



IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE CEPAS DE *Streptococcus equi* ISOLADAS DE LAVADO DE BOLSA GUTURAL DE EQUINOS

ABREU, Mayara Caetano¹; **Do Monte, Leandro Ribas**²; **MORAES, Carina Martins**³; **LEITE, Fábio Pereira Leivas**⁴; **NOGUEIRA, Carlos Eduardo Wayne**⁵

¹ Acadêmica em Medicina Veterinária, ² Professor Adjunto FV/URCAMP, ³ Professora Adjunta FV/ UFP, ⁴ Prof. Dr. Departamento de Clínicas Veterinária/FV/UFPel. Campus Universitário s/nº-Caixa Postal 354 CEP 9601 0-900. mayabreusl@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O Brasil possui o terceiro maior rebanho eqüino do mundo, com um plantel de 8,3 milhões de eqüídeos (IBGE,2007). O trato respiratório é o segundo sistema orgânico com maior prevalência de alterações clínicas em equinos, sendo a Adenite responsável por aproximadamente 30% das enfermidades relatadas em cavalos em todo o mundo (CHANTER, 1997).

A Adenite Eqüina possui distribuição mundial e é responsável por perdas econômicas importantes, considerando-se os custos com o tratamento, medidas de controle e eventuais mortes (WALLACE *et al.*, 1995). A doença tem alta morbidade e baixa letalidade, o que tem grande relevância em locais com grandes concentrações de eqüinos (MORAES, 2005).

O Garrotilho, como também é conhecido, caracteriza-se por uma doença infecciosa a qual acomete cavalos, burros e mulas. É considerada uma das mais importantes doenças respiratórias dos cavalos, a sua transmissão acontece pela via oro - nasal por contato direto ou indireto. Na ausência de doença clínica, a persistência do agente pode ser mantida por portadores assintomáticos ou "silenciosos" (NEWTON, 2000). O padrão de manutenção dessa bactéria nos cavalos são as bolsas guturais. Reconhecer e detectar essa categoria de transmissão é fundamental para o sucesso na eliminação dessa doença (TIMONEY, 2005).

O agente etiológico é uma bactéria beta-hemolítica, o *Streptococcus equi* subespécie. *equi* (*S. equi*) do grupo C de Lancefield, são Gram-positivas, catalase negativas (MORAES, 2005).

Segundo HARRINGTON 2002, é caracterizada clinicamente por linfadenopatia, depressão, perda de apetite, pirexia, descarga nasal purulenta e dispnéia, e cursa com 2 a 3 semanas até a resolução. 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 microrganismo por muitos meses (NEWTON *et al.*, 1997).

Também pertencem a esse grupo o *S. equi* subesp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) e o *S. dysgalactiae* subesp. *equisimilis* (*S. equisimilis*), microrganismos relacionados geneticamente, porém com potencial patogênico muito diferenciado e freqüentemente isolados de amostras clínicas como contaminantes secundários (TIMONEY, 2005)

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. (MORAES, 2005)

Este trabalho objetiva em isolar e caracterizar as subespécies de *Streptococcus equi* a partir de lavados de bolsa gútural em equinos, podendo assim, sugerir que são portadores de Adenite Equina.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo utilizou 10 equinos de ambos os sexos, a idade variando entre 5 e 26 anos, de raças diferentes, sendo 3 PSI, 3 Crioulos e 4 SRD com histórico de adenite clínica de no máximo 10 meses e no mínimo 2 meses antes da realização do aspirado de bolsa gútural. As coletas foram realizadas na região de Bagé-RS por sondagem guiada por endoscopia em sistema fechado, o líquido aspirado da bolsa gútural foi armazenado em tubos estéreis contendo meio de transporte e as amostras foram congeladas. Posteriormente estas amostras foram enviadas ao Centro de Biotecnologia-UFPel, para o laboratório de Bacteriologia.

Em laboratório, os aspirados de bolsa gútural foram homogeneizados, então, coletou-se por uma pipeta calibrada a 20µL de cada amostra separadamente, para serem semeadas em Ágar Sangue eqüino a 8% e incubadas a 37°C por um período de 48 horas para análise. As amostras que apresentaram crescimento bacteriano com colônias compatíveis a *Streptococcus* beta-hemolíticos foram submetidas a provas de Catalase e coloração de Gram. Dentre essas, as Gram positivas, catalase negativas foram semeadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) acrescentado 10% de Peptona e incubados a 37°C por 24 horas para as provas de fermentação de açúcares.

Utilizando 10µL do cultivo submeteu-se aos testes de fermentação dos açúcares, Rafinose, Sorbitol, Salicilina, Trealose, Manitol e Lactose. A leitura foi realizada após 24h de estufa a 37°C. (BARROW & FELTHAN, 1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira análise, 48h após o repique em Ágar Sangue, observou-se aspectos de colônia, como coloração e tipo de hemólise, então as amostras foram submetidas à coloração de Gram e provas de Catalase, como podem ser observadas no quadro 1.

AMOSTRAS	ASPECTO DE COLÔNIA		C	GRAM
	COR	H		
EQUI 1	Mel	β	-	Cocos, G+
EQUI 2	Mel	β	-	Cocos G+
EQUI 3	Mel	β	-	Cocos G+
EQUI 4	Mel	β	-	Cocos G+
EQUI 5	Cinza	Γ	+	Cocos G+
EQUI 6	1 ^a mel 2 ^a branca	1 ^a β 2 ^a γ	1 ^a - 2 ^a +	Cocos G+ Cocos G+
EQUI 7	1 ^a mel 2 ^a cinza	1 ^a β 2 ^a α	1 ^a - 2 ^a +	Cocos G+ Cocos G+
EQUI 8	Cinza	γ	+	Cocos G+
EQUI 9	1 ^a mel 2 ^a cinza	1 ^a β 2 ^a γ	1 ^a + 2 ^a +	Cocos G+ Cocos G+
EQUI 10	1 ^a mel 2 ^a cinza	1 ^a β 2 ^a γ	1 ^a + 2 ^a +	Cocos G+ Cocos G+

QUADRO1: Resultados da 1^a análise

Onde: H: tipo de hemólise C: prova da Catalase GRAM: coloração de Gram

As amostras dos equinos grifadas no quadro acima foram repicadas em BHI acrescidos a 10% de Peptona para posteriormente serem testadas quanto a características bioquímicas, conforme se demonstra na Tabela 1.

	Rafinose	Sorbitol	Salicilina	Trealose	Manitol	Lactose
Equi 1	-	+	-	-	-	-
Equi 2	-	-	-	-	-	-
Equi 3	-	-	-	-	-	+
Equi 4	-	+	-	-	-	+
Equi 6	-	-	-	-	-	+
Equi 7	-	-	-	-	-	-
Média	-	+ -	-	-	-	+ -

TABELA1: Resultados da fermentação de açúcares

Das 10 amostras processadas em todas se obteve crescimento bacteriano, sendo que 60% delas apresentaram colônias de *Streptococcus equi* e 60% crescimento de *Staphylococcus sp.* ao teste das cepas quanto à capacidade de fermentação dos açúcares com o fim de identificar bioquimicamente as subespécies de *Streptococcus equi*. Entretanto, observou-se a caracterização de cepas atípicas, as quais 28,6% fermentaram Sorbitol, 42,8% fermentaram Lactose, sendo que o restante dos açúcares testados não demonstraram fermentação. Resultados semelhantes a estes já foram descritos por GRANT, 1993.

As subespécies de *Streptococcus equi* são distinguidas em aquelas que fermentam Trealose e Lactose, típicas da subespécie *zooepidemicus* e as que fermentam apenas Salicilina são identificadas como subespécie *equi*, embasados nesses resultados pode-se acreditar que as cepas são atípicas, por não se encaixarem em nenhum dos grupos. Além disso, cuidados devem ser tomados durante a execução da técnica devido ao perigo de contaminação das amostras, já que é comum o isolamento de estreptococos beta-hemolíticos.

A identificação de portadores assintomáticos, tradicionalmente foi realizada utilizando a cultura bacteriológica, no entanto, cultivos de aspirados de bolsa gútural podem dar resultados negativos. A técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), frequentemente utilizada na atualidade, detecta o agente vivo ou morto pela amplificação do gene da proteína SeM, permitindo, quando associada à cultura bacteriana, a detecção de até 90% dos portadores (HARRINGTON, 2002). O PCR representaria uma técnica interessante a ser utilizada nessas amostras, uma vez que distinguiria a *S. equi* subespécie *equi*, e definiria os reais portadores, já que a *S. equi subespecie zooepidemicus* é isolada frequentemente, sendo que seu isolamento não define um portador de Adenite.

CONCLUSÃO

Considerando que todos os cavalos tinham um histórico recente de Adenite Eqüina, pode-se supor a possibilidade deles serem portadores e potenciais disseminadores do agente no ambiente. Mas se faz necessário um estudo mais aprofundado das cepas encontradas, já que não se encontrou cepas típicas de *Streptococcus equi* subespécie *equi*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROW, G. I., FELTHAM, R. R. A., **Manual of the identification of medical bacteria – Third Edition**. Cambridge University Press, 1993.

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

GRANT, S.T. et al. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical ***Streptococcus equi***. **Veterinary Record**, v.133, p.215-216, 1993.

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

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia Estatística www.ibge.gov.br 2007.

KUWAMOTO, Y. et al. Microplate sugar-fermentation assay distinguishes ***Streptococcus equi*** from other streptococci of Lancefield's group C. **Equine Veterinary Science**, v.12, n.2, p.47-49, 2001.

MORAES, C.M. **Caracterização fenotípica de *Streptococcus equi* e estimativa da reatividade cruzada de cepas isoladas de eqüinos da região sul do Rio Grande do Sul**, 2005. 40f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária, UFPel.

NEWTON JR, VERHEYEN K, TALBOT NC, et al. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carrier identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*. **Equine Vet J** 2000; 32:527-532.

SWEENEY CR, TIMONEY JF, NEWTON JR, et al. ACVIM Consensus Statement. *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. **J Vet Int Med** 2005; 19:123-134.

WALLACE, F.J.; EMERY, J.D.; CRIPPS, A.W.; HUSBANK, A.J. An assessment of mucosal immunization in protection against *Streptococcus equi* ('Strangles') infections in horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.48, p.139-154, 1995