmente horizontal. Para o tipo 2 a transmissão pode ocorrer pelo ar ou contato direto focinho-focinho (GOTTSCHALK; KOBISCH; BERTHELOT-HÉRAULT, 2001). A transmissão entre rebanhos geralmente ocorre por movimentação de suínos portadores, que são introduzidos em um rebanho não infectado, resultando no desencadeamento da doença. A transmissão também pode ocorrer com a ajuda de vetores (moscas) e fômites (HIGGINS; GOTTSCHALK, 1999).

A sobrevivência do *S. suis* em tecidos e fluidos de suínos pode perdurar por 10 dias a 4°C, nas fezes por 104 dias a 0°C, 10 dias a 8°C, ou oito dias a 25°C. Na poeira por 54 dias a 0°C ou 25 dias a 90°C. Além disso, pode sobreviver e se multiplicar no hidróxido de alumínio (adjuvantes de vacinas). É inativado por desinfetantes como hipoclorito, iodo, clorexidina, formaldeído, amônia quaternária e fenóis, contudo é resistente ao álcool 70% (SANTOS; BARCELLOS, 2012).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fatores de virulência relacionados às diversas cepas de *S. suis* estão relacionadas com a presença ou ausência de cápsula, pela superfície exposta e proteínas secretadas (VECHT *et al.*, 1992). Juntamente com as condições ambientais, porta de entrada e imunidade do hospedeiro determinará a severidade da doença (TIMONEY, 2004; HIGGINS; GOTTSCHALK, 1999). Cepas de um mesmo sorotipo não necessariamente possuem o mesmo perfil de virulência. Segundo Staats *et al.* (1998) a heterogenicidade de ribotipos determina isolados altamente virulentos, moderadamente virulentos ou então avirulentos estudados no sorotipo 2. Os fatores de virulência ainda não estão totalmente esclarecidos, porém os principais são o polissacarídeo capsular (CPS), proteínas relacionadas com a virulência como a MRP (muramidase released protein) e o fator EF (fator protéico extracelular),

hemolisinas ou suilisininas e adesinas (GOTTSCHALK; SEGURA, 2000; TIMONEY, 2004).

2.3.1 Polissacarídeo Capsular (CPS)

O polissacarídeo capsular (CPS) é composto de cinco açúcares, o ácido siálico, glicose, galactose, N-acetilglicosamida e ramnose. Com base nessas variações sorológicas existem 35 sorotipos capsulares. O ácido siálico é responsável pela ação antifagocitária, pois bloqueia a deposição do C3 e ativa a via alternativa do complemento. Pode também auxiliar na sobrevivência intracelular em fagócitos e na adesão (TIMONEY, 2004). A cápsula de polissacarídeo protege *S. suis* da fagocitose por neutrófilos. Com isso a presença de IgG específica contra *S. suis* tipo 2 promove morte por neutrófilos, indicando que a indução de uma forte resposta humoral é benéfica para o controle do patógeno (CHABOT-ROY *et al.*, 2006).

Para testar a importância da cápsula para a patogenicidade, Charland *et al.* (1998) utilizaram isolados acapsulados, com isso levou ao aumento da hidrofobicidade induzindo a fagocitose por macrófagos e monócitos de suínos, demonstrando a importância da cápsula para a virulência do micro-organismo. Smith *et al.* (1999 b) além do aumento da fagocitose demonstraram que as cepas não encapsuladas são totalmente avirulentas. No entanto a cápsula não é o único fator, pois cepas encapsuladas avirulentas podem ser eliminadas da corrente sanguínea em 48 horas, já outras virulentas permanecem por até cinco dias, sugerindo a necessidade de outros fatores de virulência. Os anticorpos capsulares protegem parcialmente contra a infecção e em animais convalescentes se encontram em títulos baixos (GOTTSCHALK; SEGURA, 2000).

2.3.2 Muramidase Released Protein (MRP) e Fator Protéico Extracelular (EF)

A muramidase released protein (MRP) é uma proteína de superfície de 136 kDa e o fator protéico extracelular (EF) é uma proteína secretada no interior da célula com 110 kDa (VECHT *et al.*, 1991). A MRP é liberada pela digestão da muramidase da parede celular de bactérias Gram positivas. A função dessa proteína não é conhecida, no entanto a perda do gene que codifica esse fator não diminui a virulência em suínos jovens. O fator EF também não tem função

conhecida. Tanto a MRS e o EF não são fatores de virulência essenciais para a patogênese, porém quando associados são positivamente correlacionados e juntamente com a suilisina tornam os isolados altamente virulentos (TIMONEY, 2004).

As cepas de *S. suis* segundo o experimento de Vecht *et al.* (1991) podem ser classificadas quanto ao fenótipo em MRP⁺ EF⁺, MRP⁺ EF⁻ e MRP⁻ EF⁻, não foram encontrados cepas MRP⁻ EF⁺. Dos isolados de animais doentes 80% apresentava MRP⁺ EF⁺, de animais sadios 86% possuíam fenótipo MRP⁻ EF⁻, e de isolados humanos apenas 15% eram MRP⁺ EF⁺. O fenótipo MRP⁺ EF⁻ prevaleceu em 74% das cepas humanas e 12% das cepas suínas, demonstrando assim que esses fatores de virulência possuem significância variada entre humanos e suínos. Porém o fator EF possui menor significância em humanos que em suínos.

A presença dos genes que codificam os fatores de virulência geralmente é baixa em isolados de *S. suis* tipo 2 de suínos sadios. No entanto, de animais clinicamente afetados, pode ser alta chegando a frequência de 80% para o gene que codifica a proteína MRP, 72% para o fator EF, 67% para suilisina e 20% para o gene *ef* variante. O genótipo MRP⁺ EF⁺ suilisina⁺ foi observado em 40% das amostras, seguido de EF variante⁺ MRP⁺ suilisina⁺ em 20%, EF⁺ MRP⁺ suilisina⁻ em 16,5%, EF⁺ MRP⁻ suilisina⁻ em 10,5%, EF⁺ MRP⁻ suilisina⁺ e EF⁻ MRP⁻ suilisina⁻ em 4,5%, EF⁻ MRP⁺ suilisina⁺ em 2,3% e EF⁻ MRP⁺ suilisina⁻ em 0,8% (CALDERARO *et al.*, 2004). Porém em suínos sadios a presença desses fatores é baixa, cerca de 1,4% para o fator EF (FARIA *et al.*, 2010).

Isolados de *S. suis* tipo 2 com fenótipo MRP⁺ EF⁺ quando inoculados em suínos livres de patógenos específicos induziram a sinais clínicos e patológicos específicos da doença (desordens neurológicas e claudicação), além do aumento de células polimorfonucleares. Nestes animais foram observadas as seguintes lesões poliartrite, meningoencefalite e poliserosite. O fenótipo MRP⁺ EF⁺ induziu a sinais clínicos inespecíficos, como apatia, falta de apetite e febre. Já no fenótipo MRP⁻ EF⁻ não induziu nenhuma alteração. Concluindo que cepas produtoras de MRP e EF são patogênicas para suínos (VECHT *et al.*, 1992).

2.3.3 Suilisina

A suilisina é uma hemolisina com 64 kDa, tiol ativada, termolábil e possui homologia com a pneumolisina, estreptolisina S e

listeriolisina. Essas toxinas produzem poros transmembranares nas células alvos, porém não é essencial para a patogênese, pois nem todas as cepas patogênicas a produzem (JACOBS *et al.*, 1994; TIMONEY *et al.*, 2004). Essa hemolisina pode ser responsável pela hemólise observada nos isolados de *S. suis* e é inativada na presença de colesterol livre (GOTTSCHALK; LACOUTURE; DUBREUIL, 1995). Os isolados de *S. suis* tipo 2 positivos para a suilisina, juntamente com os sinais clínicos, macroscópicos e histopatológicos observados foram classificados como altamente virulentos por STAATS *et al.* (1998).

Suilisina é tóxica para os neutrófilos e pode contribuir para o *S. suis* evadir da imunidade inata. Contudo, essa toxina parece afetar a morte do micro-organismo pelo sistema complemento, impedindo a opsonização e consequentemente dificultando a fagocitose pelos neutrófilos (CHABOT-ROY *et al.*, 2006). Charland *et al.* (2000) avaliaram as injúrias provocadas por cepas de *S. suis* tipo 2, em que as lesões celulares foram provocadas pela suilisina. As cepas produtoras dessa hemolisina usam a aderência e a produção de suilisina para lesionar as células da barreira hematoencefálica. Dessa maneira a bactéria não invade diretamente as células, possibilitando a continuação da circulação pelo sistema nervoso central.

2.3.4 Adesinas

Adesinas possuem 18 kDa, são sequência de dissacarídeos Gal α 1-4Gal, presente na superfície glicolípídica das células de muitos isolados. Essas adesinas são recobertas por uma cápsula, interferindo na atividade do sistema imune (TIMONEY, 2004). A ligação dissacarídica é específica, sendo responsável pela propriedade de hemaglutinação do *S. suis*. Adesinas são divididas de acordo com suas especificidades em dois subtipos PN e PO, o subtipo PO é inibida apenas pela galactose, enquanto o subtipo PN é inibido por galactose e também N-acetilgalactosamina (GOTTSCHALK; SEGURA, 2000).

Os estudos realizados sobre os fatores de virulência ainda não esclareceram de forma clara a patogênese desse micro-organismo. No entanto, pode-se afirmar que a presença de MRP, EF e do suilisina em isolados europeus representa virulência potencial. Contrariamente, a ausência de uma ou mais destas proteínas em isolados não pode ser automaticamente associada a uma falta de virulência. Cepas isoladas na América do Norte MRP⁺, EF⁺ e suilisina negativas podem ser consideradas virulentas, porém menos virulentas quando comparadas

com cepas européias que possuem MRP⁺, EF⁺ e suilisina positivas (GOTTSCHALK; SEGURA, 2000).

2.4 PATOGENIA

O micro-organismo possui como porta de entrada a via oral e se localiza nas tonsilas palatinas, logo ocorre uma resposta imune inata envolvendo neutrófilos, macrófagos e células epiteliais, além de uma resposta de linfócitos B e linfócitos CD4 e CD8, limitando a bactéria nesse local, mas podendo levar a uma infecção persistente (TIMONEY, 2004). Não é conhecido como *S. suis*, apesar da baixa quantidade na superfície das mucosas, é capaz de atravessar a primeira linha de defesa do hospedeiro para iniciar a doença. Sendo necessário que as bactérias sejam capazes de romper epitélios da mucosa no trato respiratório superior (GOTTSCHALK; SEGURA; XU, 2007). A bactéria atinge a corrente sanguínea, acredita-se que seja devido ao estresse que compromete a imunidade local ou então ao início da expressão dos fatores de virulência que auxilia para evasão ao sistema imune e se localizar nos linfonodos mandibulares. Em seguida ocorrem bacteremia e septicemia, e depósito da bactéria em articulações, meninges e pulmão. No entanto, não é esclarecido como o *S. suis* chega às meninges, talvez livre no plasma ou internalizado em fagócitos. A liberação da toxina hemolítica suilisina pode danificar o local, facilitando a translocação para o tecido adjacente. Ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que resultam na adesão celular na superfície da célula endotelial com aumento transmigração de leucócitos carreadores de bactéria. Assim os micro-organismos são depositados abaixo da superfície do tecido cerebral (TIMONEY, 2004).

A sobrevivência do micro-organismo na corrente sanguínea pode ser facilitada pela cápsula, que dificulta a fagocitose. Primeiramente foi proposta a teoria chamada de cavalo de tróia, sugerindo que as bactérias são internalizadas pelos monócitos (na ausência de anticorpos específicos), sobrevivem intracelularmente e depois invadem o sistema nervoso central (WILLIAMS, 1990). Outra teoria estudada é que as bactérias são transportadas extracelularmente, livres na circulação ou ligadas a superfície de macrófago (SEGURA; GOTTSCHALK, 2002). No entanto é importante ressaltar que os neutrófilos e monócitos não são capazes de eliminar *S. suis*, na ausência de anticorpos específicos (CHABOT-ROY *et al.*, 2006).

Se *S. suis* não causar uma septicemia aguda fatal, as bactérias são capazes de atingir o sistema nervoso central através mecanismos que são apenas parcialmente elucidados, tais como adesão, com ou sem toxicidade, e invasão de células microvasculares endoteliais cerebrais juntamente com as células epiteliais do plexo coróide, que constituem a base estrutural da barreira hematoencefálica. Também foi demonstrado que *S. suis* afeta a função e integridade da barreira. A apoptose pode estar envolvida no processo de necrose das células da barreira hematoencefálica. Estes e outros mecanismos provavelmente facilitam a invasão do sistema nervoso central (GOTTSCHALK; SEGURA; XU, 2007)

2.5 SINAIS CLÍNICOS E LESÕES

Os leitões são acometidos principalmente entre cinco a 10 semanas de idade. Nos leitões lactentes, na primeira semana de vida, inicialmente observa-se apatia, seguida de diarreia, febre, cerdas arrepiadas e ocasionalmente vômitos. Após observa-se artrite purulenta, com articulações inchadas e doloridas, tremores musculares e hipersensibilidade ao toque. A doença pode acometer até 2/3 da leitogada, sendo rara a recuperação dos leitões. Pode ocorrer septicemia e com evolução rápida levando a morte. A incubação do *S. suis* em leitões pós desmame pode prolongar por até duas semanas, sendo observado anorexia, febre, hiperemia da pele, tremores musculares, incoordenação, perda do equilíbrio, decúbito lateral, movimentos de pedagem, opistótono e convulsões. Pode observar cegueira, artrite, claudicações, ataxia e paralisia. Depois do aparecimento de sinais nervosos a morte pode ocorrer em até quatro horas. Na forma superaguda, os suínos aparecem mortos, sem a observação de sinais clínicos (SANTOS; BARCELLOS, 2012).

Os sinais clínicos observados por Reams *et al.* (1994) foram relacionados com a doença respiratória ou neurológica, mas nunca as duas formas. Suínos com sinais respiratórios possuíam broncopneumonia supurativa e/ou pleurite, mas sem sinais neurológicos. Suínos que possuíam sinais neurológicos raramente apresentavam lesões pulmonares. Foram observadas inflamação supurativa ou fibrinopurulenta. É importante ressaltar que achados histopatológicos não variam conforme o sorotipo.

Além da broncopneumonia supurativa e meningite ou encefalite neutrofílica, também pode ser observada epicardite fibrinopurulenta ou

supurativa. Quando há pneumonia intersticial considera-se uma lesão secundária a septicemia e podem ocorrer lesões vasculares. Raros casos de pneumonia fibrinohemorrágica e necrose septal podem ser observados. Lesões incomuns ocorrem como miocardite hemorrágica e necrosante, meningoencefalite subaguda e meningoencefalomielite (HIGGINS; GOTTSCHALK, 1999).

Otite interna exsudativa foi observada em aproximadamente 70% dos suínos afetados por leptomeningite. As lesões encontradas foram principalmente nos ductos perilinfáticos, com envolvimento da escala timpânica. Perineurite do nervo vestibulococlear foi visto em alguns casos de otite interna. E otite média foi diagnosticada em 34% dos animais, entretanto não atingiu o ouvido médio (MADSEN *et al.*, 2001).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico presuntivo pode ser realizado pelo histórico, sinais clínicos e lesões encontradas em suínos necropsiados. No entanto, isolamento bacteriano a partir de suabes de meninges ou de líquido cefalorraquidiano e histopatológico de fragmentos de encéfalo, incluindo as meninges, são indispensáveis para confirmação do diagnóstico. O líquido cefalorraquidiano é importante para isolamento do *S. suis*, principalmente nos casos agudos que possuem sinais nervosos. Suínos portadores assintomáticos podem ser identificados a partir de suabes ou colheita de fragmentos de tonsilas (RIVA *et al.*, 2008).

Para detecção de *S. suis* de suínos saudáveis portadores, podem ser utilizados o isolamento bacteriano ou técnicas tanto monoplex quanto multiplex de reação em cadeia da polimerase, para tipificação desse agente. Essas técnicas podem contribuir para identificação da origem e também monitoração da cinética da infecção (MAROIS *et al.*, 2007).

A técnica PCR é mais rápida para diagnóstico do *S. suis* quando comparada ao isolamento bacteriano tradicional, podendo ser utilizada para detecção de suínos saudáveis que carregam a bactéria, favorecendo estudos de epidemiologia, transmissão e também possibilitando medidas de controle e erradicação do mesmo (SMITH *et al.* 1999 a, c; OKWUMABUA; O'CONNOR; SHULL, 2003). Essa técnica molecular é considerada além de mais rápida, também altamente sensível e específica (SMITH *et al.*, 1999 c).

Condizendo com os autores anteriores, Wisselink, Joosten e Smith (2002) afirmam que PCR é mais sensível que o exame bacteriológico, pois em seu experimento, 6% das amostras positivas para *S. suis* pela técnica molecular foram negativas no exame bacteriológico. Marois *et al.* (2007) comparando isolamento com PCR multiplex para o tipo 2 e 1/2 percebeu que essa é mais sensível que o método tradicional. Também Swildens *et al.* (2005) utilizou a técnica molecular por ser mais sensível e específica para pesquisa de *S. suis* tipo 2 EF⁺, a partir de suabes de tonsilas.

2.7 TRATAMENTO

O tratamento para suínos doentes pode ser feito com anti-inflamatórios, hidratação e antimicrobianos, principalmente com β -lactâmicos como a amoxicilina, por via parenteral. Essa droga atinge níveis elevados, tendo assim boa atividade contra *S. suis*, o ceftiofur e florfenicol também podem ser utilizados (GOTTSCHALK, 2009). Os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos demonstram-se eficazes nos testes laboratoriais de sensibilidade, no entanto dentro dessa classe a Penicilina G comportou-se de forma diferente tendo a sensibilidade reduzida, quando comparada com outros fármacos da mesma categoria. Com isso se ressalta a importância de monitoração da resistência ou sensibilidade, pois a Penicilina G é o principal antimicrobiano utilizado no tratamento em suínos e humanos (MARIE *et al.*, 2002). A classe das tetraciclina também deve ser utilizada com cuidado, pois possui facilidade de tornar-se resistente, principalmente o tipo 2 (GOTTSCHALK, 2009).

2.8 CONTROLE

O controle deve consistir em reparação nas falhas de manejo que favorecem estresse aos animais, como diminuição da superlotação e misturas de animais com diferentes idades. Medidas como manejo todos dentro - todos fora, controlar temperatura e umidade do ar, e práticas de manejo que reduzam o acúmulo de micro-organismos, melhorando o estado de saúde, ganho de peso e conversão alimentar, pode diminuir a expressão doença. Também pode ser utilizadas medicações de forma preventiva, como antimicrobianos com boa biodisponibilidade, facilidade de administração (via água ou ração) e que atinjam elevadas concentrações plasmáticas, sendo recomendadas as penicilinas e

amoxicilina. Vacinas autógenas podem ser utilizadas como imunoprofilaxia, no entanto a eficácia não é completa, sendo que em muitos rebanhos ainda os resultados são insatisfatórios (HIGGINS; GOTTSCHALK, 1999).

2.9 INFECÇÃO EM HUMANOS

Infecção por *S. suis* é uma doença relatada mundialmente, já foi descrita nos Estados Unidos, Canadá, Brasil, Europa, Ásia, Austrália e Nova Zelândia. O *S.suis* tipo 2 é considerado o mais patogênico tanto para suínos quanto para humanos. Esse agente pode ser isolado de outros animais como cães, gatos, equinos e ruminantes. A doença é considerada endêmica no sudoeste da Ásia onde ocorreram diversos surtos, devido à alta densidade de suínos, abate sem acompanhamento veterinário e ao consumo de carne suína levemente cozida ou até mesmo crua (WERTHEIM *et al.*, 2009).

A forma de transmissão para humanos é por via cutânea, quando possuírem lesões na pele durante o manejo de suínos, assim ocorrendo à entrada do micro-organismo. Há relatos de contaminação por ingestão de linguiças suínas contaminadas pelo patógeno e até pela manipulação de carcaças em frigoríficos. As infecções ocorrem pelo *S. suis* tipo 2, geralmente acometem pessoas que tem relação com a suinocultura, como trabalhadores ou produtores de suínos, médicos veterinários e pessoas que trabalham em frigoríficos (RIVA *et al.*, 2008).

Em humanos as manifestações clínicas mais frequentes são meningite e septicemia, como seqüela também pode ocorrer perda da audição, reversível ou não. A meningite é acompanhada por sintomas como febre, cefaleia, vômitos e sinais nervosos, sendo que parte dos pacientes podem ter sinais cutâneos como petéquias, bolhas hemorrágicas e necrose da pele. A doença pode possuir duração de dois a cinco dias. Manifestações menos comuns podem aparecer como endocardite aguda e subaguda, artrite piogênica, endoftalmite e uveíte. A ocorrência de septicemia é comum, levando ao choque tóxico e alta mortalidade (WERTHEIM *et al.*, 2009).

3 ARTIGO

COMPARAÇÃO ENTRE ISOLAMENTO BACTERIANO E PCR DE *S. suis* TIPO 2 EF⁺ DETECTADOS EM TONSILAS DE SUÍNOS

COMPARISON BETWEEN BACTERIAL ISOLATION AND PCR FOR DETECTION OF *S. suis* TYPE 2 EF⁺ IN SWINE TONSILS

RESUMO

Streptococcus suis é um patógeno responsável por muitas perdas produtivas e econômicas à suinocultura, além da importância zoonótica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de *Streptococcus suis* tipo 2 a partir de tonsilas de suínos sadios no abate, comparando a técnica de isolamento bacteriano com a PCR e determinar a presença do fator protéico extracelular (EF). Foram coletadas tonsilas de 302 suínos provenientes de três frigoríficos, o isolamento foi realizado em Agar Sangue Columbia, após foi realizada a caracterização fenotípica. Esses isolados foram tipificados através da PCR para confirmação do gênero e da espécie, além da presença do gene capsular (tipo 2). Na comparação das técnicas foi realizado PCR diretamente das tonsilas para o gene 16S rRNA (*S. suis*), capsular (tipo 2) e também foi realizada pesquisa do gene *ef* (EF). Utilizando PCR diretamente das tonsilas, *S. suis* foi detectado em 100% das amostras, diferindo do isolamento em que 84,1% das amostras foram positivas. Na confirmação dos isolados sugestivos de *S. suis*, quatro deles foram negativos na PCR para o gene 16S rRNA. Na comparação para o tipo 2 a PCR demonstrou maior sensibilidade, detectando em 89,7% das tonsilas superando o isolamento, que detectou em 88% dos isolados. O gene *ef* foi detectado em 28,4% das amostras, sendo que em três amostras foi detectado o *ef* variante. Houve diferença significativa entre a PCR e o isolamento bacteriano para *S. suis*, demonstrando que a técnica molecular tem uma maior capacidade de detecção do que o isolamento.

Palavras chave: Suínos. *Streptococcus suis* tipo 2. Fator extracelular. PCR. Isolamento bacteriano.

ABSTRACT

Streptococcus suis is a important pathogen associated to many production and economical losses in the swine industry, in addition to its zoonotic importance. The aims of this study was evaluate the occurrence of *Streptococcus suis* type 2 in tonsil samples of healthy pigs at slaughter, comparing the bacterial isolation with PCR assay and to determine the presence of the EF factor (extracellular protein factor). Tonsil samples from 302 slaughtered pigs were collected from three abattoir. Isolation of *S. suis* was made in Columbia Blood Agar Base, and then bacterial phenotypic characterization was made using biochemical assays. The typification genus and species of the isolates was performed with the PCR technique for confirmation, and the presence of the capsular gene (type 2). In the comparison between the techniques, PCR was made directly from the tonsil samples for the 16SrRNA gene (*S. suis*), capsular genes (type 2) and also the *ef* gene. The pathogen was detected in 100% of the samples with the PCR, whereas only 84.1% were positive on the isolation technique. Upon confirmation of the *S. suis* isolates, four of them were negative to the 16S rRNA gene. PCR demonstrated higher sensibility on detecting the type 2 *S. Suis*, having 89.7% of positive samples against 88% from the isolates. The *ef* gene was detected in 28.4% of the samples, three of them being detected as the *ef* variant. Significant difference was found between the PCR and bacterial isolation for *S. suis*, detection demons that the molecular assay has a higher detection capability than isolation.

Keywords: Swine. *Streptococcus suis* type 2. Extracellular Factor. PCR. Bacterial isolation.

3.1 INTRODUÇÃO

S. suis é um patógeno responsável por diversas perdas produtivas e econômicas ligadas à suinocultura mundial, causando doenças como meningite, pneumonia e artrite, levando a diminuição do ganho de peso, morbidade, mortalidade e gastos com tratamento (RIVA *et al.*, 2008). Possui poder zoonótico, podendo acometer pessoas que trabalham em contato direto com suínos ou produtos derivados (GOTTSCHALK; KOBISCH; BERTHELOT-HÉRAULT, 2001; GOTTSCHALK; SEGURA; XU, 2007; FOWLER *et al.*, 2013). A

doença em humanos é endêmica na Ásia e o tipo 2 é considerado o mais patogênico e prevalente tanto em suínos quanto em humanos (WERTHEIM *et al.*, 2009). *S. suis* coloniza principalmente o trato respiratório, nos suínos se localiza nas tonsilas e menor grau na cavidade nasal (FLORES *et al.*, 1993; MAROIS *et al.*, 2007; LOWE *et al.*, 2011). Esses animais portadores são fontes de disseminação do micro-organismo (MAROIS *et al.*, 2007).

S. suis é classificado em 35 tipos com base no polissacarídeo capsular, 1 ao 34 e 1/2. A prevalência desses tipos capsulares é variável em diferentes regiões, porém o tipo 2 é o mais prevalente no mundo (HIGGINS; GOTTSCHALK, 1999) e no Brasil (PAGNANI *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2005). Nem todas as cepas estudadas do tipo 2 possuem virulência, algumas podem ser avirulentas (STAATS *et al.*, 1998). Os fatores de virulência ainda não estão totalmente esclarecidos, porém os principais são o polissacarídeo capsular, proteínas relacionadas com a virulência como a MRP (muramidase released protein) e o fator EF (fator protéico extracelular), hemolisinas/suilisinas e adesinas (GOTTSCHALK; SEGURA, 2000; TIMONEY, 2004).

Para identificação de animais positivos e até mesmo na rotina diagnóstica é utilizado isolamento bacteriano. No entanto, há dificuldade de isolar *S. suis* em amostras que possuem microbiota, como é o caso das tonsilas, que são sítios fundamentais para a detecção de micro-organismos em suínos vivos. Com isso novas técnicas se fazem necessárias, podendo ser utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR), que pode contribuir para identificação da origem e também monitoração da cinética da infecção (MAROIS *et al.*, 2007). O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência da ocorrência de *Streptococcus suis* tipo 2 em de tonsilas de suínos, comparando o isolamento bacteriano com a reação em cadeia da polimerase e determinar a presença do fator EF e suas variantes.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Animais e coletas das amostras

Foram coletadas tonsilas palatinas de 302 suínos provenientes de três frigoríficos com inspeção federal, dois deles localizados na região Oeste e um na região Sul do Estado de Santa Catarina. As amostras foram provenientes de 10 lotes, sendo que do frigorífico 1 foram coletadas 100 tonsilas provenientes de cinco lotes, os animais

possuíam peso médio de 103 kg, no frigorífico 2 totalizou 104 tonsilas de quatro lotes, peso médio de 90 kg e no frigorífico 3 foram coletadas 98 tonsilas de apenas um lote com peso médio de 105 kg. Os animais foram selecionados aleatoriamente, sem predileção de sexo.

As tonsilas com peso médio de sete gramas foram removidas com auxílio de tesoura e pinça estéreis, colocadas em embalagens plásticas estéreis, acondicionadas em caixas isotérmicas e enviadas sob refrigeração ao Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal – CEDIMA, localizado no Centro de Ciências Agroveterinárias CAV/UEDESC em Lages. Posteriormente as tonsilas foram fragmentadas, adicionados 5 mL de água peptonada a 1% e homogeneizadas no equipamento Stomacher® por quatro minutos.

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal sob o número de 1.23.13.

3.2.2 Isolamento bacteriano e identificação

Foi retirada uma alíquota do homogeneizado de tonsilas com auxílio de uma alça de platina e semeado em Agar Sangue Columbia Himedia® (5% de sangue ovino) e incubado em estufa bacteriológica em aerobiose a 37°C/24 horas. A partir das colônias características foi realizado coloração de Gram e teste de catalase com peróxido de hidrogênio. Foram realizadas também as provas de fermentação dos açúcares manitol, trealose e lactose em que foram incubados a 37°C/48 horas e degradação do Agar Amido, sendo que para este teste as placas foram incubadas a 37°C/24 horas em microaerofilia e em seguida foi adicionado lugol a 1%, na Tabela 1 estão dispostos os testes que correspondem a *Streptococcus suis*.

Tabela 1. Testes e resultados utilizados para identificação dos isolados como *S. suis*.

Testes	<i>S. suis</i>
Catalase	-
Manitol	-
Trealose	+
Lactose	+
Agar Amido	+

Legenda: - Negativo e + Positivo

Fonte: Produção da própria autora.

3.2.4 Extração de DNA

A extração do DNA foi feita através do Kit NewGene® conforme recomendação do fabricante. Para a extração diretamente das tonsilas foi utilizada uma alíquota do homogeneizado de Água Peptonada e para os isolados utilizou-se uma colônia com 24 horas proveniente do Agar Sangue Columbia Himedia® (5% de sangue ovino).

3.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase

Do homogeneizado das tonsilas foram realizados PCR para tipificação da espécie (*S. suis*), da cápsula (tipo 2) e confirmação da presença do gene de virulência *ef*. Para tipificação dos isolados bacterianos, os mesmos foram submetidos ao PCR para confirmação da espécie, e detecção do gene capsular do sorotipo 2.

3.2.5 Amplificação dos genes por PCR

Após a extração do material genético foi realizada a PCR segundo Faria *et al.* (2010) com algumas modificações, sendo elas nas quantidades dos componentes do mix e temperaturas. Os oligonucleotídeos utilizados estão citados na Tabela 2, sendo que os primers da região 16S foram retirados do trabalho de Chatellier *et al.* (1998), tipo 2 de Marois *et al.* (2004) e fator EF de Wisselink *et al.* (1999).

Tabela 2. Nome, sequência e tamanhos de fragmento gerados a partir dos oligonucleotídeos utilizados para a reação de PCR.

Iniciador	Sequência 5'-3'	Fragmento
16S rRNA (f)	CAGTATTTACCGCATGGTAGATAT	294 pb
16S rRNA (r)	GTAAGATACCGTCAAGTGAGAA	294 pb
cps2J-s (tipo 2-f)	GTTGAGTCCTTATACACCTGTT	459 pb
cps2J-s (tipo 2-r)	CAGAAAATTCATATTGTCCACC	459 pb
<i>ef</i> (gene <i>ef</i> -f)	GCTACGACGGCCTCAGAAATC	626 pb
<i>ef</i> (gene <i>ef</i> -r)	TGGATCAACCACTGGTGTTAC	626 pb

Legenda: f-primer forward, r-primer reverse e pb-pares de base.

Fonte: Produção da própria autora.

Os produtos de PCR provenientes do gene *ef* podem também apresentar fragmentos de 1278, 1505, 2313, 2537 e 2993 pb determinando as cinco variantes do gene que codifica o fator EF.

Para todas as reações da PCR foram utilizados 20 ng de DNA das amostras testadas. Para a reação de *S. suis* foram utilizados 22,5 µL Master Mix (Quatro G[®]), 15 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (IDT[®]), para uma reação com volume final de 25 µL. Na reação para o tipo 2 foi utilizado tampão 10 X, 3,5 mM de cloreto de magnésio, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen[®]), 200 µM de cada dNTP (Quatro G[®]) e 15 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (IDT[®]). E para cada reação do gene *ef* foi utilizado tampão 5 X, 3 mM de cloreto de magnésio, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Promega[®]), 200 µM de cada dNTP (Quatro G[®]) e 25 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (IDT[®]). As reações de PCR ocorreram no termociclador MJ96+ (Biorcycler[®]).

Inicialmente, em todas as reações, houve uma etapa inicial de desnaturação a 94°C (exceto gene *ef* 94,8°C) por 10 min e uma extensão final a 72°C por 10 min. Nas reações para o *S. suis* e tipo 2 foram realizados 40 ciclos com as seguintes temperaturas: desnaturação a 94°C, por 30s; anelamento a 54°C para *S. suis* e a 59°C para tipo 2 por 30s; e extensão a 72°C, por 60s.

Para o fator EF foram realizados 40 ciclos de desnaturação a 94,8°C, por 60s, anelamento a 60°C, por 55s e extensão a 72°C, por 180s. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com 1 µL de Gel Red (Biotium[®]) e observados em transiluminador UV. Foi utilizado marcador de peso molecular padrão de 100 pares de base e para as variantes do EF variante utilizou-se de 1 Kb (Invitrogen[®]).

Foram adotados todos os cuidados para não ocorrer contaminação das reações com amplicons.

Para sequenciamento foram enviadas 10 amostras de amplificado para o laboratório Ludwig Biotec. Sendo metade delas provenientes do homogeneizado de tonsilas e o restante de isolados, sendo que duas delas de *S. suis*, seis do tipo 2 e duas do fator EF.

3.2.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do teste X^2 com nível de 5% de significância.

3.3 RESULTADOS

No presente estudo foram analisadas tonsilas de 302 suínos abatidos, através do isolamento bacteriano e ensaio molecular (PCR). Houve 100% (302) de positividade na detecção do *S. suis* pela técnica de PCR diretamente do homogeneizados de tonsila, como demonstrado na Tabela 3, enquanto no isolamento bacteriano foi de 84,1% (254). Por meio da análise estatística pelo teste X^2 quadrado, observou-se que há diferença significativa entre as duas técnicas utilizadas. Os 254 isolados de *S. suis* foram confirmados através da detecção do gene da região 16S rRNA, sendo que quatro isolados foram negativos para este gene.

As amostras positivas para *S. suis*, obtidas pelas duas técnicas, foram submetidos ao PCR para detecção do gene capsular do tipo 2. Das amostras positivas diretamente pelo PCR, 271 (89,7%) foram positivas para o gene codificante da cápsula do tipo 2, diferindo dos isolados, em que 220 (88%) demonstraram-se positivos. Para amplificação do fragmento do gene *ef* foram utilizadas as amostras positivas para tipo 2 proveniente do extraído de tonsila, em que foram encontradas 77 (28,4%) amostras positivas. Sendo que, em três (3,89%) delas foram encontradas variantes do gene *ef*.

Tabela 3. Resultado das amostras analisadas para *S. suis*, Tipo 2 e fator EF por isolamento e PCR do homogeneizado de tonsilas.

	<i>S. suis</i>		Tipo 2		EF
	Isolamento	Tonsilas	Isolamento	Tonsilas	Tonsilas
Positivo	250 ^a	302 ^b	220	271	77
Negativo	52	0	30	31	194
Total	302	302	250	302	271

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p > 0,001$).

Fonte: Produção da própria autora.

Das amostras negativas para *S. suis* no isolamento, quando as mesmas foram comparadas ao resultado da PCR, foram identificados os seguintes genótipos: tipo 2⁺ EF⁺ em 23% das amostras analisadas (11/48), tipo 2⁺ EF⁻ 66,6% das amostras (32/48) e 10,4% das amostras (5/48). Os resultados da pesquisa de *S. suis* estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Resultado das amostras analisadas por frigoríficos para *S. suis* por isolamento e PCR do homogeneizado de tonsilas.

<i>S. suis</i>	Frigorífico 1		Frigorífico 2		Frigorífico 3	
	Isolamento	Tonsilas	Isolamento	Tonsilas	Isolamento	Tonsilas
Positivo	90	100	75	104	85	98
Negativo	10	0	29	0	13	0
Total	100	100	104	104	98	98

Fonte: Produção da própria autora.

Na Tabela 5 estão dispostos os resultados para a detecção do *S. suis* tipo 2. A presença do gene codificador do fator *ef* foi encontrado nos três frigoríficos. Do total de 28,4% amostras positivas para este gene, no frigorífico 1 das amostras analisadas, 17 amostras amplificaram o gene, no segundo frigorífico 25 foram positivas, sendo que três delas são as variantes do EF e no frigorífico 3 encontrou-se 35 amostras positivas.

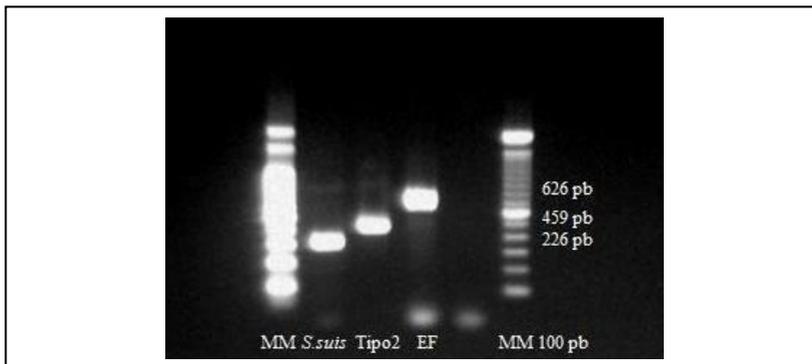
Tabela 5. Resultado das amostras analisadas por frigoríficos para Tipo 2 por isolamento e PCR do homogeneizado de tonsilas.

<i>S.suis</i> Tipo 2	Frigorífico 1		Frigorífico 2		Frigorífico 3	
	Isolamento	Tonsilas	Isolamento	Tonsilas	Isolamento	Tonsilas
Positivo	75	88	68	91	77	92
Negativo	15	12	7	13	8	6
Total	90	100	75	104	85	98

Fonte: Produção da própria autora.

As amostras enviadas para o sequenciamento foram analisadas através do BLAST e as que apresentaram similaridade com *S. suis*, tipo 2 e fator EF foram consideradas positivas e serão depositadas no genbank.

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com Gel Red® demonstrando produtos amplificados de *S. suis* (294 pb), tipo 2 (459 pb) e fator EF (626 pb).



Fonte: Produção da própria autora.

3.4 DISCUSSÃO

No presente trabalho a técnica de PCR demonstrou-se mais sensível que o isolamento bacteriano, identificando 17,2% a mais de amostras positivas para *S. suis* que a técnica convencional. O resultado foi condizente ao encontrado por Wisselink, Joosten e Smith (2002) e por Marois *et al.* (2007), em que a técnica molecular obteve uma maior sensibilidade. A menor sensibilidade do isolamento, deve-se principalmente ao fato de que as tonsilas palatinas são órgãos colonizados por diversos micro-organismos, como descrito por O'Sullivan *et al.* (2011). A principal dificuldade é isolar colônias de *S. suis* em amostras que possuem diversas bactérias. Isto favorece a técnica molecular, que possui elevada sensibilidade e especificidade (MAROIS *et al.*, 2007). Esta diferença de resultados encontrados entre os testes pode ser decorrente do baixo número de células bacterianas, viáveis ou não, presentes nas amostras (WISSELINK; JOOSTEN; SMITH, 2002).

Quanto a ocorrência de *S. suis* (100%), o resultado deste trabalho foi superior ao encontrado por Faria *et al.* (2010), em que a prevalência de *S. suis* foi de 58,7%. A presença de *S. suis* em todas as amostras de tonsilas pesquisadas demonstra sua alta distribuição nos rebanhos suínos, das diferentes regiões produtoras de suínos do estado de Santa Catarina. Este patógeno é considerado o micro-organismo mais

frequente, segundo O'Sullivan *et al.* (2011), representou 53% das bactérias identificadas nas tonsilas testadas em seu trabalho.

A alta ocorrência de *S. suis* tipo 2 (89,7%), foi superior ao encontrado por Lara *et al.* (2007), em que uma prevalência de 55,8% foi detectada em animais no abate, através da técnica de isolamento bacteriano. Esta diferença de positividade pode ser decorrente da técnica utilizada, como discutido anteriormente, é dificultada pela grande diversidade de micro-organismo presente no órgão linfóide. Além de ter sido realizada as coletas em apenas um frigorífico.

O resultado de *S. suis* tipo 2 também foi superior ao encontrado em um estudo realizado no estado do Mato Grosso, em que foi pesquisado o gene capsular em tonsilas de suínos provenientes de nove municípios, sendo que a prevalência foi de 23,3% de positividade. A diferença encontrada entre os estados pode ser explicada pelo fato que as criações no estado de Santa Catarina, são predominantemente integradas e segregadas, diferentes do estado de Mato Grosso que são de ciclo completo (FARIA *et al.*, 2010). Esta segregação aumenta a mistura de origem dos animais, favorecendo a contaminação dos animais pelo patógeno.

Neste estudo, a ocorrência do gene codificante do fator *ef* foi detectado de 28,4% das amostras do tipo 2, sendo que três foram variantes do gene. Diferindo de outros trabalhos brasileiros, como o de Faria *et al.* (2010) que pesquisaram o gene em animais de abate e tiveram uma positividade de apenas 1,49%. No entanto, outro trabalho detectou uma positividade superior, sendo amplificado em 72,2% do gene *ef* e 20,3% do *ef variante* das amostras provenientes de animais doentes (CALDERARO *et al.*, 2004). A alta positividade do fator EF no frigorífico 3 deve-se ao fato que neste frigorífico as amostras coletadas foram provenientes de apenas um lote de animais, diferente dos demais, que foram oriundos vários lotes.

3. 5 CONCLUSÃO

A técnica de PCR demonstrou uma maior capacidade de detecção para o *S. suis* do que a técnica convencional de isolamento bacteriano.

A alta ocorrência de *S. suis*, tipo 2 e do gene do fator EF, evidenciou a circulação de cepas patogênicas nos rebanhos suínos do estado de Santa Catarina.

3.6 AGRADECIMENTO

A doutoranda Ana Carolina Faria, da Universidade Federal do Mato Grosso, pelo fornecimento do controle positivo do gene *ef*.

3.7 REFERÊNCIAS

CALDERARO, F. F.; DOTO, D. S.; PAIXÃO, R.; GOMES, C. R.; CASTRO, A. F. P. DE; MORENO, A. M. Detecção dos genes codificadores das proteínas EF, MRP e Suilisina em amostras de *Streptococcus suis* sorotipo 2 isoladas em suínos no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 15-19, jan./mar., 2004. Disponível em:

<http://www.researchgate.net/publication/227878146_DETECO_DOS_GENES_CODIFICA

[DORES_DAS_PROTENAS_EF_MRP_E_SUILISINA_EM_AMOSTRAS_DE_STREPTOCOCCUS_SUIS_SOROTIPO_2_ISOLADAS_EM_SUNOS_NO_BRASIL](http://www.researchgate.net/publication/227878146_DETECO_DOS_GENES_CODIFICA)>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

CHATELLIER, S.; HAREL, J.; ZHANG, Y.; GOTTSCHALK, M.; HIGGINS, R.; DEVRIESE, L. A.; BROUSSEAU, R. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 581-589, 1998. Disponível em:

<http://ijs.sgmjournals.org/content/48/2/581.full.pdf?origin=publication_detail>. Acessado em 02 de fev. De 2014.

COSTA, A. T. R.; LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V.; ASSIS, R. A.; REIS, R.; UZAL, F. A. Serotyping and evaluation of the virulence in mice of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 47, n. 2, p. 113-115, mar./abr. 2005. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v47n2/23952.pdf>>. Acessado em 01 de mar. de 2013.

FARIA, A. C. S. DE; SILVA, M. C. da; OLIVEIRA FILHO, J. X.; OLIVEIRA, J. T. DE; PAULA, D. A. J. DE; CHIATARRA, C. S. NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Prevalência de *Streptococcus suis* tipo 2 por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase em suínos abatidos no Estado do Mato Grosso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40,

n. 1, jan./fev. 2010. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n1/a433cr1905.pdf>>. Acessado em 28 de fev. de 2013.

FLORES, J. L. M.; HIGGINS, R.; D'ALLAIRE, S.; CHARETTE, R.; BOUDREAU, M.; GOTTSCHALK, M. Distribution of the different capsular types of *Streptococcus suis* in nineteen swine nurseries. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 34, p. 170-171, mar. 1993.

Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686519/pdf/canvetj00364-0044.pdf>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

FOWLER, H. N.; BROWN, P.; ROVIRA, A.; SHADE, B.; KLAMMER, K.; SMITH, K.; SCHEFTEL, J.. *Streptococcus suis* meningitis in swine worker, Minnesota, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 2, fev. 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3559051/>>. Acessado em 02 de dez. 2013.

GOTTSCHALK, M.; KOBISCH, M.; BERTHELOT-HÉRAULT, F. L'Infection à *Streptococcus suis* chez le porc Revue Générale. **Journées Rech - Porcine en France**, v. 33, p.269-276, 2001. Disponível em: <<http://www.journees-recherche-porcine.com/texte/2001/01txtSante/S0103.pdf>>. Acesso em 20 de fev. de 2013.

GOTTSCHALK, M.; SEGURA, M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. **Veterinary Microbiology**, Barcelona, v. 76, p. 259 – 272, out. 2000. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0378113500002509/1-s2.0-S0378113500002509-main.pdf?_tid=4987f298-6591-11e2-9478-00000aacb361&acdnat=1358968725_5d2ab4c645e6a2511bedbac62869ae64>. Acessado em 23 de jan. de 2013.

GOTTSCHALK, M.; SEGURA, M.; XU, J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 1, p. 29-45, 2007. Disponível em:

<<http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FAHR%2FAHR8>

_01%2FS1466252307001247a.pdf&code=7dd1ddd6dc25dd1dead73b8e039e5e6c>. Acessado em 28 de janeiro de 2013.

HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J.(eds). **Diseases of swine**. 8 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 1999, 1181p.

LARA, A. C.; MORES, M. A. Z.; SONCINI, R. A.; ALVERTON, G. C. Prevalência de *Streptococcus suis* sorotipo 2 em tonsilas de suínos sadios em idade de abate no estado de Santa Catarina. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 12, n. 2, p. 31-34, 2007. Disponível em:

<<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/veterinary/article/view/9906>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

LOWE, B. A.; MARSH, T. L.; ISAACS-COSGROVE, N.; KIRKWOOD, R. N.; KIUPEL, M.; MULKS, M. H. Microbial communities in the tonsils of healthy pigs. **Veterinary Microbiology**, Barcelona, v. 147, p. 346-357, 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20663617>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

MAROIS, C.; BOUGEARD, S.; GOTTSCHALK, M.; KOBISCH, M. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and ½ in tonsils of live and dead pigs. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3169-3175, 2004. Disponível em:

<<http://jcm.asm.org/content/42/7/3169.full?view=long&pmid=15243078>>. Acessado em 20 de fev. de 2014.

MAROIS, C.; DEVENDEC, L. L.; GOTTSCHALK, M.; KOBISCH, M. Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 14-22, 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1635993/pdf/cjvr71pg14.pdf>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

O'SULLIVAN, T.; FRIENDSHIP, R.; BLACKWELL, T.; PEARL, D.; MCEWEN, B.; CARMAN, S.; SLAVIC, D.; DEWEY, C. Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter. **The Canadian Journal of Veterinary**

Research, Bethesda, v. 75, p. 106-111, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3062919/pdf/cjvr_02_106.pdf>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

PAGNANI, K. J. R.; CASTRO, A. F. P.; GOTTSCHALK, M.; SILVEIRA, W. D.; NAKAZATO, G. Sorotipagem de amostras de *Streptococcus suis* isoladas de suínos em granjas dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 22, n. 1, p. 1-5, jan./mar. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v22n1/8864.pdf>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

RIVA, E.; LIMA, C. B. L.; MARTINI, K. C.; MARTINS, L. A. Infecção por *Streptococcus suis*: uma revisão. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 2, p. 167-170, jul./dez. 2008. Disponível em: <<http://revistas.unipar.br/veterinaria/article/viewFile/2572/2000>>. Acessado em 24 de fev. de 2013.

STAATS, J. J.; PLATTNER, B. L.; NIETFELD, J.; DRITZ, S.; CHENGAPPA, M. M. Use of Ribotyping and Hemolysin Activity To Identify Highly Virulent *Streptococcus suis* Type 2 Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 1, p. 15 – 19, jan. 1998. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/36/1/15.full.pdf+html>>. Acessado em 23 de jan. de 2013.

TIMONEY, J. F. *Streptococcus*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Ed: Blackwell. 3 ed. 2004, 456.

WERTHEIM, H. F. L.; NGHIA, H. D. T.; TAYLOR, W.; SCHULTSZ, C. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. **Emerging Infections**, Atlanta, v. 48, p. 617-625, mar. 2009. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/content/48/5/617.full.pdf>>. Acessado em 24 de fev. 2013.

WISSELINK, H. J.; REEK, F. H.; VECHE, U.; STOCKHOFER-ZURWIENEN, N.; SMITS, M. A.; SMITH, H. E. Detection of virulent strains of *Streptococcus suis* type 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* type 1 in tonsillar specimens of pigs by PCR.

Veterinary Microbiology, v. 67, p. 143-157, 1999. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S037811359900036X/1-s2.0-S037811359900036X-main.pdf?_tid=2e4b1d3e-b554-11e3-94df-00000aab0f02&acdnat=1395886071_9e44e316dfe40b438630611461941091>. Acessado em 02 de fev. de 2014.

WISSELINK, H. J.; JOOSTEN, J. J.; SMITH, H. E. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 8, p. 2922-2929, ago. 2002. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/40/8/2922>>. Acessado em 24 de fev. de 2013.

4 REFERÊNCIAS DISSERTAÇÃO

ABIPCS. Exportações Brasileiras de carne suína. 2012. Disponível em: <<http://www.abipecs.com.br/>>. Acessado em 20 de jul. de 2013.

ACCS. Dados da suinocultura. 2008. Disponível em: <http://www.accs.org.br/arquivos_internos/index.php>. Acesso em 20 de jul. de 2013.

ACCS. Dados da suinocultura. 2012. Disponível em: <http://www.accs.org.br/arquivos_internos/index.php>. Acesso em 20 de jul. de 2013.

AMASS, S. F.; CLARK, L. K.; KNOX, K.; WU, C. C.; HILL, M. A. *Streptococcus suis* colonization of piglets during parturition. **Swine Health and Production**, v. 4, n. 6, p.269-272, nov./dez., 1996. Disponível em: <<http://www.aasv.org/shap/issues/v4n6/v4n6p269.pdf>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

AMASS, S. F.; CLARK, L. K.; WU, C. C. Source and timing of *Streptococcus suis* infection in neonatal pigs: Implications for early weaning procedures. **Swine Health and Production**, v. 3, n. 5, p. 189-193, set./out., 1995. Disponível em: <<http://www.aasv.org/shap/issues/v3n5/v3n5p189.pdf>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

BEEFPOINT. Carne de frango deve se tornar a mais consumida do mundo, ultrapassando carne suína – entenda porque. 2013. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/carne-de-frango-deve-se-tornar-a-mais-consumida-do-mundo-ultrapassando-carne-suina-entenda-porque/>>. Acessado em 09 de dez. de 2013.

BOSCO, S. M. G.; PEZERICO, S. B.; CABRAL, K. DE G.; SILVA, A. V. DA; LANGONI, H. *Streptococcus suis* tipo II em suínos e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 157-160, jul./dez., 2000. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V67_2/2.pdf>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

CALDERARO, F. F.; DOTO, D. S.; PAIXÃO, R.; GOMES, C. R.; CASTRO, A. F. P. DE; MORENO, A. M. Detecção dos genes codificadores das proteínas EF, MRP e Suilisina em amostras de *Streptococcus suis* sorotipo 2 isoladas em suínos no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 15-19, jan./mar., 2004.

Disponível em:

<http://www.researchgate.net/publication/227878146_DETECO_DOS_GENES_CODIFICA

DORES_DAS_PROTENAS_EF_MRP_E_SUILISINA_EM_AMOSTRAS_DE_STREPTOCOCCUS_SUIS_SOROTIPO_2_ISOLADAS_EM_SUNOS_NO_BRASIL >. Acessado em 20 de fev. de 2013.

CHABOT-ROY, G.; WILLSON, P.; SEGURA, M.; LACOUTURE, S.; GOTTSCHALK, M. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. **Microbial Pathogenesis**, v. 41, p. 21-32, 2006.

Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0882401006000489/1-s2.0-S0882401006000489-main.pdf?_tid=04e553c8-696b-11e2-9ef5-00000aacb361&acdnat=1359392094_7dcf099ed27e27de4110f4dbf98a15ec>. Acessado em 28 de janeiro de 2013.

CHARLAND, N.; HAREL, J.; KOBISCH, M.; LACASSE, S.; GOTTSCHALK, M. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. **Microbiology**, Washington, v. 144, p. 325 – 332, 1998. Disponível em:

<<http://mic.sgmjournals.org/content/144/2/325.full.pdf>>. Acessado em 23 de jan. de 2013.

CHARLAND, N.; NIZET, V.; RUBENS, C. E.; KIM, K. S.; LACOUTURE, S.; GOTTSCHALK, M. *Streptococcus suis* Serotype 2 Interactions with Human Brain Microvascular Endothelial Cells. **Infection e Immunity**, v. 68, n. 2, p.637-643, fev. 2000. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/68/2/637.full.pdf>>. Acessado em: 25 de jan. de 2013.

CLOUTIER, G.; D'ALLAIRE, S. D.; MARTINEZ, G.; SURPRENANT, C.; LACOUTURE, S.; GOTTSCHALK, M. Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. **Veterinary Microbiology**, Barcelona, v. 97, p. 135-151, 2003. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350300302X>>. Acessado em 24 de fev. de 2013.

COSTA, A. T. R.; LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V.; ASSIS, R. A.; REIS, R.; UZAL, F. A. Serotyping and evaluation of the virulence in mice of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 47, n. 2, p. 113-115, mar./abr. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v47n2/23952.pdf>>. Acessado em 01 de mar. de 2013.

FARIA, A. C. S. DE; SILVA, M. C. da; OLIVEIRA FILHO, J. X.; OLIVEIRA, J. T. DE; PAULA, D. A. J. DE; CHIATARRA, C. S. NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Prevalência de *Streptococcus suis* tipo 2 por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase em suínos abatidos no Estado do Mato Grosso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, jan./fev. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n1/a433cr1905.pdf>>. Acessado em 28 de fev. de 2013.

FLORES, J. L. M.; HIGGINS, R.; D'ALLAIRE, S.; CHARETTE, R.; BOUDREAU, M.; GOTTSCHALK, M. Distribution of the different capsular types of *Streptococcus suis* in nineteen swine nurseries. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 34, p. 170-171, mar. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686519/pdf/canvetj00364-0044.pdf>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

GOTTSCHALK, M. G.; LACOUTURE, S.; DOUBREUIL, D. J. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. **Microbiology**, Washington, v. 141, p. 189-195, 1995. Disponível em: <<http://mic.sgmjournals.org/content/141/1/189.full.pdf>>. Acessado em 25 de jan. de 2013.

GOTTSCHALK, M. Revisão sobre a infecção por *Streptococcus suis* em suínos e importância do agente como causa de infecção em seres humanos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, supl. 1, p. 73-79, 2009. Disponível em: <http://suinotec.com.br/arquivos_edicao/IV_SINSUI2009_08_M_Gottschalk.pdf>. Acessado em 24 de fev. de 2013.

GOTTSCHALK, M.; KOBISCH, M.; BERTHELOT-HÉRAULT, F. L'Infection à *Streptococcus suis* chez le porc Revue Générale. **Journées Rech - Porcine en France**, v. 33, p.269-276, 2001. Disponível em: <<http://www.journees-recherche-porcine.com/texte/2001/01txtSante/S0103.pdf>>. Acesso em 20 de fev. de 2013.

GOTTSCHALK, M.; SEGURA, M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. **Veterinary Microbiology**, Barcelona, v. 76, p. 259 – 272, out. 2000. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0378113500002509/1-s2.0-S0378113500002509-main.pdf?_tid=4987f298-6591-11e2-9478-00000aacb361&acdnat=1358968725_5d2ab4c645e6a2511bedbac62869ae64>. Acessado em 23 de jan. de 2013.

GOTTSCHALK, M.; SEGURA, M.; XU, J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 1, p. 29-45, 2007. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FAHR%2FAHR8_01%2FS1466252307001247a.pdf&code=7dd1ddd6dc25dd1dead73b8e039e5e6c>. Acessado em 28 de janeiro de 2013.

HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J.(eds). **Diseases of swine**. 8 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 1999, 1181p.

HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M.; BOUDREAU, M.; LEBRUN, A.; HENRICHSEN, J. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 405-406, 1995. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/content/7/3/405.full.pdf>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

JACOBS, A. A. C.; LOEFFEN, P. L. W.; BERG, A. J. G. V. D.; STORM, P. K. Identification, Purification, and Characterization of a Thiol-Activated Hemolysin (Suilysin) of *Streptococcus suis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1742-1748, mai. 1994. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186398/pdf/iai00005-0250.pdf>>. Acessado em 25 de jan. de 2013.

LARA, A. C.; MORES, M. A. Z.; SONCINI, R. A.; ALVERTON, G. C. Prevalência de *Streptococcus suis* sorotipo 2 em tonsilas de suínos sadios em idade de abate no estado de Santa Catarina. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 12, n. 2, p. 31-34, 2007. Disponível em:

<<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/veterinary/article/view/9906>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

LOWE, B. A.; MARSH, T. L.; ISAACS-COSGROVE, N.; KIRKWOOD, R. N.; KIUPEL, M.; MULKS, M. H. Microbial communities in the tonsils of healthy pigs. **Veterinary Microbiology**, Barcelona, v. 147, p. 346-357, 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20663617>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

MADSEN, L. W.; SVENSMARK, B.; ELVESTAD, K.; JENSEN, H. Otitis interna is a frequent sequela to *Streptococcus suis* meningitis in pigs. **Veterinary Pathology**, v. 38, p. 190-195, 2001. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/38/2/190.full.pdf+html>>. Acessado em 24 de fev. De 2013.

MARIE, J.; MORVAN, H.; BERTHELOT-HÉRAULT, F.; SANDERS, P.; KEMPF, I.; GAUTIER-BOUCHARDON, A. V.; JOUY, E.; KOBISCH, M. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 50, p. 201-209, 2002. Disponível em:

<<http://jac.oxfordjournals.org/content/50/2/201.full.pdf>>. Acessado em 24 de fev. de 2013.

MAROIS, C.; DEVENDEC, L. L.; GOTTSCHALK, M.; KOBISCH, M. Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 14-22, 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1635993/pdf/cjvr71pg14.pdf>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

OKWUMABUA, O.; O'CONNOR, M.; SHULL, E. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, p. 79-84, 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12583901>>. Acessado em 12 de fev. de 2014.

O'SULLIVAN, T.; FRIENDSHIP, R.; BLACKWELL, T.; PEARL, D.; MCEWEN, B.; CARMAN, S.; SLAVIC, D.; DEWEY, C.

Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, Bethesda, v. 75, p. 106-111, 2011. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3062919/pdf/cjvr_02_106.pdf>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

PAGNANI, K. J. R.; CASTRO, A. F. P.; GOTTSCHALK, M.; SILVEIRA, W. D; NAKAZATO, G. Sorotipagem de amostras de *Streptococcus suis* isoladas de suínos em granjas dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 22, n. 1, p. 1-5, jan./mar. 2002. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v22n1/8864.pdf>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

PERCH, B.; PEDERSEN, K. B.; HENRICHSEN, J. Serology of Capsulated Streptococci Pathogenic for Pigs: Six New Serotypes of *Streptococcus suis*. **Journal of clinical Microbiology**, Washington, v. 17, n. 6, p. 993-996, jun. 1983. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC272789/pdf/jcm00143-0065.pdf>>. Acessado em 20 de fev. de 2013.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J. C.; LEONARD, F. C.; MAGUIRE, D. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Ed: Artmed, 2005, 512 p.

REAMS, R. Y.; GLICKMAN, L. T.; HARRINGTON, D. D.; THACKER, H. L.; BOWERSOCK, T. L. *Streptococclus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 326-334, 1994.

Disponível em: < <http://vdi.sagepub.com/content/6/3/326.full.pdf+html> >. Acessado em 24 de fev. de 2013.

RIVA, E.; LIMA, C. B. L.; MARTINI, K. C.; MARTINS, L. A. Infecção por *Streptococcus suis*: uma revisão. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 2, p. 167-170, jul./dez. 2008. Disponível em: <<http://revistas.unipar.br/veterinaria/article/viewFile/2572/2000> >. Acessado em 24 de fev. de 2013.

SANTOS, J. L. DOS; BARCELLOS, D. Meningite estreptocócica. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (eds). **Doenças dos Suínos**. 2 ed. Cãnone, 2012, 959 p.

SEGURA, M.; GOTTASCHALK, M. *Streptococcus suis* Interactions with the Murine Macrophage Cell Line J774: Adhesion and Cytotoxicity 2002, **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4312-4322, ago. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC128179/pdf/0361.pdf>>. Acessado em 28 de jan. de 2013.

SMITH, H. E.; BRUIJNSVOORT, L. V.; BUIJS, H. WISSELINK, H. J.; SMITS, M. A. Rapid PCR test for *Streptococcus suis* serotype 7. **FEMS Microbiology Letters**, v. 178, p. 265-270, 1999a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499276>>. Acessado em 13 de fev. de 2013.

SMITH, H. E.; DAMMAN, M.; VELDE, J. V. D.; WAGENAAR, F.; WISSELINK, H. J.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; SMITS, M. A. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 4, p. 1750-1756, abr. 1999b. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/67/4/1750.full.pdf+html> >. Acessado em 28 de fev. de 2013.

SMITH, H. E.; VEENBERGEN, V.; VELDE, J. V. D.; DAMMAN, M.; WISSELINK, H. J.; SMITS, M. A. The *cps* genes of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 9: development of rapid serotype-specific PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 10, p.

3146-3152, out. 1999c. Disponível em:
<<http://jcm.asm.org/content/37/10/3146.full.pdf>>. Acessado em 24 de fev. de 2013.

SOBESTIANSKY J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cânone, 2007.

STAATS, J. J.; PLATTNER, B. L.; NIETFELD, J.; DRITZ, S.; CHENGAPPA, M. M. Use of Ribotyping and Hemolysin Activity To Identify Highly Virulent *Streptococcus suis* Type 2 Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 1, p. 15 – 19, jan. 1998. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/36/1/15.full.pdf+html>>. Acessado em 23 de jan. de 2013.

SWILDENS, B.; WISSELINK, H. J.; ENGEL, B.; SMITH, H. E.; NIELEN, M.; VERHEIJDEN, J. H. M.; STEGEMAN, J. A. Detection of extracellular factor-positive *Streptococcus suis* serotype 2 strain in tonsillar swabs of live sows by PCR. **Veterinary Microbiology**, Barcelona, v. 109, p. 223-228, 2005.

SUINOCULTURA INDUSTRIAL. Produção de carne suína. Disponível em:< <http://www.suinoindustrail.com.br/>>. Acessado em 20 de jul. de 2013.

TIMONEY, J. F. Streptococcus. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Ed: Blackwell. 3 ed. 2004, 456.

VECHT, U.; WISSELINK, H. J.; JELLEMA, M. L.; SMITH, H. E. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. **Infection and Immunity**, Washington, v. 59, n. 9, p.3156-3162, set. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC258147/pdf/iai00045-0312.pdf>>. Acessado em 24 de fev. de 2013.

VECHT, U.; WISSELINK, J. E.; DIJK, J. E. V.; SMITH, H. E. Virulence of *Streptococcus suis* Type 2 Strains in Newborn Germfree Pigs Depends on Phenotype. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, n. 2, p. 550-556, fev. 1992. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC257663/pdf/iai00026-0242.pdf>>. Acessado em: 24 de jan. de 2013.

WERTHEIM, H. F. L.; NGHIA, H. D. T.; TAYLOR, W.; SCHULTSZ, C. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. **Emerging Infections**, Atlanta, v. 48, p. 617-625, mar. 2009. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/content/48/5/617.full.pdf>>. Acessado em 24 de fev. 2013.

WILLIAMS, A. E. Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 8, p. 189-196, 1990. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/088240109090046S/1-s2.0-088240109090046S-main.pdf?_tid=d815f8a6-697f-11e2-91c6-00000aab0f27&acdnat=1359401038_51bad85c36a3c8db7e85fe73150e5f05>. Acessado em 28 de janeiro de 2013.

WISSELINK, H. J.; JOOSTEN, J. J.; SMITH, H. E. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 8, p. 2922-2929, ago. 2002. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/40/8/2922>>. Acessado em 24 de fev. de 2013.