

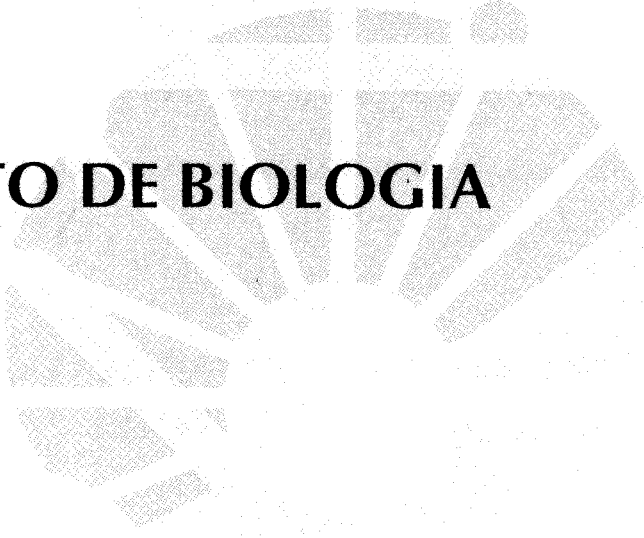
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

mestrado

BC/46944

IB/81714

INSTITUTO DE BIOLOGIA



T/UNICAMP

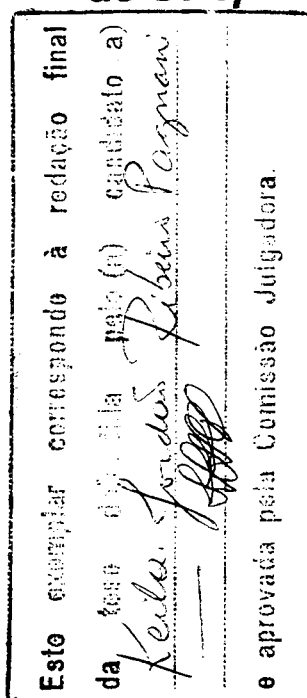
P148c

Universidade Estadual de Campinas



Keila Jordão Ribeiro Pagnani

**Características Fenotípicas e Genotípicas de Amostras
de *Streptococcus suis* Isoladas de Suínos
no Brasil**

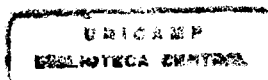


Tese apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção de Título
de Mestre em Genética e Biologia
Molecular na área de Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Gottschalk

2001



UNIDADE IB/85734
 N.º CHAMADA
 T/UNICAMP
 P148c
 V.
 L.
 TOMBO BC/ 46944
 PROC. 16.392107
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 02/11/01
 N.º CPD

II

CM00161045-5

**FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Pagnani, Keila Jordão Ribeiro

P148c Características fenotípicas e genotípicas de amostras de
Streptococcus suis isoladas de suínos no Brasil/Keila Jordão
 Ribeiro Pagnani. -- Campinas, SP:[s.n.], 2001
 100 fls;il,

Orientador: Antonio Fernando Pestana de Castro

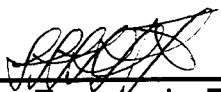
Co-Orientador: Marcelo Gottschalk

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. *Streptococcus suis*. 2. Suínos. 3. Microbiologia. I. Castro,
 Antonio Fernando Pestana de. II. Gottschalk, Marcelo. III.
 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Data da defesa: 08/08/2001

Banca Examinadora



Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro (orientador)



Prof. Dr. Waldemar Francisco

Profa. Dra. Liana Verinaud



Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

1.47.0

A todos os que me ajudaram com paciência e carinho na realização deste trabalho. Em especial aos meus pais, e a Antonio Carlos, meu esposo, amor e amigo que me proporcionou a verdadeira experiência de amar através de nossos queridos filhos Larissa, Carolina , Helena, e Antonio Neto.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, pela orientação, pelo conhecimento transmitido, pela amizade, carinho, apoio e confiança.

Ao Prof. Dr. Marcelo Gottschalk, da Faculdade de Medicina Veterinária de Saint Hyacinthe, Québec, Canada, pela co-orientação e pelos conhecimentos transmitidos.

À Prof. Dra. Lucila Costallat Ricci, pela generosidade, amizade e por me encaminhar para meu orientador Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro. Agradeço também pela participação em meu exame de qualificação.

A Empresa Consuitec pelo apoio no fornecimento de amostras e pela ajuda no trabalho de campo.

Ao Prof. Dr. Waldemar Francisco pela colaboração e boa vontade e pela participação na banca prévia e banca definitiva.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, por toda a sua ajuda na solução de problemas , além de sua participação na banca prévia e definitiva.

À Profa. Dra. Clarice Weis Arns pela pelo apoio, amizade e participação no exame de qualificação e banca prévia.

À Prof. Dra. Liana Verinaud pela colaboração e participação no exame de qualificação e banca definitiva.

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira por todo o apoio para a realização dos testes genéticos deste trabalho. Agradeço muito aos alunos Luciana de Hollanda e Marcelo Lancelotte pelo conhecimento, amizade e apoio.

A Mirtis, pela amizade boa vontade e competência na solução de problemas técnicos e administrativos .

Aos técnicos Evandro, Erivaldo e Marcos pelo apoio técnico indispensável à realização deste trabalho.

Ao amigo Gerson por todo o apoio na solução de problemas e idealização e realização de inúmeros trabalhos em equipe.

Às amigas Adriana, Angela, Cristiane, Fabiana, Juliana, Leila, e Michele pela amizade e ajuda.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia.

A CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro.

Em especial a Antonio Carlos, meu marido que em nenhum momento deixou de me dar apoio e incentivo.

Sumário

I - Índice de tabelas.....	IX
II - Índice de figuras.....	X
III - Resumo.....	XII
IV - Abstract.....	XIII
1 - Introdução.....	01
2 - Objetivos.....	15
3 - Material e Métodos.....	17
3.1 - Amostras.....	17
3.2 - Isolamento e Identificação.....	17
3.3 - Identificação Sorológica.....	20
3.3.1 - Produção de Antígenos para imunização.....	20
3.3.2 - Imunização para produção de antissoro.....	21
3.3.3 - Teste de Aglutinação com 2-mercaptoetanol.....	22
3.3.4 - Teste de Coaglutinação.....	22
3.3.5 - Teste de Reação Capsular.....	23
4 - Pesquisa de Fatores de Virulência.....	24
4.1 - Teste de Hemaglutinação.....	24
4.2 - Caracterização de amostras produtoras da Proteína “MRP”(“Muramidase Released Protein”)e de “EF”(“ Extracelular Factor”) através Immunoblotting.....	25
4.3 - Caracterização do gene codificador da Proteína “MRP”	

(“ Muramidase Released Protein”) do “EF”(“ Extracelullar Factor”) através de PCR.....	27
4.3.1 - Extração de DNA genômico.....	27
4.3.2-PCR para detecção do gene para EF.....	29
4.3.3 -PCR para detecção do gene para MRP.....	30
4.4 - Reação de RAPD.....	32
4.4.1 -Amostras utilizadas no teste de RAPD.....	33
4.4.2-Extração de DNA genômico e Técnica de RAPD.....	33
5 - Resultados.....	38
5.1 -Isolamento e Identificação.....	38
5.2 - Identificação Sorológica.....	42
5.2.1 - Teste de Aglutinação com 2-mercaptoetanol.....	42
5.2.2 - Determinação da dose ótima de antissoro para sensibilizar a amostra de <i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I.....	42
5.2.3 - Teste de Coaglutinação.....	43
5.2.4 - Teste de Reação capsular.....	46
5.3 - Pesquisa de Fatores de Virulência.....	47
5.3.1 - Teste de Hemaglutinação.....	47

5.3.2 - Identificação de amostras produtoras da Proteína MRP de EF e Suilisina pela Técnica de Immunoblotting.....	47
5.3.3 - Identificação do gene codificador da Proteína MRP e de EF pela Técnica de PCR.....	49
5.3.4 - RAPD.....	49
6 - Discussão.....	56
7 - Conclusão.....	66
8 - Apêndice.....	68
Referências Bibliográficas.....	74

I - Índice de Tabelas

TABELA 1 - Origem das amostras de <i>Streptococcus suis</i> isoladas: idade dos animais, sintomas, região, quadro clínico e achados de necrópsia no período de maio de 1998 a outubro de 1999.....	39
TABELA 2 - Recíproco da melhor diluição utilizada para cada antissoro na sensibilização da amostra de <i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I.....	42
TABELA 3 – Distribuição das 51 amostras de <i>Streptococcus suis</i> , segundo o resultado de sorotipagem por Coaglutinação, isoladas de suínos. Campinas,SP,Brasil,2000.....	44
TABELA 4 - Resultado dos Testes de Hemaglutinação com diversas hemácias e correlação com o sorotipo.....	47
TABELA 5 - Resultado do Teste de Immunoblotting para detecção de “MRP”, “EF” e Suilisina de 42 amostras de <i>S. suis</i> isoladas. Campinas,SP,Brasil.2000.....	48

II - Índice de Figuras

FIGURA 1 - Colônias de <i>Streptococcus suis</i> apresentando hemólise alfa em Columbia ágar a 5% de sangue bovino.....	41
FIGURA 2 - Provas Bioquímicas Sistema Api Strep.....	41
FIGURA 3 – Gráfico indicando a frequência de distribuição percentual das amostras de <i>S.suis</i> , segundo os sorotipos obtidos nos testes de Coaglutinação, isoladas de suínos no período de maio de 1998 a outubro de 1999.....	45
FIGURA 4 - Teste de Reação Capsular positivo para amostra de <i>Streptococcus suis</i> sorotipo 2.....	46
FIGURA 5 - Resultados do teste de PCR para o gene codificador de "EF"	50
FIGURA 6 - Resultados do teste de PCR para o gene codificador de "MRP"	50
FIGURA 7 - Resultados do teste de PCR para o gene codificador de "MRP"	51

FIGURA 8 - Amostras padrão amplificadas com o iniciador OPB7.....	52
FIGURA 9 - Amostras padrão amplificadas com o iniciador OPB10.....	53
FIGURA 10 - Amostras padrão amplificadas com o iniciador OPB17.....	54
FIGURA 11 – Dendograma de Dissimilaridade formado pelo Programa POPGENE e Fatores de Virulência associados.....	55

III- Resumo

Infecções causadas por *Streptococcus suis* são muito comuns em países onde a indústria de carne suína é desenvolvida. Estas infecções estão relacionadas a casos clínicos de broncopneumonia, meningite, artrite, pericardite, miocardite, endocardite, poliserosite fibrinosa, septicemia, rinite, e aborto. Esta bactéria também foi descrita como patógeno de ruminantes e humanos. No Brasil há muitas evidências clínicas da existência de doença causada por *S.suis* afetando mais de 50% das granjas em regiões como São Paulo, Minas Gerais e Paraná. No presente estudo foram isoladas 51 amostras de *S.suis* de granjas dos estados acima referidos coletadas de diferentes casos clínicos citados anteriormente. A sotipagem das 51 amostras isoladas mostraram os seguintes resultados: 30 (58,8%) foram classificadas como sorotipo 2, 11 (21,6%) das amostras como sorotipo 3, 7 (13,72%) como sorotipo 7, 2 (3,92%) como sorotipo 1 e 1 amostra como pertencente ao sorotipo 14 (1,96%). As amostras isoladas foram testadas para a produção de duas importantes proteínas: MRP e EF através do teste de Immunoblotting e PCR. Nestes testes as amostras isoladas exibiram todos os padrões fenotípicos descritos na literatura. Foi realizado também o teste de Rapd para investigar a relação genética de todas as amostras de *S.suis* pertencentes ao sorotipo 2 e os resultados obtidos demonstraram uma distribuição clonal destas amostras.

IV- Abstract

Streptococcus suis infection in swine is common in all countries where hog production is well developed. This infection has been associated with bronchopneumonia, meningitis, arthritis, pericarditis, myocarditis, endocarditis, fibrinous polyserositis, septicemia, rhinitis, and abortion. *Streptococcus suis* has also been described as a pathogen for ruminants and humans.

In Brazil there are several evidences about the existence of *Streptococcus suis* disease in pigs affecting more than 50% of farms in States of São Paulo, Minas Gerais, and Paraná. In the present research 51 strains of *S. suis* isolated from piggeries of the States mentioned before were collected from different diagnostic cases as septicemia, meningitis, arthritis and pneumonia and been recovered in pure culture or as the predominant organism from porcine tissues. From the total of the examined strains the following results were obtained: 30 (58,8%) were serotype 2, 11 (21,6%) of the strains were serotype 3, 7 (13,72%) were serotype 7, 2 (3,92%) were serotype 1 and 1 (1,96%) strain belonged to serotype 14, showing the prevalence of serotype 2. The strains were also tested for Reference strains of *S. suis* serotype 1 to 8 were kindly sended by Prof. Dr. Marcelo Gottschalk from GREMIP – a reference Laboratory for *S. suis* identification and serotyping at Saint-Hyacinthe- University of Québec- Canadá. For capsular typing only capsulated strains were typed and antisera raised in rabbits against all refernces straions 1 to 8. The coaglutination teste was used for serotyping and the capsular

reaction test was used for the antisera control. The strains were also tested for the presence of two important proteins that are seemed to be virulence factors: MRP ("Muramidase Released Protein") and EF ("Extracellular factor") by Immunoblotting and PCR. The RAPD test was used for investigating the genetic relationships of all strains belonged to *S. suis* serotype 2. The results showed a clonal distribution of these strains. A dendogram was constructed based on POPGENE Program showing a similarity of 40% of the brazilian strains with an European strain.

1- Introdução

Várias espécies de estreptococos podem ser encontradas em amígdalas, intestinos e fezes de suínos clinicamente saudáveis e algumas destas podem ser patogênicas.

Além das espécies consideradas como parte da microflora nos suínos, existem: *Streptococcus intestinalis* (ROBINSON et al.1988), *Streptococcus hyointestinalis* (DEVRIESE et al.1988), *Streptococcus suis*, *Streptococcus alactolyticus* e *Streptococcus bovis* (DEVRIESE et al.1994 b). Infecções causadas por *Streptococcus suis* têm sido diagnosticadas em vários países onde a indústria de carne suína tem expressão. Este microrganismo está implicado em casos de meningite e septicemia, porém agora é reconhecido como responsável por outras infecções em suínos. Também foi descrito como patógeno para ruminantes, cavalos e humanos (HIGGINS et al.1995).

Etiologia e prevalência

Um novo grupo de estreptococos alfa-hemolítico derivado de infecções septicêmicas em suínos foi caracterizado bioquimicamente e sorologicamente, pela primeira vez, por Moor entre 1956 e 1963, como novos grupos de Lancefield: R, S, RS, e T (de MOOR,1963).

Na Inglaterra, ELLIOT (1966) sugeriu que o grupo S de Moor era similar ao grupo PM *Streptococcus* e que ambos pertenciam ao grupo D de Lancefield. Foi então proposto o nome de *Streptococcus suis* tipo capsular 1.

Em 1975, WINDSOR e ELLIOT isolaram outros estreptococos provenientes de suínos que correspondiam ao grupo R de Moor e o nomearam *S. suis* tipo 2. O tipo 1 estava associado a quadros de meningite em suínos recém nascidos, enquanto que o tipo 2 ocorria em qualquer faixa etária. Amostras isoladas que reagiam com soros contendo anticorpos específicos para o tipo 1 e 2, foram designadas tipo capsular ½ (originalmente grupo RS) .

CLIFTON-HARDLEY em 1984 descreveram o isolamento de estreptococos do grupo T obtido através de “swab” de amígdalas, “swab” vaginal e de prepúcio. Este grupo T foi designado como *S. suis* tipo 15 (GOTTSCALK et al.1989).

Entre 1983 e 1995, um total de 32 novos tipos capsulares foram descritos em vários países completando 35 sorotipos (PERCH et al.1983 ; HIGGINS et al.1995). As amostras padrão isoladas foram obtidas de suínos doentes com exceção do tipo capsular 14, isolado de humanos; tipos 17,18,19 e 21 isolados de suínos saudáveis; os tipos 20 e 31 isolados de bovinos doentes e o tipo 33 isolado de ovelhas doentes (GOTTSCALK et al. 1989).

A designação de *S.suis* como uma nova espécie bacteriana foi oficializada por KILPER-BALZ & SCHLEIFER (1987). Esta espécie se mostrou geneticamente distinta e demonstrou relações não específicas com outras espécies de estreptococos examinadas (BENTLY et al.1991).

Há grande diversidade genética entre membros da espécie *S.suis* (HAMPSON et al.1993; HAREL et al. 1994) o que deve ser

levado em conta no diagnóstico, prognóstico e também no controle da doença.

Descrições de infecções causadas por *S. suis* foram publicadas por JANSEN & VAN DORSSSEN (1951) na Noruega e por FIELD et al.(1954) na Inglaterra. Desde então o *S. suis* tem sido descrito em todos países, onde a indústria de carne suína é importante, e, por mais de uma década, infecções associadas a este microrganismo têm sido observadas tanto em granjas de manejo tradicional, quanto em granjas modernas de criação intensiva.

Na maioria dos países, o sorotipo mais comum isolado em suínos doentes é o sorotipo 2. Na Escandinávia o sorotipo 7 tem predominado durante vários anos (PERCH et al.1983; SIHVONEN et al.1988), porém em 1990, o sorotipo 2 foi diagnosticado com maior frequência do que o sorotipo 7 (NIELSEN et al.1975). No Japão, o sorotipo 2 foi mais prevalente (28%) que o sorotipo 7 (11%) (KATAOKA et al.1993). A maioria das amostras de *S.suis* isoladas de suínos doentes pertence a um número limitado de sorotipos, normalmente compreendidos entre os sorotipos 1 a 8 (GALINA et al.,1992; HIGGINS & GOTTSCHALK,1996; HOGG et al., 1996; KATAOKA et al. 1993; PRIETO et al.1994; REAMS et al. 1996).

Algumas amostras pertencentes a sorotipos menos comuns têm sido associadas com casos de infecções severas. O sorotipo 9 de *S.suis* foi associado a quadros de septicemia, pneumonia, e meningite em suínos recém-nascidos (ORR et al.1989;GOGOLEWSKI et al.1990).

MACLENNAN et al. (1996) descreveram o primeiro isolamento do sorotipo 14 na Grã-Bretanha. Segundo os autores, embora o sorotipo 2 tenha predominado (62%), 25% das amostras isoladas pertenciam ao sorotipo 14, que afetava suínos de 2 a 4 semanas, causando artrite, meningite e septicemia. No mesmo ano, HEALTH et al.(1996), descreveram o isolamento do sorotipo 14 em 22 fazendas com achados clínico-patológicos compatíveis aos associados com o sorotipo 2.

O sorotipo 2, no entanto, pode ser isolado de suínos clinicamente saudáveis, mas a prevalência geralmente é baixa. Autores ingleses descreveram que em 4 rebanhos, com nenhum antecedente de sinais clínicos da doença, 2 foram negativos para sorotipo 2, um rebanho demonstrou prevalência de 1,5 %, e o outro prevalência de 20% (CLIFFTON-HARDLEY et al.1984). Este fato está de acordo com estudos canadenses, onde foi isolado o sorotipo 2 em 12% dos rebanhos que não demonstravam sinais clínicos de infecção (BRISEBOIS et al. 1990).

HOGG et al.(1996), observaram uma maior prevalência dos sorotipos 9 a 34 em isolamentos a partir de “swabs” nasais e vaginais, do que em isolamentos obtidos de tecidos de animais doentes. É notório que vários sorotipos podem estar presentes em um mesmo animal. Em um estudo, 31% de suínos apresentaram em cavidade nasal somente um sorotipo, 38% apresentaram 2 ou 3 sorotipos, e 6% apresentaram mais que 4 sorotipos (MONTER FLORES et al.1993).

Epidemiologia

O habitat natural de *S.suis* é o trato respiratório superior, particularmente, amígdalas e cavidade nasal, trato genital e digestivo de suínos (CLIFTON-HARDLEY et al.1986b; DEVRIESE et al. 1991; ROBERTSON et al.1991; HOGG et al.1996). O *Streptococcus suis* pode ser isolado de várias espécies animais incluindo aves, fato este que pode trazer novos conceitos aos aspectos epidemiológicos da infecção.

A transmissão da infecção entre rebanhos ocorre através de portadores sãos. A introdução de novos animais (matrizes, reprodutores) em um rebanho suíno não infectado resulta comumente em infecção de recém-nascidos ou de animais em fase de crescimento. As matrizes podem infectar sua prole pela via respiratória (CLIFTON-HARDLEY et al. 1986 b), mas por ser encontrado no trato genital e digestivo, o *S. suis* pode infectar os suínos no momento do nascimento e na fase de amamentação (ROBERTSON & BLACKMORE ,1989a; ROBERTSON et al. 1991; DEE et al. 1993). Embora recém-nascidos sejam portadores, somente alguns deles desenvolvem a doença após o desmame (PIJOAN, 1996). *S.suis* parece ser facilmente transmitido via fômites (ROBINSON et al.1991; DEE & COREY ,1993).

ENRIGHT et al.(1987) demonstraram que moscas agem como vetores mecânicos para os sorotipos 2 de *S.suis*, por pelo menos 5 dias e podem contaminar materiais e ambientes ou instalações, onde os animais são alimentados, por um período de até 4 dias, podendo

também, disseminar a doença para propriedades próximas. A importância das aves e outras espécies de animais, como reservatórios ou vetores da infecção, ainda não foi determinada. A transmissão por seres humanos parece ser possível (SALLA et al.1989).

Estudos sobre a resistência do patógeno no meio ambiente têm sido relatados somente com o sorotipo 2 de *S.suis*. Este microrganismo sobrevive em locais contendo umidade a uma temperatura mínima de 4° C durante uma a duas semanas. Em ensaios realizados através da inoculação experimental de fezes em laboratório, o *S. suis* demonstrou resistir a temperaturas de 0°C, 9°C, e 22°C a 25°C, por 104, 10, e 8 dias respectivamente (CLIFTON-HARDLEY & ENRIGHT, 1984).

Sinais Clínicos e Lesões

Mesmo quando um rebanho apresenta 100% de animais portadores, a incidência da doença varia periodicamente e é normalmente menor que 5%. CLIFTON-HARDLEY et al. (1984) demonstraram que os animais afetados estão entre a quinta e a décima semana de vida. REAMS et al. (1996) descreveram casos de suínos infectados de 1 a 32 semanas, sendo que 75% dessa população tinha 16 semanas de vida ou menos.

O primeiro sinal clínico observado em infecções causadas por *S. suis* é o aumento de temperatura retal, em mais de 42,5°C. Posteriormente a hipertermia observa-se bacteremia ou pronunciada

septicemia que, quando não tratadas, podem persistir por mais de 3 semanas. Durante este período, ocorre uma febre flutuante e diferentes graus de inapetência e depressão do animal (CLIFTON - HARDLEY et al.1984). Em casos agudos o animal pode morrer subitamente, sem nenhum sinal clínico.

A meningite é a manifestação mais comum e o diagnóstico presuntivo se baseia neste dado. Os primeiros sinais nervosos incluem: incoordenação, adoção de posições atípicas, que progridem para incapacidade de se manter em pé, evoluindo para opistótono, convulsões e nistágmo (CLIFTON-HARDLEY et al.1986a). Podem ser observadas ainda, outras manifestações nas infecções por *S.suis*, tais como: endocardites, rinites, abortos, vaginites (SANFORD & TILKER, 1982; SIHVONEN et al. 1988).

Em um estudo retrospectivo de 256 casos associados a *Streptococcus suis*, dos sorotipos de 1 a 8 e ½ REAMS et al.(1996) indicaram que nem os sinais clínicos, nem as lesões estavam associados aos sorotipos específicos. No entanto em um surto causado por *S.suis* sorotipo 9, suínos recém nascidos morriam da doença e 100% apresentavam artrite, 91% meningite, 75% pneumonia intersticial e 42% endocardite, e de acordo com estes autores, o sorotipo 9 poderia produzir padrões de lesões distintos daqueles descritos para o sorotipo 2 (VASCONCELOS et al.1994).

Algumas amostras de certos sorotipos parecem apresentar características de virulência particulares. Isto explicaria o porque de casos de pneumonia severa pelo sorotipo 3 na Argentina (VENA et al.

1991) ou a recente difusão do sorotipo 14 na Grã-Bretanha (HEATH et al.1996), embora já se soubesse que o sorotipo 14 havia infectado humanos (GOTTSCALK et al. 1989). As lesões microscópicas significativas se limitam normalmente aos pulmões, cérebro, coração e articulações (REAMS et al. 1994).

As lesões predominantes em suínos são broncopneumonias supurativas, meningite neutrofílica, encefalite e epicardite supurativa ou mucopurulenta (SANFORD & TILKER,1982; ERICKSON et al.1984; REAMS et al.1994,1996).

Casos raros de pneumonia fibrinohemorrágica e necrose septal tem sido observadas e sugerem que algumas amostras de *S.suis* podem causar lesão vascular (REAMS et al.1995).

Algumas lesões raras como: miocardite necrótica e hemorrágica, e meningoencefalite subaguda , foram descritas por SANFORD (1987a,b).

Patogênese

Algumas etapas envolvidas na patogênese seriam: entrada da bactéria no sangue através das amígdalas, englobamento da bactéria por monócitos, transporte da bactéria ao fluído cerebrospinal via plexo coróide, e estímulo da produção de citocinas pelos monócitos e macrófagos o que leva a um infiltrado inflamatório do sangue ao líquido cerebrospinal (WILLIAMS,1990; CHANTER et al.,1993).

Não há relatos de produção experimental de pneumonia em suínos utilizando *S.suis*. Um estudo demonstrou que todos os

sorotipos 2 de *S.suis*, isolados de suínos, aderem a fragmentos de tecido pulmonar congelado de suínos recém-nascidos e que, as cepas isoladas de casos de pneumonia aderem mais do que as isoladas de casos de meningite (GOTTSCALK et al., 1991). HAATAJA et al.(1993) demonstraram a adesão de amostras de *S.suis* hemaglutinantes a secções de faringe de suínos.

A patogênese do *S.suis* é influenciada sobretudo pelo estado imune do hospedeiro, fatores ambientais e fatores de virulência do agente infeccioso. Em anos anteriores, as pesquisas abordaram diferentes e possíveis fatores de virulência de *S.suis*: fímbrias (JACQUES et al.1990), hemaglutinina (GOTTSCALK et al.1990; HAATAJA et al.1993); material capsular (ELLIOT & TAI.1978; QUESSY et al. 1994c; SALASIA et al.1994; CHARLAND et al.1996; KATSUMI et al. 1996), parede celular e proteínas extracelulares (VECHT et al. 1991,1996) e hemolisina (GOTTSCALK et al.1995; JACOBS et al.1996). Em várias espécies bacterianas, fímbrias e hemaglutininas têm sido associadas à adesão e, HAATAJA et al.(1993), relataram que atividade de *S.suis* detectada por hemaglutinação pode auxiliar na ligação da bactéria aos tecidos de suínos, porém sugere a existência de outros mecanismos de adesão. Duas proteínas de *S.suis* sorotipo 2 foram identificadas como sendo fatores de virulência importantes: “muramidase released protein” (M.R.P.) e o fator extracelular (E.F) que é descrito por VECHT et al.(1991).

Variantes dessas proteínas foram mais tarde descritas por

estes autores em 1996, que propôs uma série de fenótipos que poderiam ser encontrados em vários sorotipos. Uma vez que essas proteínas por vezes não estão presentes em todas as amostras virulentas de *S.suis* isoladas, tem sido aventada a hipótese de que essas amostras possuam outros fatores de virulência (QUESSY et al.1994a; GALINA et al.1996).

Uma hemolisina denominada Suilisina tem sido associada à virulência de amostras do tipo capsular 2. Anticorpos contra essa hemolisina induzem proteção em camundongos e suínos contra o desafio experimental com a bactéria (JACOBS et al.1996). Assim como, M.R.P. e E.F. a Suilisina não é produzida por todas amostras virulentas de *S. suis*.

Finalmente, alguns autores puderam descrever novos possíveis fatores de virulência como: uma adesina que se liga a IgG (SERHIR et al.1993), a galactosil-(alpha 1-4) galactose (TIKKANEN et al.1996) e uma proteína adicional que se liga à albumina (QUESSY et al.1997). Estas proteínas de ligação podem participar do estabelecimento da infecção porém, o seu envolvimento ainda não é considerado essencial na patogênese da infecção.

IGLESIAS et al.(1992) concluíram que a doença clínica associada a *S.suis* sorotipo 2 era aumentada por infecção concomitante com o vírus da pseudorraiva. Mais tarde sugeriu-se que a Síndrome Reprodutiva e Respiratória Viral Suína (S.R.R.V.S.) predispõe a infecção e doença por amostras virulentas de *S. suis* sorotipo 2 (GALINA et al.1994). No entanto, COOPER et al.(1995)

obtiveram resultados diferentes e concluíram que o vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Viral Suína (S.R.R.V.S). não potencializou a infecção por patógenos bacterianos comuns, embora tenha induzido consistentes sinais clínicos, viremia, soroconversão e lesões microscópicas nos tecidos de órgãos afetados.

Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo de infecções por *S. suis* é baseado nos sinais clínicos, idade do animal, e lesões macroscópicas. A confirmação é realizada por isolamento do agente infeccioso e lesões microscópicas nos tecidos. Quando possível, é recomendada a coleta de mais de uma colônia alfa-hemolítica de diferentes cultivos, obtidos do mesmo animal, pois vários sorotipos e amostras de *S. suis* podem estar envolvidos (REAMS et al.1996). AMASS (1997) sugere a realização de cultura periódica do fluído cerebroespinal de suínos que apresentem meningite, para se assegurar que o sorotipo de *S. suis*, que esteja causando surtos repetidos, não tenha se modificado. Este procedimento é de grande auxílio quando se considera a vacinação

Considerando-se que o *S. suis* pode ocorrer em tecido pulmonar saudável (MWANICK et al.1994) é preferível isolar-se o patógeno a partir de amostras coletadas de outros órgãos, em casos de septicemia. Nos casos de processos respiratórios é freqüente o isolamento de outros agentes como: *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, ou *Actinomyces pyogenes*, porém ainda é muito freqüente a obtenção de culturas puras de *S. suis*

(HIGGINS et al.1990a; GALINA et al.1992).

A identificação bioquímica do *S. suis* é possível com um número mínimo de testes (HIGGINS & GOTTSCHALK ,1990). DEVRIESE et al.(1991) sugeriram a utilização de somente duas provas para amostras isoladas de suínos, ou seja, a produção de amilase (+) e Voges-Proskauer (acetoína) (-). É preciso ressaltar que algumas amostras isoladas do trato genital apresentam várias características diferentes como a dependência de CO₂ para crescimento inicial em meios de cultura (DEVRIESE et al.1991).

Amostras isoladas de cães diferem de amostras isoladas de suínos, com relação à fermentação do manitol (DEVRIESE et al.1992b). Todavia, a sorotipagem é ainda uma importante ferramenta do procedimento diagnóstico de rotina. Esta pode ser realizada através de diferentes provas, mas muitos laboratórios usam, pela sua simplicidade e sensibilidade, a técnica de coaglutinação. Desde que, a maioria das amostras isoladas tipáveis pertençam aos tipos capsulares 1 a 8 e ½ é aconselhável aos laboratórios de diagnóstico usarem somente antissoros correspondendo a estes sorotipos e enviar amostras não-tipáveis por este esquema a um laboratório de referência (HIGGINS & GOTTSCHALK,1996; HOGG et al.1996), uma vez que a infra-estrutura para a sorotipagem total não é acessível a laboratórios de rotina. Assim algumas amostras apresentam reação cruzada com mais de um antissoro, nos testes de coaglutinação e de reação capsular. Tais reações cruzadas podem ser removidas por absorção de antissoro mas no caso do tipo ½ esta conduta não

elimina a reatividade cruzada, daí o fato deste sorotipo ser assim designado (GOTTSCALK et al.1989; HAMPSON et al.1993).

Técnicas que permitam determinar a heterogeneidade genética das amostras são de grande valia tanto para se confirmar não só a origem da infecção como para ter-se certeza da inclusão de uma determinada amostra em uma vacina. A análise plasmidial permite a diferenciação de algumas amostras de *S. suis* capsular tipo 2 (CANTIN et al.1992). Portanto, este tipo de avaliação permite demonstrar a diversidade existente entre amostras pertencentes ao mesmo sorotipo (MONGOLLON et al.1990).

BEAUDOIN et al.(1992) confirmaram a existência de diversidade genética entre amostras de *S. suis* isoladas e relataram que até mesmo amostras obtidas de animais sãos apresentam heterogeneidade, por outro lado, a maioria das amostras isoladas em casos de septicemia freqüentemente são mais homogêneas neste aspecto. HAMPSON et al. (1993) usaram para o estudo da diversidade genética, o teste de Hibridização DNA -DNA (KILPER-BALZ & SCHLEIFER,1987), mas não observaram tendência de diferenciação genética significativa entre as amostras isoladas obtidas de animais sãos e de animais doentes, bem como de animais que apresentavam outras patologias. Segundo VECHT et al. (1996), não há nenhuma marca comum de virulência a todos os sorotipos de *S. suis*. Diferentes testes sorológicos para detecção de anticorpos contra *S. suis* têm sido avaliados. Estudos recentes mostraram que o teste de ELISA utilizando antígenos capsulares purificados apresentam

maior especificidade (DEL CAMPO SEPULVEDA et al.1996; KATAOKA et al.1996). No entanto a sorologia é mais importante e útil para estudos de vacinação do que para fins diagnósticos.

No Brasil existem várias evidências clínicas da ocorrência de patologias causadas por *S. suis*. Estas incluiriam meningite, septicemia e artrite, principalmente, ocorrendo nestas formas ou infecções sub-clínicas em mais de 50% das granjas do Estado de São Paulo, trazendo sérios prejuízos à suinocultura.

Se desconhece a existência de laboratórios no Brasil que realizem testes de rotina para isolamento e identificação da bactéria e nada se sabe sobre os sorotipos de *S. suis* que ocorrem no Brasil. Apesar da predominância mundial dos tipos 1 a 8, variações têm sido encontradas em alguns países. Portanto, é importante averiguar-se qual a distribuição dos sorotipos e respectivos fatores de virulência, das amostras de *S. suis* isoladas no Brasil, uma vez que a ocorrência da bactéria em nossos rebanhos já é uma realidade, confirmada por investigações iniciais em nosso laboratório (dados não publicados), com o isolamento de 8 amostras de materiais provenientes de granjas da região, que foram gentilmente coletados pela Consuitem, Campinas, SP.

Diante do exposto, da importância da infecção causada por *S.suis* e da falta de dados sobre as características da bactéria em nosso meio, este projeto tem os seguintes objetivos enumerados a seguir.

2 - Objetivos

2.1.- Utilizando meios seletivos, isolar o *S.suis* de suínos com quadros compatíveis com enfermidades causadas pelo mesmo.

2.2.- Estabelecer testes bioquímicos simplificados para a identificação do *S.suis*.

2.3.- Preparar antissoros contra os sorotipos de *S. suis* de 1 a 8, e desenvolver provas de coaglutinação para identificação sorológica preliminar das amostras isoladas.

2.4.- Determinar a frequência dos sorotipos isolados de animais doentes.

2.5.- Estudar as características hemaglutinantes das amostras de *S. suis* isoladas.

2.6.- Identificar a presença dos fatores MRP ("Muramidase Released Protein") e EF ("Extracelular Factor"), além das propriedades hemolíticas (Sulisinina) nas amostras isoladas.

2.7.- Comparar os resultados obtidos nos itens 2.4, 2.5 e 2.6 das amostras isoladas, com os descritos na literatura para as amostras padrão.

2.8 Comparar as amostras através da análise genética (RAPD), podendo assim estabelecer uma relação clonal entre elas.

3- Material e Métodos

3.1. Amostras

Foram utilizadas neste estudo amostras padrão de *S. suis* dos sorotipos 1 a 8, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Gottschalk da Faculdade de Medicina Veterinária de “Saint-Hyacinthe” da Universidade de Montreal, Quebec, Canadá, incluindo ainda 51 amostras provenientes de casos de septicemia, pneumonia, endocardite e artrite, a partir de material coletado de granjas dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná e isoladas no Laboratório 2 do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP. Todas as amostras foram submetidas a testes bioquímicos e sorológicos descritos a seguir.

3.2. Isolamento e identificação bioquímica das amostras.

A coleta foi feita através de “swabs” estéreis a partir das meninges, amígdalas, articulações, coração e outros órgãos internos, de animais doentes submetidos à necrópsia

Os materiais coletados foram semeados em placas contendo Columbia Ágar (DIFCO) adicionado de 5% de sangue bovino e SR-126 (suplemento seletivo para *Streptococcus*-Oxoid) incubado a 37°C por 18 horas.

As colônias suspeitas, que apresentavam hemólise alfa em Columbia ágar-sangue bovino, foram examinadas e subcultivadas em

meio de Todd Hewitt (THB-Difco), pois somente culturas com crescimento homogêneo neste meio de cultura podem ser sorotipadas. Para provas de identificação bioquímica pegou-se uma colônia da amostra em estudo semeada em Columbia ágar sangue bovino a 5% efetuando-se os testes de: produção de amilase, teste de Voges-Proskauer (VP), reação de VM, crescimento em TSA com 6,5% de NaCl, produção de ácidos a partir de vários carboidratos (inulina, salicina, trealose, lactose, sacarose, sorbitol e manitol). A verificação da produção de ácido a partir dos substratos acima foi feita pela semeadura das amostras de *S. suis* em água peptonada (Proteose Peptone-Difco) com indicador de Andrade, sendo a leitura realizada 48 horas após a incubação a 37°C em aerobiose.

1) Produção de Amilase:

Para este teste a colônia suspeita foi semeada em um meio sólido contendo Proteose Peptone (DIFCO), extrato de carne (DIFCO) e amido (DIFCO) e após 24 horas de crescimento a 37°C adicionou-se sobre o crescimento algumas gotas de uma solução de lugol. O meio fica azulado e quando a colônia é amilase positiva o local do crescimento apresenta ausência de coloração pela degradação do amido. O *S.suis* é amilase positiva.

2) Teste de Voges – Proskauer (VP) e Vermelho de Metila (VM) :

As amostras testadas foram semeadas em meio de Clark e Lubs

distribuídos em tubos de ensaio com 5ml e deixadas a 37°C por 4 dias. Após este período utilizou-se apenas 1ml do crescimento ao qual adicionou-se 0,6ml de uma solução alcoólica de α -naftol e 0,2ml de uma solução a 40% de KOH. Agitou-se. As reações positivas (coloração rósea) apareceram de 2 a 5 minutos. Os 4 ml restantes da reação de VP foram utilizados para a reação de VM a qual adicionou-se 4 gotas de uma solução hidroalcoólica de vermelho de metila. A cor vermelha indica um resultado positivo e a cor amarela negativo. O *S.suis* é caracterizado pelas reações VP (-) e VM (+).

3) Crescimento em TSA (“*Tryptic Soy Ágar*”) com 6,5% de NaCl:

As amostras testadas foram semeadas em TSA e incubadas a 37°C por 24 horas. Amostras que crescem neste meio são ditas halotolerantes como *Staphylococcus aureus*. O *S.suis* não apresenta crescimento neste meio.

4) Fermentação de carboidratos:

O indicador escolhido foi o de Andrade por apresentar uma viragem nítida para o vermelho, em pH abaixo de 7,0. Esta solução foi filtrada e depois conservada ao abrigo da luz. Foi adicionado 1% deste indicador em água peptonada e ajustou-se o pH para 7,4 - 7,6, seguindo-se esterilização por 20 minutos a 120°C. Foi então adicionada à água peptonada uma solução de carboidrato estéril a

20% de modo a obter-se uma concentração final de 0,5%.

Todas as amostras foram confirmadas pelo Sistema Rápido de Identificação API20 STREP (bioMérieux) (Figura 2)

3.3. Identificação sorológica

Para a identificação sorológica das amostras de *S. suis* foram preparados os antissoros contra os sorotipos de 1 a 8. Quanto aos outros sorotipos ($\frac{1}{2}$ e 9 a 35) foram gentilmente sorotipados pelo Prof. Dr. Marcelo Gottschalk . Para o preparo dos antissoros 1 a 8 de *S.suis* foram realizados os seguintes passos: produção de antígenos para imunização, imunização para produção de antissoro, teste de aglutinação em tubo com 2-mercaptoetanol e teste de reação capsular que são descritos abaixo.

3.3.1. Produção de antígenos para imunização

As amostras padrão dos sorotipos de *S. suis* 1 a 8 foram semeadas em placas de Columbia ágar sangue (5% de sangue bovino + SR-126 - Oxoid) em aerobiose e a 37°C por 18 horas. Cada amostra foi então semeada em Todd Hewitt (Difco Laboratories, Detroit, Mich) por 18 horas a 37°C em aerobiose. Após este passo, foram feitas mais 3 passagens em 10 ml caldo de Todd Hewitt (DIFCO), cada uma representada por 6 horas de incubação a 37°C. Após as duas últimas passagens de 6 horas, as culturas foram mantidas a 4°C por 18 horas. Finalmente 5 ml da última subcultura de

6 horas foi inoculada em 50 ml de caldo Todd Hewitt, pré-aquecido, o qual foi incubado por 12 horas. Formalina foi adicionada até uma concentração final de 0,3% e a cultura permaneceu por 18 horas à temperatura ambiente. As culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 30 minutos, lavadas com PBS e ressuspensas em PBS com 0,3% de formalina (pH=7,2) e deixadas a temperatura ambiente por 18 horas. A suspensão formolada foi ajustada a uma concentração final de 10^9 bactérias/ml contadas na câmara de Neubauer e então utilizada para a imunização. (GOTTSCHALK & HIGGINS, 1993)

3.3.2- Imunização para a produção de antissoro

Foi usada a metodologia descrita por SEHIR et al.(1992) sendo utilizados para a imunização coelhos albinos de aproximadamente 3 kg de peso. Antes de se fazer a imunização o soro de todos os animais foi coletado, sendo parte guardada como pré-soro (controle) e outra submetida ao teste de aglutinação e coaglutinação para se comprovar a ausência de anticorpos anti-*S.suis*. Os animais foram inoculados pela via intravenosa 3 vezes por semana durante quatro semanas com doses crescentes da suspensão (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 ml). Dez dias após a última inoculação, amostras de sangue foram coletadas dos animais imunizados, sendo então submetidas ao teste de aglutinação em lâmina. Quando foi observado aglutinação em títulos iguais ou superiores a 1:64, foi realizada a sangria branca dos animais. O soro obtido foi centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos, aquecido a 56°C por 30 minutos e estocado a -20°C até a utilização.

Somente foram utilizados para o teste de coaglutinação antíssoros que apresentaram título maior ou igual a 1:32 no teste de aglutinação em tubo com 2-mercaptoetanol.

3.3.3- Teste de aglutinação em tubo com 2-mercaptoetanol

Os antígenos utilizados na imunização dos coelhos foram titulados utilizando o teste de aglutinação em tubo com 2-mercaptoetanol, segundo MITTAL et al. (1984). Este teste detecta as frações de IgG que reagem com a proteína A do *Staphylococcus aureus* no teste de coaglutinação.

O antissoro foi inativado a 56°C por 30 minutos e diluições seriadas de 1:2 até 1:128 foram preparadas com solução salina. Volumes iguais de antígeno e soro foram utilizados em cada tubo. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas e somente antíssoros com título de 1:32 foram utilizados no teste de coaglutinação. Para cada diluição seriada foi feito um teste paralelo no qual foi utilizada solução salina com 0,05M de 2-mercaptoetanol.

3.3.4. Teste de Coaglutinação

Para este teste descrito por GOTTSCHALK et al, 1989, foi utilizada uma amostra bacteriana de *Staphylococcus aureus* (Cepa Cowan, rica em proteína A) que foi cultivada por 16 horas em 100 ml de caldo Trypticase (Oxoid). A cultura foi centrifugada e o sedimento

ressuspenso em 3 ml de solução salina. Uma alíquota de 50 µl de antissoro foi adicionada a esta suspensão. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente a mistura foi centrifugada, eliminando-se o sobrenadante e ressuspendendo o sedimento em PBS ao volume original. Para determinar a dose ótima de sensibilização volumes de 1ml da suspensão de *S. aureus* foram misturadas com volumes iguais (1.0 ml) das diferentes diluições do antissoro anti- *S. suis*, centrifugou-se novamente o material, após incubação das misturas a 37°C por 1 hora. Tomou-se, após, cada sedimento que foi ressuspenso em PBS ao volume inicial. O material assim preparado estava pronto para o uso no teste de Coaglutinação. O teste propriamente dito foi feito sobre uma lâmina de vidro misturando-se uma gota da suspensão de *S. aureus* sensibilizado com antissoro anti-*S.suis* específico com uma gota do sobrenadante da cultura de *S. suis* a ser examinada, tripsinizada por 16 horas. Uma imediata aglutinação da suspensão de *S. aureus* é registrada como positiva, e negativa, quando não ocorrer, for fraca ou ocorrer somente após vários minutos. Os controles negativos utilizados foram o caldo Trypticase e salina (reagentes controles). A reação foi observada por no máximo 3 minutos e pontuada de 0-4+ dependendo da velocidade e intensidade da mesma. As reações com 2+ ou mais são consideradas positivas.

3.3.5. Teste de Reação Capsular

O controle de qualidade do imunógeno foi feito pelo teste de

reação capsular segundo AUSTRAIN (1976) e LUND (1978), com algumas modificações: uma alçada da cultura obtida em meio líquido de Todd Hewitt enriquecido com 5% de soro inativado de bovino foi espalhada sobre uma lâmina numa área circular de 0,5 cm de diâmetro. Uma gota de antissoro específico foi colocada sobre a amostra e a mistura homogeneizada. Foi então colocada sobre a mistura uma lamínula, observando-se a preparação ao microscópio de contraste de fase sob imersão (aumento de 1000 x). Quando ocorreu uma reação entre o soro específico e o material capsular das células de *S. suis*, a cápsula se tornou visível e podemos dizer que a reação de intumescimento capsular foi positiva (figura 3).

4. Pesquisa de fatores de virulência

4.1. Teste de Hemaglutinação

Resumidamente o teste de hemaglutinação foi feito como descrito por JACQUES et al.,(1988). Sangue humano (tipos A, B e O), bem como de carneiro, cavalo, cobaia, coelho e suíno foram coletados em solução de Alsever. Os eritrócitos foram lavados duas vezes em PBS e ressuspensos até obter-se uma suspensão final de 3%. As amostras bacterianas foram semeadas em Columbia ágar sangue bovino à 5% e incubadas a 37°C por 18 horas e também em meio líquido de Todd Hewitt (DIFCO). Densas suspensões bacterianas (aproximadamente 10^{10} UFC/ml) foram preparadas em PBS 0,01M pH 7,2. Uma gota (50µl) da suspensão bacteriana foi

adicionada a uma gota da suspensão de eritrócitos (50µl) e uma gota de salina (50µl) a cada concavidade da placa de poliestireno de 96 pocinhos em duplicata e mantida a 25°C e a 4 °C por 1 hora. O controle positivo foi representado por uma amostra de *E. coli* (O115:K:F+). Num teste paralelo, nas mesmas condições, uma gota de D-manose substituiu a gota de salina para determinar se a atividade hemaglutinante era manose-resistente.

4.2- Caracterização de amostras produtoras da Proteína “MRP” (“Muramidase Released Protein”) e de EF (“ExtracelullarFactor”) através de Immunoblotting.

Todas as amostras foram testadas para a produção de MRP e EF por Immunoblotting com anticorpos monoclonais no Laboratório do GREMIP Groupe de Recherche sur les Maladies du Porc- Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montreal, Saint Hyacinthe – Canada) utilizando metodologia de VECHT et al.(1991).

Para a reação propriamente dita 4 a 5 colônias de *Streptococcus suis* isoladas de placas de Columbia ágar sangue bovino a 5% contendo Sr 126 (OXOID) foram inoculadas em 5 ml do meio de Todd Hewitt por 18 horas a 37°C sob agitação. Após as 18 horas a cultura foi centrifugada, e filtrada em membrana 0,22µm (Millipore) e alíquotadas em tubos contendo 1ml. As alíquotas foram concentradas num Speed Vac até atingirem 100µl. As demais alíquotas foram

mantidas à - 20°C até utilização. A cada amostra de 100µl foi adicionada 100µl do tampão de amostra e submetido a 60°C por 5 minutos (SDS-4g, Glicerol-20ml, tampão Tris-HCl 0,5M pH6,8-40ml, azul de bromofenol-0,1g, 2-mercaptoetanol-5ml, H₂O destilada q.s.p.-100ml). Seguiu-se a uma corrida eletroforética dessas amostras, em gel de poliacrilamida a 5% submetido a uma diferença de potencial de 100mV até o gel de separação e depois 200mV. Após a corrida eletroforética, retirou-se o gel e este foi montado em uma cuba de transferência, onde o gel permaneceu voltado para o polo negativo e um filtro de nitrocelulose voltado para o polo positivo, de modo que as proteínas migrassem para o filtro de nitrocelulose (HybondTM - Amersham LIFE SCIENCE) Seguiu-se a transferência por 22 horas, sendo o material submetido a uma diferença de potencial de 30 V. Após este período, retirou-se o filtro de nitrocelulose e corou-se com Ponceau S (Ponceau S- 0,5g, ácido acético glacial-1ml, H₂O q.s.p.-100ml) por 5 minutos seguindo-se a lavagem com H₂O destilada para constatação da transferência. Bloqueou-se a reação por 1 hora com tampão Tris-Salina com 2% de caseína (Apêndice). Após o bloqueio, lavou-se 3 vezes com tampão Tris-Salina e incubou-se por 2 horas à temperatura ambiente com os seguintes anticorpos: anticorpo policlonal de coelho anti-MRP diluído 1:8000, anticorpo policlonal monoespecífico anti EF- diluído 1:10000 e anticorpo policlonal monoespecífico anti -hemolisina diluído 1: 8000. Todas as diluições foram feitas com Tampão Tris-Salina com 2% de caseína. Tratou-se durante 1 hora com anticorpo Anti-IgG de Coelho marcada com

peroxidase (Horseadish Peroxidase Conjugated Goat-Anti Rabbit IgG+IgM) diluída 1:1500 com Tris-Salina contendo 2% de caseína. Lavou-se 5 vezes com Tris-Salina + caseína. Para a visualização do resultado, utilizou-se a solução reveladora (adicionando-se as soluções A e B que foram misturadas no momento da utilização (ver Apêndice). A membrana de nitrocelulose foi incubada nesta solução por 2 minutos

4.3- Caracterização do gene codificador da proteína “MRP” (“Muramidase Released Protein”) e de EF (“Extracelullar Factor”) através de PCR.

4.3.1. Extração de DNA Genômico

O DNA genômico bacteriano foi isolado de acordo com o método descrito por AUSUBEL et al.(1988), a partir de aproximadamente 5 ml de crescimento bacteriano por 18 horas em caldo BHI. A suspensão celular foi centrifugada e o precipitado lavado duas vezes com tampão TE. Ao precipitado seco foram adicionados 50µl de lisozima a 10 mg/ml e 10µl de Rnase a 10 mg/ml. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e incubada a 37°C por 18 horas. Foi adicionada uma mistura de 70µl de SDS a 10% e 5µl de proteinase K a 10 mg/ml. Depois de homogeneizada em vórtex, a suspensão foi incubada a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 100µl de NaCl 5M e a mesma quantidade de uma solução pré-

aquecida a 65°C de CTAB/NaCl. A suspensão, assim obtida, foi agitada em vórtex até a formação de um líquido de aspecto leitoso e incubada a 65°C por 10 minutos. Após este procedimento foram adicionados 750µl de uma solução de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1) (V/V) e a mistura agitada em vórtex por cerca de 10 segundos. Depois disso o material foi centrifugado a 1200g. O sobrenadante aquoso foi, cuidadosamente transferido para outro tubo de reação e o DNA genômico precipitado com 0,6 volumes de isopropanol a -20°C e a mistura mantida à temperatura de -20°C por 30 minutos.

Após este período a solução foi centrifugada a 1200g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi, por centrifugação, lavado duas vezes com solução de etanol 70% a -20°C. Após tal processo o DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso com movimentos cuidadosos e circulares em 100µl de Tampão TE pH 8,0. Depois de ressuspenso o DNA foi mantido a -4°C por 18 horas para solubilização. A dosagem de DNA realizou-se como descrito por SAMBROOK et al.(1989), em que a concentração e pureza do DNA foram determinadas a partir de leitura em espectrofotômetro a 260 e 280nm. Para isso o seguinte cálculo foi realizado: Concentração de DNA (µg/µl) = $A_{260nm} \times 50 \times \text{fator de diluição}$

Pureza do DNA = A_{280}/A_{260} (foram utilizados aqueles que apresentaram valores entre 1,5 a 2,0 sem contaminação por RNA ou proteínas). O ácido nucleico extraído foi conservado à temperatura de -20°C até utilização.

4.3.2 PCR para detecção do gene codificador de EF (“Extracelullar Factor”)

REAGENTES

O DNA genômico a ser amplificado foi obtido através de técnica descrita acima. A reação de PCR foi realizada com 200ng de DNA extraído, para um volume final de 100 μ l. De cada iniciador utilizou-se 150 pmol, e as amostras foram tratadas da seguinte maneira:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10 μ l	1x
10mM dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM
Iniciadores	EF563 - 7,0 μ l EF1635 - 6,0 μ l	-
DNA molde	2 μ l	-
Taq DNA polymerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 unidades
H ₂ O- Milli-Q estéril	65 μ l	-
TOTAL	100 μ l	-

SEQUÊNCIA DOS INICIADORES DO PCR PARA EF:

EF 563: 5' AAGAAGAACCCAAGGAAC 3'

EF 1635: 5' AGCAAGCTCATCTGCTAC 3'

(Gottschalk, 1999 comunicação pessoal)

AMOSTRAS CONTROLE

Controle positivo – 31533

Controle negativo – T-15

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

30 ciclos térmicos de:

- 94°C – 1 minuto
- 55°C - 2 minutos
- 72°C – 1 minuto

AMPLIFICAÇÃO

Estes iniciadores amplificam fragmentos de 1073 pb.

4.3.3. PCR para detecção da Proteína MRP (“Muramidase Released Protein”)

O DNA genômico a ser amplificado foi obtido através de técnica descrita abaixo. A reação de PCR foi realizada com 200ng de DNA extraído, para um volume final de 100µl. De cada iniciador utilizou-se 150 pmol, e as amostras foram tratadas da seguinte maneira:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10 x PCR buffer	10 μ l	1X
10mM dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM
Iniciadores	MRP 311- 6 μ l MRP1189 - 7 μ l	-
DNA - MOLDE	2 μ l	-
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 unidades
H ₂ O- Milli-Q estéril	65 μ l	-

SEQUÊNCIA DOS INICIADORES DO PCR PARA MRP

MRP 311: 5' TGC TTC ATC AGA ACC AAC 3'

MRP 1189: 5' GAG AAT TTC AAT GCT CCA G 3'

(Gottschalk, 1999- comunicação pessoal)

AMOSTRAS CONTROLE

Controle Positivo – 31533

Controle Negativo- T-15

CONDIÇÕES DA REAÇÃO

30 ciclos térmicos de:

- 94° C – 1 minuto
- 55° C – 2 minutos
- 72° C – 1 minuto

AMPLIFICAÇÃO

Estes iniciadores amplificam aproximadamente fragmentos de 978 pb.

Para a observação do produto amplificado de ambas as reações de PCR, foi utilizada a eletroforese em gel de agarose a 1% preparado com tampão TBE. Cada corrida eletroforética continha um marcador de peso molecular (1 Kb Ladder – Gibco) para comparação do peso molecular do fragmento amplificado. Em cada pocinho do gel foi aplicado 10µl de DNA e 3µl do tampão de ressuspensão (Apêndice). Após a corrida, os géis foram mergulhados em solução de brometo de etídio (0,5µg/ml), e observados em transiluminador de U.V.

4.4 – Análise da Amplificação Randômica do DNA Polimórfico – RAPD (WILLIAMS et al.,1990)

O RAPD inicialmente descrito por WILLIAMS et al.,1990, consiste em uma outra análise do DNA polimórfico baseado na Técnica de PCR (já descrita anteriormente), mas distinto desta por se basear na amplificação do DNA genômico utilizando um único “iniciador” com uma sequência arbitrária de nucleotídeos. Este “iniciador” detecta polimorfismos na ausência de sequências específicas de nucleotídeos e estes polimorfismos servem como marcadores genéticos e podem ser usados na construção de mapas genéticos.

4.4.1- Amostras utilizadas no Teste de RAPD

O teste foi realizado com 30 amostras de *Streptococcus suis* sorotipo 2 isoladas no Brasil e mais quatro amostras padrão gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Gottschalk da Faculdade de Medicina Veterinária de “Saint-Hyacinthe” da Universidade de Montreal, Quebec, Canadá. Estas amostras são respectivamente nomeadas : T-15 (MRP-,EF- Sui -), 31533 (MRP+ EF+ Sui+), 89-999 (MRP-EF-Sui-), e 90-1330 (MRP+EF- Sui-).

As amostras padrão liofilizadas foram cultivadas em BHI (Brain Heart Infusion- DIFCO) por 18 horas, depois reisoladas em placas de Colúmbia ágar sangue à 5% de sangue bovino com SR-126 (DIFCO).

As colônias foram analisadas submetidas aos testes bioquímicos descritos anteriormente e confirmadas pelo Sistema Api Strep 20 para evitar possibilidade de contaminação. Após este procedimento as colônias isoladas foram submetidas à extração de DNA genômico através da Técnica descrita à seguir

4.4.2. Extração de DNA Genômico e Técnica de RAPD

O DNA genômico bacteriano foi isolado de acordo com o método descrito por PITCHER et al.(1989), As amostras foram incubadas em Colúmbia ágar sangue bovino a 5% ou Todd Hewitt ágar durante noite toda e à temperatura de 37°C. No dia seguinte o

crescimento da placa (mais ou menos um quarto de placa) foi coletado com uma alça de platina e ressuspenso em 1ml de Tampão TE 1X (Apêndice). A amostra foi então centrifugada por 5 minutos à 14000 rpm até a formação de um pellet do tamanho de um grão de arroz. A este pellet foi adicionado 75µl de tampão TE 1X e submetido ao Vortex até obtenção de solução homogênea. Foi adicionada 20µl de uma solução de proteinase K (20mg/ml) e 20µl de uma solução de lisozima (100mg/ml) preparada no momento da utilização. A solução foi então incubada a 37°C durante 60 minutos. Foi adicionado 500µl de Tampão GES (Apêndice) e incubado por 15 minutos até que a solução se tornou transparente. A solução foi colocada no gelo e adicionou-se 200µl de acetato de amônio (Apêndice) a 4°C. A mistura foi mantida em gelo por 10 minutos. Foi adicionada 500µl de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico. Centrifugou-se a amostra a 12000rpm por 15 minutos. A fase aquosa da solução, que contém o DNA, foi recuperada com cuidado. Foram então repetidos os passos anteriores a partir da adição de 500µl de fenol/clorofórmio /álcool isoamílico. O volume obtido foi medido com uma pipeta de 1000µl. Foi adicionada uma quantidade de isopropanol correspondente ao volume final obtido na fase aquosa, ou seja: $0,54 \times X$ (quantidade em µl obtida). Quando o volume da fase aquosa foi diferente o cálculo foi feito para a maior quantidade. A solução foi homogeneizada por inversão do "eppendorf" durante 1 minuto e levado a -20°C durante 30 minutos. A solução foi então centrifugada a 12000rpm por 5 minutos. O sedimento obtido foi então lavado duas vezes com 1ml de etanol

80% (conservado a -20°C) . Durante cada lavagem foi utilizada centrifugação por 5 minutos. O sedimento foi seco à temperatura ambiente. Foi adicionado 50µl de Tampão TE1X que ficou durante 18 horas em ressuspensão a 4 homogeneizada por inversão do “eppendorf” durante 1 minuto e levado a -4°C. Uma vez que obtivemos o DNA dissolvido adicionamos 2µl de uma solução de Rnase de 1mg/ml preparada com Tampão TE1X (Apêndice) e incubamos a temperatura ambiente por 20 minutos.

A quantificação de DNA foi realizada como descrito por SAMBROOK et al.(1989), em que a concentração e pureza do DNA foram determinadas a partir de leitura em espectrofotômetro a 260 e 280nm. Para isso o seguinte cálculo foi realizado:

Concentração de DNA (µg/µl) = $A_{260nm} \times 50 \times \text{fator de diluição}$

Pureza do DNA = A_{280}/A_{260} (foram utilizados aqueles que apresentaram valores entre 1,5 a 2,0 sem contaminação por RNA ou proteínas)

O ácido nucleico extraído foi conservado à temperatura de -20°C até utilização.

O RAPD foi realizado segundo a Técnica descrita por Chatellier et al.1999. O Dna a ser amplificado foi obtido através da técnica abaixo descrita e a reação propriamente dita foi realizada com 25ng de DNA extraído, para um volume final de 50µl contendo : 10mM de Tris-HCl (pH=8,3), 50mM KCl, 2,5mM MgCl₂ , 100µM (de cada componente) dATP, dCTP, dGTP, e dTTP; 0,2µM de primer, 0,5U de

Taq Polymerase e 25ng de DNA extraído.

Foram utilizados três iniciadores : OPB7, OPB 10, e OPB17.

OPB 7 - 5' GGTGACGCAG 3'

OPB 10 - 5' CTGCTGGGAC 3'

OPB 17 - 5' AGGGAACGAG 3'

De cada iniciador utilizou-se 150 pmol, e as amostras foram tratadas da seguinte maneira:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10XPCR buffer	5 μ l	1x
10mMdNTP mixture	1 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	1,5 μ l	1,5mM
Iniciadores	-	150pmol
DNA Molde	1 μ l	-
TaqDNA polimerase(5U μ l)	5 μ l	2,5 unidades
d H ₂ O	33 μ l	-
TOTAL	50 μ l	-

Para a observação do produto amplificado nas reações de RAPD foi utilizada a eletroforese em gel de agarose a 1,4% preparado com tampão TBE (Apêndice) e submetidos a uma diferença de potencial de 100V. Cada corrida eletroforética continha um marcador de peso molecular (1 Kb Ladder – Gibco) para comparação do peso molecular do fragmento amplificado. Em cada orifício do gel foi aplicado 10 μ l de

DNA e 3 μ l do tampão de ressuspensão (Apêndice). Após a corrida, os géis foram tratados por 20 minutos com solução de brometo de etídio (0,5 μ g/ml),. A observação das bandas foi feita em Transiluminador (High Performance Ultraviolet Transilluminator – UVP – Ultra - Violet Products) .

5. Resultados

5.1- Isolamento e identificação

Foram isoladas 51 amostras de animais com doença compatível a infecção por *S.suis* como: artrite, endocardite, pneumonia, meningite e septicemia provenientes de várias granjas das regiões de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Os testes bioquímicos utilizados para a identificação foram descritos no item 3.2. Nos testes bioquímicos os resultados esperados para isolamento de *S. suis* são: hemólise alfa em Colúmbia ágar sangue 5% (ver figura 1), VP(-) Amilase(+) TSA+6,5% NaCl(-) e para fermentação de carboidratos: trealose(+), manitol(-), sorbitol (-) , inulina (+). Todas as amostras foram confirmadas pelo Sistema Rápido de Identificação API20 STREP bioMérieux (Figura 2).

Na Tabela 1, podemos observar o número amostras isoladas, idade de animais envolvidos, principais sintomas, número de animais afetados, procedência, quadro clínico e resultado de necrópsia.

Tabela 1. Origem das amostras de *S.suis* isoladas de suínos: idade dos animais, sintomas, região, quadro clínico e achados de necrópsia. Campinas, São Paulo, Brasil, 1999.

Amostra	Idade dos animais	Sintomas principais	Nº animais afetados	Cidade	Estado	Quadro Clínico	Necropsia
463	25 dias	Anorexia, febre, incoordenação e ataxia	8	Castro	PR	Septicemia	Linfonodos e parênquima de Órgãos internos congestos
482	25 dias	Idem anterior	10	Castro	PR	Septicemia	Idem anterior
263	25 dias	Idem anterior	20	Castro	PR	Pneumonia	Idem anterior + pneumonia fibrinosa
258	30 dias	Idem anterior	05	-	-	Septicemia	Idem anterior + Pericardite e poliartrite
237	30 dias	Idem anterior + pele verm.	10	-	-	Septicemia	Idem anterior
224	30 dias	Incoord., febre, anorexia ataxia	10	-	-	Septicemia	Idem anterior
161	35 dias	Idem anterior + pele verm.	10	Patrocínio	MG	Septicemia	Idem anterior
313	35 dias	Incoord., febre, anorexia e ataxia	10	Patrocínio	MG	Meningite	Edema e congestão de cérebro e meninges, secreção purulenta
313-A	35 dias	Idem anterior	10	Patrocínio	MG	Septicemia	Edema e congestão de linfonodos e órgãos internos, pericardite e poliartrite
403-pel	35 dias	Idem anterior	10	Patrocínio	MG	Meningite	Cérebro e meninges congestos. Sec. purulenta
403-F3	35 dias	Idem anterior	15	Patrocínio	MG	Meningite	Idem anterior
527	45 dias	Idem anterior	15	-	-	Meningite	Idem anterior
403-cor	35 dias	Tremores, febre e depressão	30	Patrocínio	MG	Septicemia	Endocardite e pneumonia fibrinosa
403-L3	35 dias	Incoord., febre, anorexia, ataxia	20	Patrocínio	MG	Meningite	Cérebro e meninges congestos. Turbidez Liq. Cerebroespinal
403-L2	45 dias	Febre, anorexia, opistótono e ataxia	30	Patrocínio	MG	Septicemia	Edema e congestão de órgãos e linfonodos
403-P3	45 dias	Idem anterior	20	Patrocínio	MG	Meningite	Edema cong. Cér. meninges. Turbidez Liq. Espinal
403-F3*	35 dias	Febre, anorexia, opistótono e ataxia	15	Patrocínio	MG	Meningite	Idem anterior
202-A2	35 dias	Incoord., febre, anorexia, ataxia	12	Patrocínio	MG	Septicemia	Congestão linf. e par. órgãos internos.
203-A6	40 dias	Idem anterior	15	Patrocínio	MG	Septicemia	Idem anterior
204-A1	40 dias	Idem anterior	20	Patrocínio	MG	Pneumonia	Idem anterior
204-A5	38 dias	Idem anterior	05	Patrocínio	MG	Septicemia	Idem anterior + pneumonia Fibrinosa
206-A3	35 dias	Anorexia e ataxia	20	Patrocínio	MG	Septicemia	Pericardite e Poliartrite
206-A7	30 dias	Incoord., febre, anorexia, ataxia	20	Patrocínio	MG	Septicemia	Idem anterior
345-D6	35 dias	Idem anterior	20	Patrocínio	MG	Septicemia	Idem anterior
345-D7	35 dias	Febre, anorexia, opistótono e ataxia	25	B. Paulista	SP	Meningite	Edema cong. meninges Turbidez Liq. espinal
345-D21	35 dias	Incoord., febre, anorexia e ataxia	25	B. Paulista	SP	Septicemia	Pericardite, poliartrite, edema e congestão órg. e linf.
240-M4	35 dias	Idem anterior	15	B. Paulista	SP	Meningite	Edema e cong. cér. meninges. Turbidez Liq. Espinal
245-M3	35 dias	Idem anterior	15	Patrocínio	MG	Meningite	Idem anterior
245-M9	45 dias	Idem anterior	15	B. Paulista	SP	Meningite	Idem anterior
260-A2	35 dias	Tremores, febre e depressão	20	B. Paulista	SP	Pneumonia	Linf. e par. Órgãos int. congestos. Pneumonia Fibrinosa

260-A8	35 dias	Febre, anorexia, opistótono, ataxia	20	Patrocínio	MG	Meningite	Edema, cong. cer. meninges Turbidez liq. espinal
120-A1	45 dias	Tremores, febre e depressão	30	Patrocínio	MG	Septicemia	Edema e cong. de linf. e órgãos internos. Pericardite, poliartrite.
194D	45 dias	Febre, anorexia, opistótono e ataxia	15	Patrocínio	MG	Meningite	Edema. Cong. cerebral e meninges. Turbidez Liq. espinal
194C	45 dias	Incoord., febre, anorexia, ataxia	20	Patrocínio	MG	Pneumonia	Linf. e par. Órgãos int. congestos. Pneumonia Fibrinosa
1064(C3)	35 dias	Tremores, febre e depressão	15	Patrocínio	MG	Septicemia	Linf. e par. Órgãos int. congestos. Pneumonia Fibrinosa
1065(C4)	35 dias	Febre, anorexia, opistótono e ataxia	15	Patrocínio	MG	Meningite	Edema. Cong. cerebral e meninges. Turbidez Liq. espinal
1066	35 dias	Febre, anorexia, opistótono e ataxia	30	Patrocínio	MG	Meningite	Edema. Cong. cerebral e meninges. Turbidez Liq. espinal
314	45 dias	Febre, anorexia, opistótono e ataxia	20	Patrocínio	MG	Meningite	Edema. Cong. cerebral e meninges. Turbidez Liq. espinal
341	45 dias	Febre, anorexia, opistótono e ataxia	12	Patrocínio	MG	Meningite	Edema. Cong. cerebral e meninges. Turbidez Liq. espinal
352	45 dias	Febre, anorexia, opistótono e ataxia	13	Patrocínio	MG	Meningite	Edema. Cong. cerebral e meninges. Turbidez Liq. espinal
344	35 dias	Febre, anorexia, opistótono e ataxia	10	Patrocínio	MG	Meningite	Edema. Cong. cerebral e meninges. Turbidez Liq. espinal
121-A1	45 dias	Febre, anorexia, opistótono, ataxia	20	Patrocínio	MG	Meningite	Edema, cong. cer. meninges Turbidez liq. espinal
21	45 dias	Incoord., febre, anorexia e ataxia	10	Castro	PR	Pneumonia	Linf. e par. Órgãos int. congestos. Pneumonia Fibrinosa
22	30 dias	Incoord., febre, anorexia e ataxia	15	Castro	PR	Pneumonia	Edema, cong. cer. meninges Turbidez liq. espinal
23	45 dias	Incoord., febre, anorexia e ataxia	20	Castro	PR	Pneumonia	Edema, cong. cer. meninges Turbidez liq. espinal
24	35 dias	Febre, anorexia, opistótono, ataxia	20	Castro	PR	Meningite	Edema, cong. cer. meninges Turbidez
25	45 dias	Febre, anorexia, opistótono, ataxia	20	Castro	PR	Meningite	Edema, cong. cer. meninges Turbidez
26	35 dias	Febre, anorexia, opistótono, ataxia	30	Castro	PR	Meningite	Edema, cong. cer. meninges Turbidez
27	30 dias	Febre, anorexia, opistótono, ataxia	30	Castro	PR	Meningite	Edema, cong. cer. meninges Turbidez
28	30 dias	Incoord., febre, anorexia e ataxia	20	Castro	PR	Pneumonia	Linf. e par. Órgãos int. congestos. Pneumonia Fibrinosa
28-D	40 dias	Febre, anorexia, opistótono, ataxia	20	Castro	PR	Meningite	Edema, cong. cer. meninges Turbidez

Continuação Tabela 1

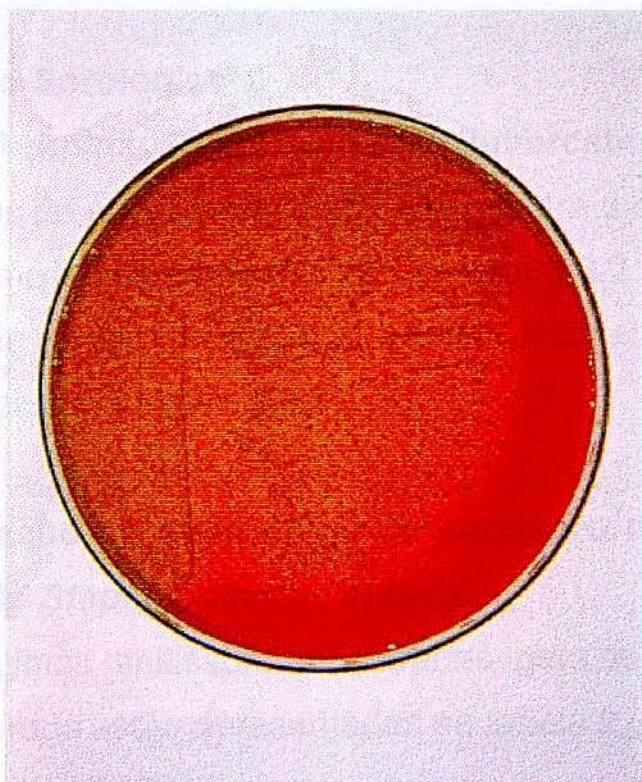


Figura 1 – Colônias de *Streptococcus suis* sorotipo 2 apresentando hemólise-alfa em placa de Columbia àgar sangue bovino a 5%.

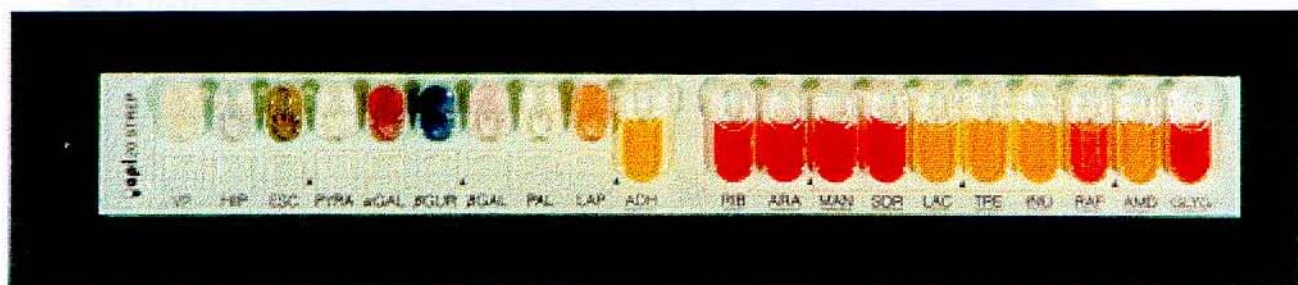


Figura 2. Provas do Sistema API 20 STREP realizados com amostra padrão sorotipo 2 de *Streptococcus suis*.

5.2- Identificação Sorológica

5.2.1- Teste de Aglutinação em tubo com 2-mercaptoetanol

As amostras de antissoro dos sorotipos de 1 a 8 obtidas através da inoculação em coelhos como descrito no item 3.3.2 , apresentaram neste teste o título de pelo menos 1:32 e foram submetidas ao teste de Coaglutinação descrito no item 3.3.4.

5.2.2- Determinação da dose ótima de antissoro de *S. suis* para sensibilização de *Staphylococcus aureus*

As doses ótimas antissoro encontradas para sensibilizar a amostra de *S. aureus* estão apresentadas na tabela 2, para os sorotipos de 1 a 8 de *S. Suis*.

Tabela 2- Recíproco da melhor diluição utilizada para cada antissoro na sensibilização da amostra de *S.aureus*

DOSE ÓTIMA DE SENSIBILIZAÇÃO DE S. AUREUS	
SOROTIPO	
1	16
2	32
3	128
4	16
5	32
6	16
7	64
8	64

5.2.3- Teste de Coaglutinação

Neste teste três gotas separadas (0,25µl) da amostra bacteriana a ser testada foram colocadas sobre uma placa de vidro. Uma gota de 2,5% da suspensão de *S.aureus* Cowan I sensibilizada com antissoro contra *S.suis* foi adicionado a uma das três gotas e nas outras duas gotas foram adicionadas os reagentes controle (caldo trpticase e salina). As misturas foram homogeneizadas por movimentos circulares durante 2 minutos e as amostras que apresentaram aglutinação somente com a suspensão de *S.aureus* Cowan I sensibilizada com antissoro específico foram consideradas positivas. As amostras positivas para os sorotipos 1 a 8 estão apresentadas na Tabela 3 abaixo. As outras amostras não pertencentes a estes sorotipos foram gentilmente sorotipadas pelo Prof. Dr. Marcelo Gottschalk, do GREMIP, Canadá

Tabela 3 – Distribuição das 51 amostras de *S.suis*, segundo o resultado de sorotipagem por Coaglutinação, isoladas de suínos. Campinas,SP, Brasil, 2000.

SOROTIPO	AMOSTRA
1	403-L2, 403-P3
2	463, 482, 263,258, 237, 224,527, 202-A2, 203-A6, 204-A1, 240-M4, 245-M3, 245-M9, 260-A2, 120-A1, 121-A1, 194-D, 194-C, 1064(C3), 1065(C4), 1066, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 28-D
3	161, 313, 313-A, 204-A5, 345-D6, 345D7, 260-A8, 314, 341, 352, 344.
7	403-PEL, 403-F3, 403-L3, 403-P3, 206-A3, 206-A7, 345-D21,
14	403-COR

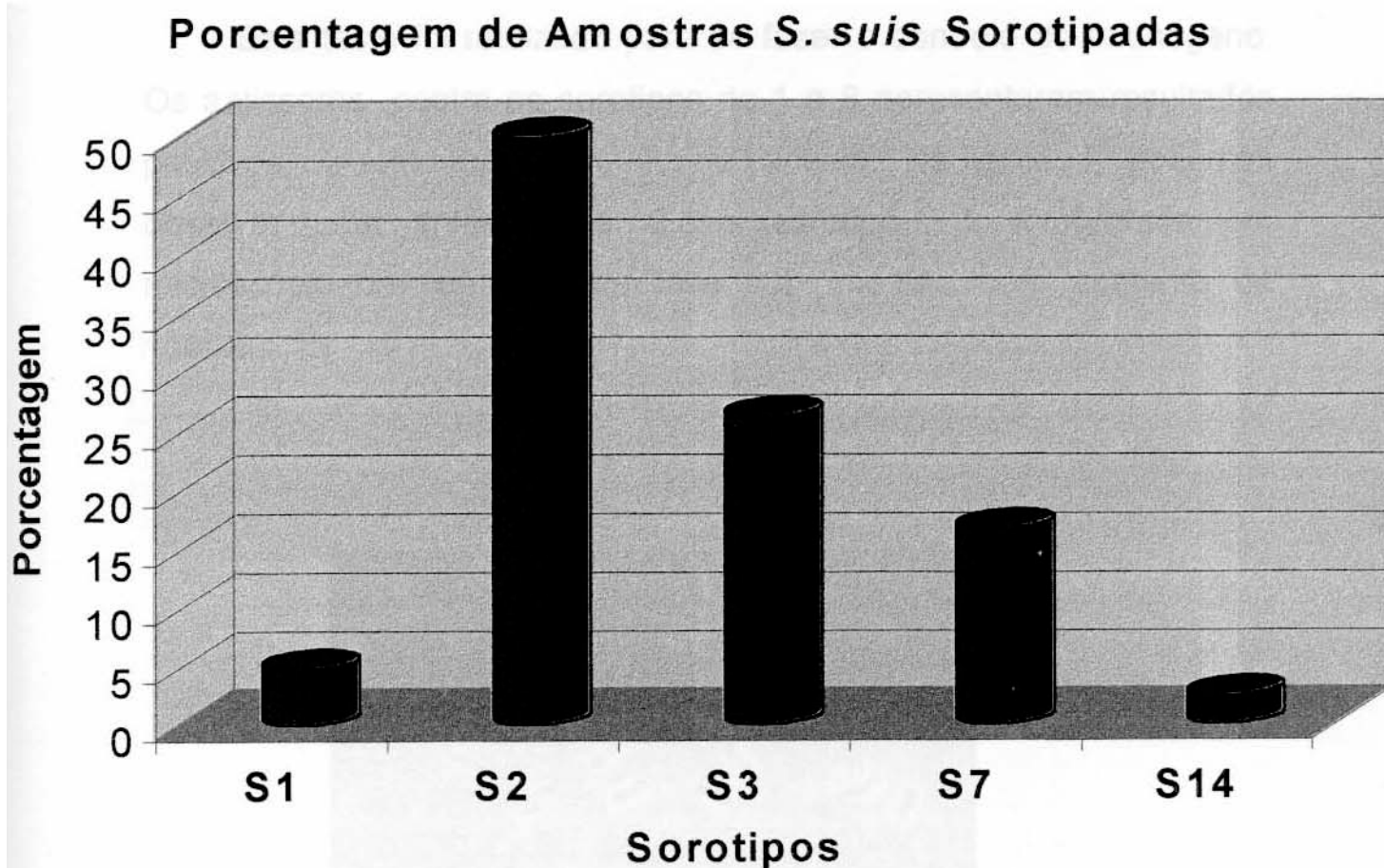


Figura 3. Frequência da distribuição percentual das amostras de *Streptococcus suis*, segundo os sorotipos obtidos nos testes de Coaglutinação, isoladas de suínos. Campinas, SP. Brasil. 2000

5.2.4- Teste de Reação Capsular

Este teste foi realizado para se fazer o controle do imunógeno. Os antissoros contra os sorotipos de 1 a 8 apresentaram resultados positivos, ou seja intumescimento de cápsula. Na figura 4, podemos observar uma amostra de *S.suis* sorotipo 2 fotografada em microscópio de contraste de fase sob imersão com aumento de 1000X.

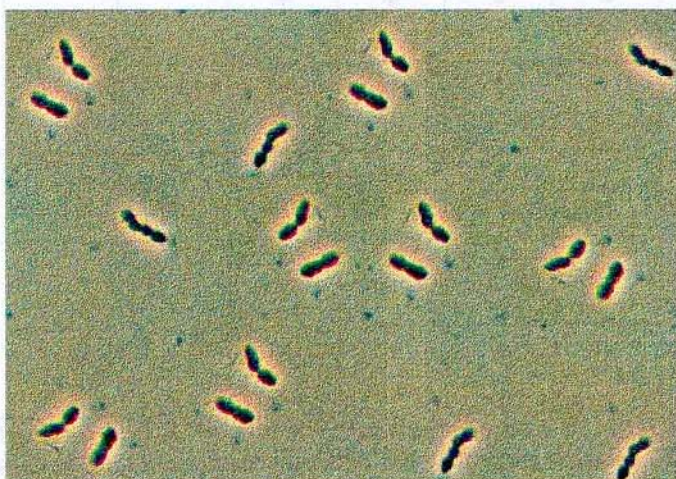


Figura 4 - Teste de Reação Capsular - *Streptococcus suis* sorotipo 2

5.3- Pesquisa de Fatores de Virulência

5.3.1- Teste de Hemaglutinação

Para este teste foram testadas 42 amostras pertencentes aos sorotipos 1, 2, 3, 7, e 14 isoladas nesta pesquisa. A amostra padrão positivo utilizada neste teste foi a *Escherichia coli* 8a isolada de suínos. O teste foi realizado como descrito no item 4.1. Os resultados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Resultados dos testes de Hemaglutinação com diversas hemácias e correlação com sorotipos

Nº DE AMOSTRAS	SOROTIPO	H(A)	H(B)	H(O)	CAV	SUI	COB	COE
2	1	+	+	-	-	+	-	-
2	2	-	+	+	-	-	-	-
2	3	-	+	+	-	+	-	-
2	7	-	+	+	-	-	-	-
2	14	-	+	+	-	-	-	-

H(A) = sangue humano tipo A; H(B) = sangue humano tipo B; H(O) = sangue humano tipo O; CAV= sangue cavalo; SUIN= sangue suíno; COB= sangue cobaia; COE= sangue coelho.

5.3.2- Identificação de amostras produtoras da Proteína MRP (“Muramidase Released Protein”) e de EF (“Fator Extracelular”) e de Suilisina Técnica de Immunoblotting

Foram testadas 51 amostras no teste de Immunoblotting para a produção dessas duas proteínas e a tabela abaixo relaciona os dados encontrados.

Tabela 5 - Imunoblotting para MRP,EF e Suilisina de 42 amostras de *S.suis* isoladas no Brasil. 2000.

AMOSTRAS	MRP	EF	SUILISINA
463	+	*	+
482	+	*	+
263	+	*	+
258	+	*	+
237	+	*	+
224	+	*	+
161	*	-	-
313	*	-	-
313-A	*	-	-
403-PEL	-	-	-
403-F3	-	-	-
527	+	+	+
403-COR	-	+	-
403-L3	-	-	-
403-L2	+	+	+
403-P3	-	-	-
403-F2	+	*	+
202-A2	+	*	+
203-A6	+	*	+
204-A1	+	*	+
204-A5	*	-	-
206-A3	+	*	+
240-M4	+	*	+
245-M3	+	*	+
245-M9	+	*	+
260-A2	+	*	+
194-D	+	*	+
194-C	+	*	+
1064(C3)	+	*	+
1065(C5)	+	*	+
1066	+	*	+
121-A1	+	*	+
120-A1	+	*	+
21	+	*	+
22	+	*	+
23	+	*	+
24	+	*	+
25	+	*	+
26	+	*	+
27	+	*	+
28	+	*	+
28-D	+	*	+

(*) MRP ou EF positivos porém com peso molecular diferente de MRP e EF.

5.3.3 – Identificação do gene codificador da Proteína MRP (“Muramidase Released Protein”) e de EF (“Extracelullar Factor”) pela Técnica de PCR.

Utilizando a técnica de PCR foi possível identificarmos a presença dos fatores de patogenicidade comuns a *S. suis* como os genes codificadores da proteínas MRP e do Fator Extracelular. Estes resultados estão apresentados nas figuras 5, 6, e 7 .

5.3.4 - RAPD

Para este teste foram somente utilizadas as amostras de *S.suis* sorotipo 2 e as figuras 8, 9 e 10 ilustram os padrões de bandas amplificadas com cada iniciador utilizado respectivamente OPB7, OPB 10 e OPB 17 para quatro amostras padrão de *S. suis* e mais duas amostras isoladas no Brasil.

Através do polimorfismo obtido com os iniciadores foi possível a construção de um dendograma de dissimilaridade formado pelo Programa POPGENE, apresentando também os fatores de virulência associados a cada amostra que pode ser visualizado na figura 11.

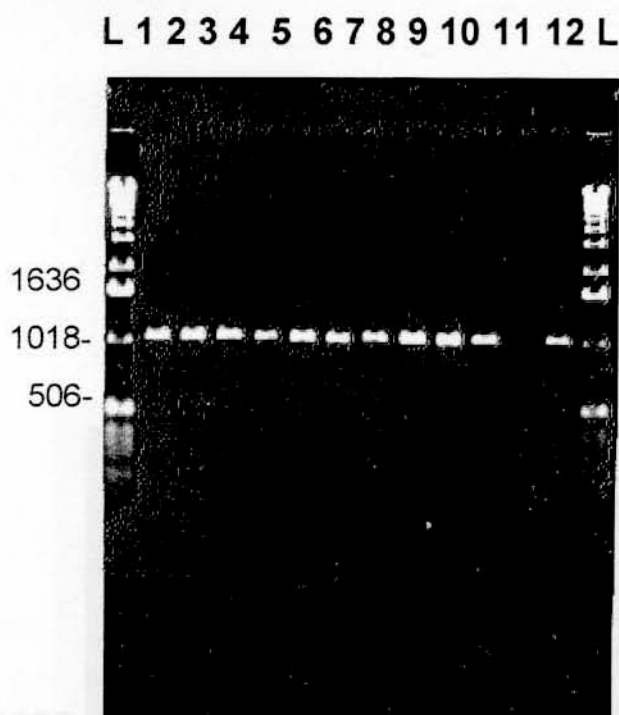


Figura 5. PCR para o gene codificador de EF (Fator Extracelular) de 10 amostras de *S.suis*. Linha L: ladder. Linha 1 - 10: amostras isoladas: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 527 (todos sor 2) e 403-L2 (sor 1), 403-cor (sor 14). Linha 11: padrão negativo: T-15. Linha 12: padrão positivo: 31533

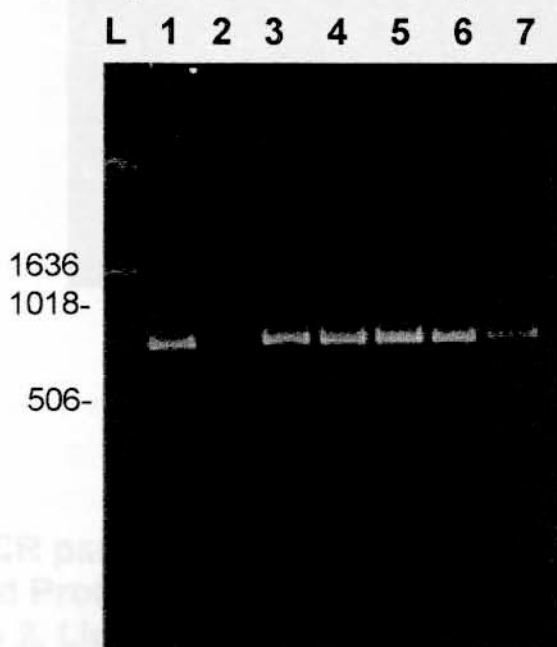


Figura 6. PCR para o gene codificador de MRP ("Muramidase Released Protein") de cinco amostras isoladas de *S.suis* sor. 2. Linha L: ladder (1kb). Linha 1: 31533 (padrão positivo) Linha 2: T-15 (padrão negativo). Linha 3-7: amostras positivas para MRP 21, 22, 23, 24 e 25.

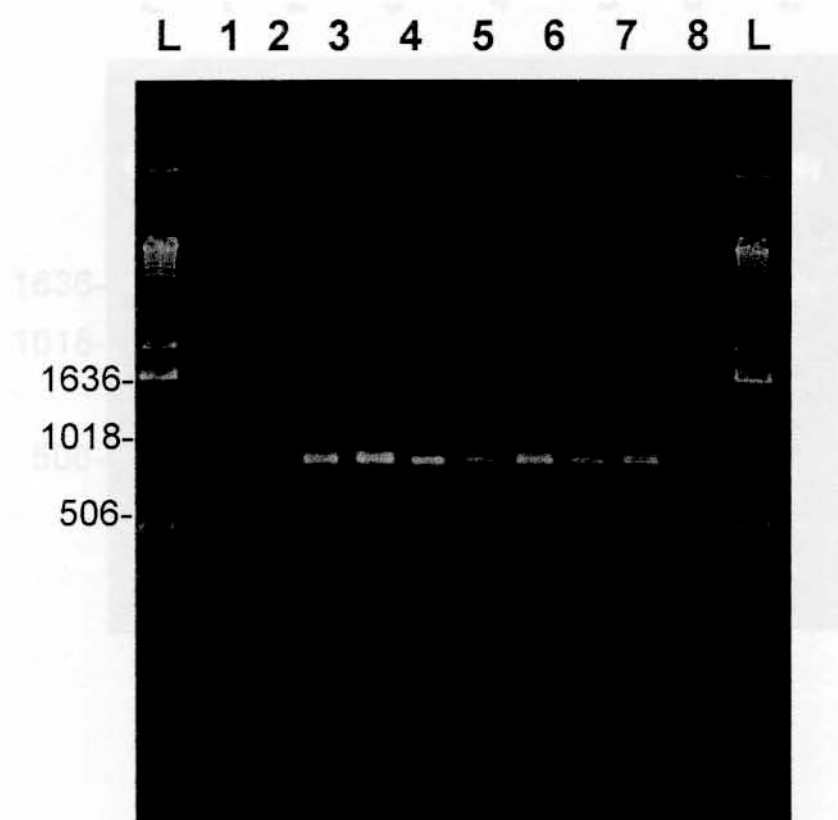


Figura 8. Teste de RAPD com o iniciador OPB-7. Linha L: ladder. Linhas 1-4 : amostras padrão: T-15, 31533, 99-999, 90-132C. Linhas 5-8 : amostras de *S.suis* sorotipo 2 isoladas : 527 e 237.

Fig 7. PCR para o gene codificador de MRP (Muramidase Released Protein) de oito amostras isoladas de *S.suis* sorotipo 2. Linha L: ladder (1kb). Linha 1:31533 (padrão positivo). Linha 2: T-15 (padrão negativo). Linha 3-10: amostras isoladas (26, 27, 28, 28-D, 121-A1, 194-D, 527, 237).

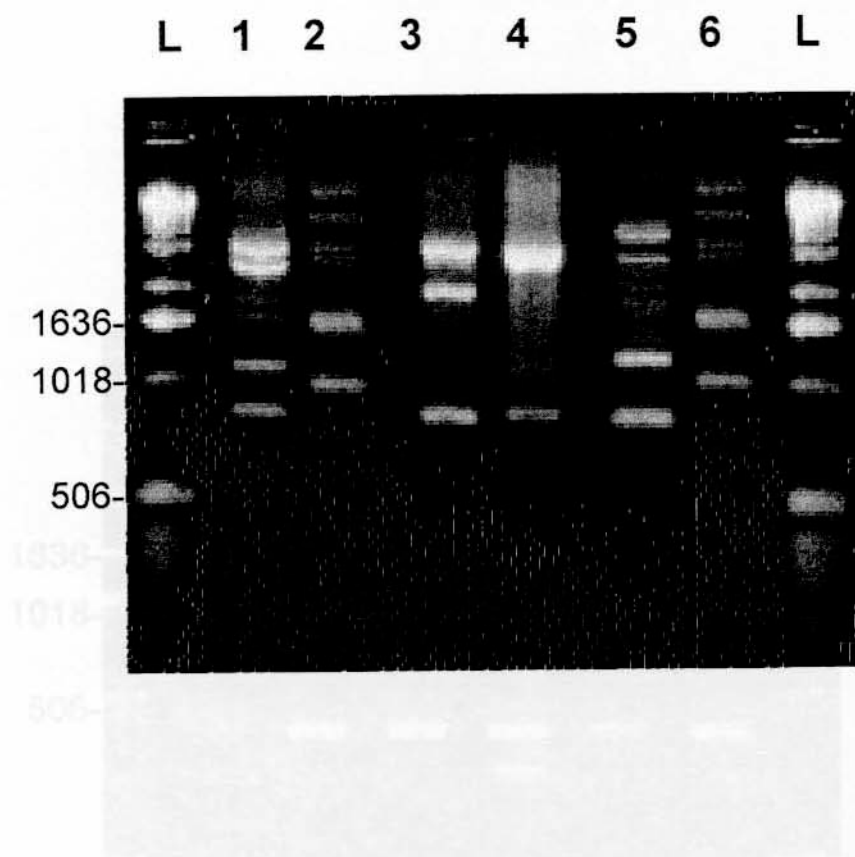


Figura 8. Teste de RAPD com o iniciador OPB-7. Linha L: ladder. Linhas 1-4 : amostras padrão: T-15, 31533, 89-999, 90-1330 . Linhas 5-6 : amostras de *S.suis* sorotipo 2 isoladas : 527 e 21

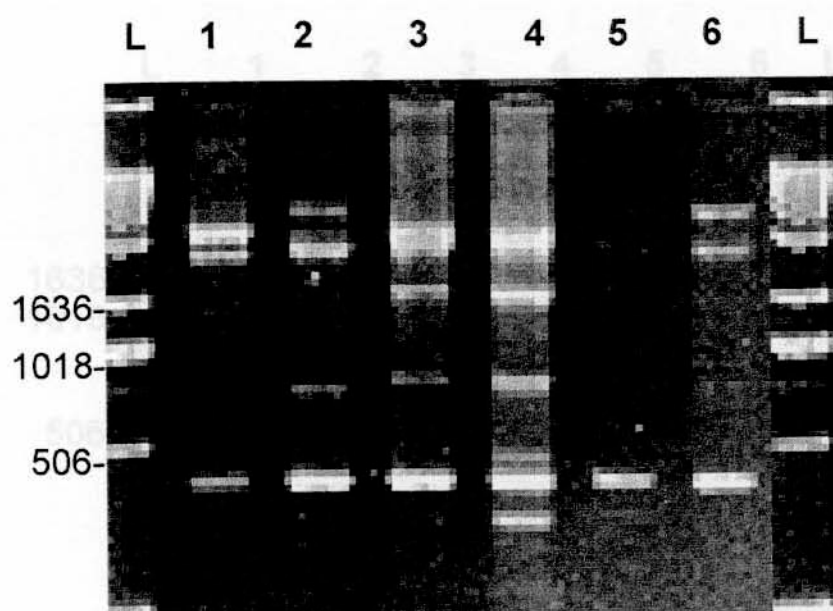


Figura 10. Teste de RAPD com o iniciador OPB-10. Linha L: ladder. Linhas 1-4: amostras padrão: T-15, 3153, 89-999, 90-1330 . Linhas 5-6: amostras de *S. suis* sorotipo 2 isoladas : 527 e 21

Figura 9. Teste de RAPD com o iniciador OPB-10. Linha L: ladder. Linhas 1-4: amostras padrão: T-15, 3153, 89-999, 90-1330 . Linhas 5-6: amostras de *S. suis* sorotipo 2 isoladas : 527 e 21

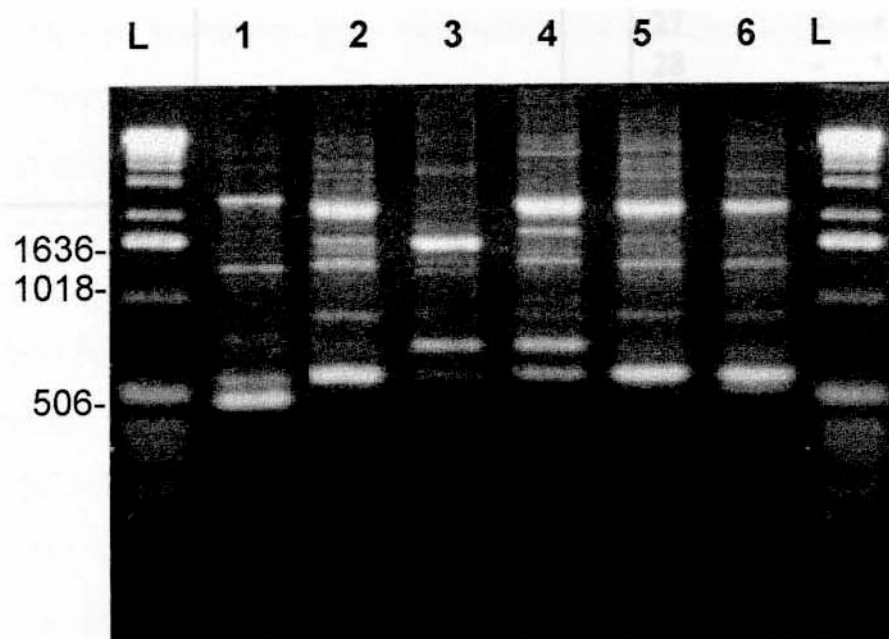
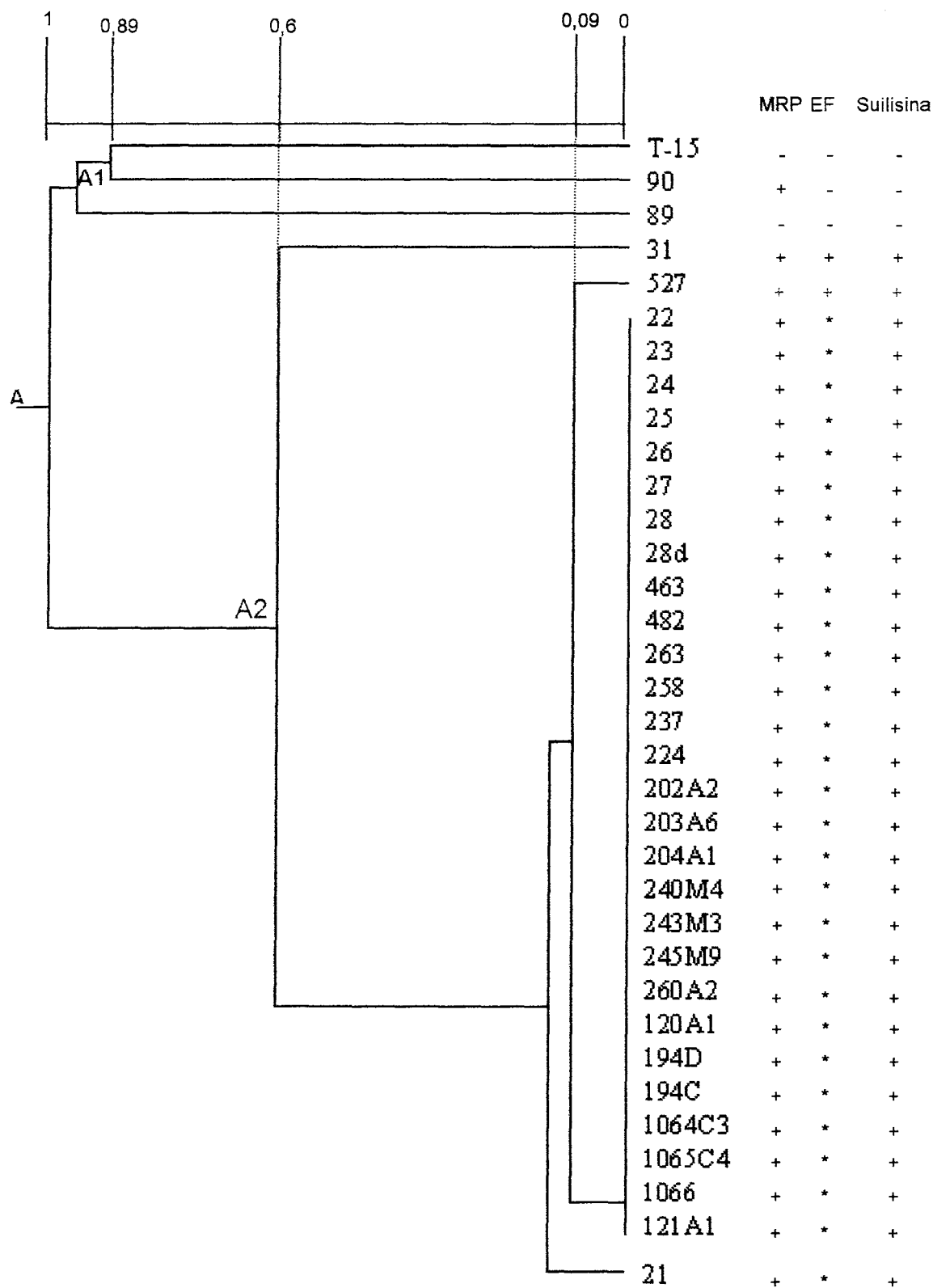


Figura 10. Teste de RAPD com o iniciador OPB-10. Linha L: ladder. Linhas 1-4: amostras padrão: T-15, 3153, 89-999, 90-1330 . Linhas 5-6: amostras de *S.suis* sorotipo 2 isoladas : 527 e 21

Figura 11 - Dendograma de Dissimilaridade formado pelo programa POPGENE e fatores de virulência



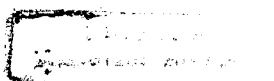
(+) = Fator Positivo
 (-) = Fator Negativo
 (*) = MRP* ou EF*

6.- Discussão

Streptococcus suis é um patógeno responsável por uma variedade de infecções em suínos como: meningite, artrite, endocardite, septicemia, e broncopneumonia. (VECHT et al,1985; HIGGINS et al., 1992; KATAOKA et al,1993; REAMS et al,1994). O impacto econômico das infecções de *S.suis* para a indústria de carne suína é substancial.

Neste trabalho nos propusemos a desenvolver em nosso laboratório um método de isolamento e identificação para *Streptococcus suis* e também sorotipar as amostras isoladas através da produção de antissoros contra os sorotipos de 1 a 8 por serem descritos na literatura como os isolados com maior frequência. É também indicado que amostras que não sejam sorotipáveis sejam remetidas a outros laboratórios de referência. (HIGGINS & GOTTSCHALK,1999).

No primeiro estudo que incluiu um esquema completo de identificação dos sorotipos 1,2, e ½ eram preconizados quatro testes como suficientes para identificação de *S.suis* : fermentação de inulina, e glicogênio e resistência à optoquina e produção de arginina desidrolase. (PERCH et al,1981). Também foi sugerido que a produção de ácido a partir da rafinose seria um bom teste para diferenciação entre os grupos R e S de *Streptococcus*. Desde então muitos autores estudaram as características bioquímicas de diferentes sorotipos de *S. suis* e ficou claro que os testes acima citados poderiam causar confusões quanto ao isolamento do patógeno em



questão. Muitos autores consideravam a arginina desidrolase e produção de ácido a partir da inulina características variáveis para a identificação de *S.suis* (HOFFMAN & HENDERSON, 1985; HOMMEZ et al, 1988; SIHVONEN et al, 1988).

A partir do isolamento de muitos outros sorotipos variações bioquímicas foram sendo observadas , como por exemplo , a fermentação do manitol era considerada negativa , porém mais de 70% dos sorotipos 17, 19 e 21 eram positivos. A partir da observação dessas variações foi proposto um mínimo de provas bioquímicas em combinação com técnicas de sorotipagem. HIGGINS et al.(1990) utilizaram quatro testes para a identificação presuntiva: crescimento negativo em TSA + 6,5% de NaCl, teste de Vóges-Proskauer (VP) negativo, e produção de ácido a partir de trealose e inulina. Mesmo algumas amostras sendo negativas para trealose ou salicina, muito poucas eram negativas para ambos os carboidratos. O teste de VP é crítico e parece ser o mais importante na diferenciação de *Streptococcus suis* e *Streptococcus bovis* . Amostras isoladas que sejam identificadas como *S.suis* a partir destes testes bioquímicos podem ser sorotipados.

Em nosso laboratório a série bioquímica simplificada utilizada para identificação de *Streptococcus suis* foi: hemólise alfa em Columbia ágar sangue bovino a 5% adicionado de suplemento SR-126 (OXOID) (+); VP(-) ; TSA + 6,5% NaCl(-); AMILASE (+); trealose(+); inulina (+) sorbitol(-) ; manitol(-). Estes testes foram bastante eficientes como triagem rápida. Embora não sejam indicados

testes comerciais para sorotipagem de amostras compreendidas entre os sorotipos de 9-35 em nossa experiência a utilização de testes comerciais como Sistema API 20 STREP (BioMèrrieux) também foi de grande utilidade já que este teste encerra outras provas adicionais para confirmação de *S. suis* sorotipo 1 e 2.

Todas as amostras isoladas pela série bioquímica convencional foram submetidos a confirmação no Sistema API 20 STREP (BioMèrrieux) , como mencionado, e depois submetidas ao teste de coaglutinação para que fossem sorotipadas. Amostras pertencentes ao sorotipo 1/2, e 9-35 foram gentilmente sorotipadas pelo nosso co-orientador Prof. Dr . Marcelo Gottschalk.

Neste estudo, o sorotipo 2 foi o mais prevalente entre as amostras isoladas. Das 51 amostras isoladas 30 (59%) . Existe uma variação na importância de cada sorotipo entre os diferentes países do Mundo. O sorotipo 2 é o mais isolado na França, Itália e Espanha, Bélgica, Holanda e Alemanha (VECHT et al,1985; HOMMEZ et al. 1986; ESTOESPANGESTIE & LÄMLER, 1993).

Quanto às outras amostras sorotipadas 11 (26,2 %) pertencentes ao sorotipo 3 , 7 (16,7 %) ao sorotipo 7, 2 ao sorotipo 1 (4,8%) e 1 amostra (2,4 %) ao sorotipo 14. Os dados encontrados em termos de frequência dos sorotipos está de acordo com a literatura que aponta o sorotipo 2 como o mais freqüente e por isso o mais estudado devido ao isolamento de amostras deste sorotipo que apresentam alta virulência. Vale ressaltar a importância do isolamento de uma amostra de sorotipo 14 pelo aspecto zoonótico, já que foi

descrito anteriormente por ARENDS et al. (1977) como agente etiológico de meningite em humanos.

O teste de Hemaglutinação utilizado como presuntivo para a presença de adesinas principalmente fimbriais, foi realizada com eritrócitos de diferentes espécies animais como: humano dos tipos A,B e O, cavalo, suíno, cobaia e coelho.

As pesquisas recentes tem enfocado a caracterização do sorotipo 2 de *S.suis* pelo perfil de proteínas que apresentam VECHT e colaboradores em 1991, identificaram 2 proteínas , uma chamada MRP ("Muramidase Released Protein") e a outra EF ("Extracelullar Factor") que parecem formar um envelope protéico celular e são secretadas para o sobrenadante da cultura bacteriana. Tanto MRP como EF fazem parte da família de proteínas que podem ser reconhecidas por anticorpos monoclonais, mas apresentam diferente mobilidade eletroforética. Devido a este fato designou-se MRP* e EF*, ou seja proteínas freqüentemente produzidas (77%) por amostras isoladas de suínos com meningite, mas que apresentam peso molecular próximo ao destas duas proteínas. Por outro lado a maioria (86%) de isolados provenientes de tonsilas e animais saudáveis não produzem estas proteínas . Baseado na produção de MRP e EF vários fenótipos foram descritos: MRP+ EF+; MRP+ EF*; MRP+ EF- e MRP- EF-. EF* é uma variante de EF com peso molecular superior a EF e MRP* é uma proteína relacionada a MRP somente detectada por anticorpos monoclonais MRP₃ (comunicação pessoal Dr. Gottschalk) em Western blot e apresentam peso molecular superior a 136kD.

Estes dados confirmam a caracterização fenotípica das amostras por nós isoladas pois foram encontrados todos os padrões descritos anteriormente para MRP e EF. Como também é citado que amostras que possuam MRP* e EF* sejam menos virulentas e foram encontradas em nossas amostras MRP+ EF* ou MRP* e EF- produzindo meningite e septicemia, provavelmente outros fatores podem determinar a instalação da doença como imunossupressão por outro agente (bacteriano, viral) ou mesmo outros fatores de virulência ainda não conhecidos. Talvez o fato de o fenótipo apresentado ser MRP* e EF- porém Suilisina positiva poderia aumentar a patogenicidade bacteriana porém são somente suposições que só poderiam ser concluídas com um maior aprofundamento em nossos estudos, já que também isolamos amostras com fenótipo MRP* EF- Suilisina - causando meningite (amostra 313).

Para a verificação dos fatores de virulência MRP e EF utilizamos os iniciadores descritos anteriormente que foram utilizados na reação de cadeia da polimerase (PCR), permitindo a identificação destes fatores nas amostras por nós isoladas isoladas. Através deste teste todas as amostras puderam ser analisadas quanto ao padrão fenotípico.

Com relação ao panorama fenotípico geral das amostras, além das 30 amostras de *S. suis* sorotipo 2 isoladas e que apresentaram um fenótipo MRP+EF* Suilisina+, do sorotipo 1 foram isolados dois fenótipos diferentes (MRP+EF+Sui- e MRP-EF-Sui-). Já com relação ao sorotipo 3, de onze isolados, quatro amostras apresentaram o

fenótipo MRP* EF- Suilisina -. A única amostra de sorotipo 14 apresentou um fenótipo MRP- EF+ Suilisina -. Com relação ao sorotipo 7 de seis amostras isoladas quatro apresentaram fenótipo MRP- EF- Sui -. De acordo com os resultados obtidos por WISSELINK et al (2000) as amostras do sorotipo 2 normalmente apresentam um fenótipo positivo para EF, o mesmo ocorrendo para os sorotipos 1,1/2 e 14, sugerindo que para estes sorotipos a expressão de EF parece estar relacionada à virulência. Finalmente nenhuma das amostras de sorotipo 7 produziu EF e portanto EF parece não ser importante na virulência deste sorotipo. Nossos resultados estão de acordo com o descrito por este autor.

Através da Técnica de RAPD é possível fazer-se uma análise satisfatória do DNA genômico bacteriano (BEAUDOIN et al.1992; BROUSSEAU et al. 1993; VAN BELKUN et al. 1995) podendo avaliar-se polimorfismos entre amostras isoladas de animais doentes e animais sãos. A heterogeneidade genética entre amostras de *S. suis* foi observada anteriormente através de outras técnicas como: ribotipagem e multilocus enzyme eletroforesis. Estes achados sugerem que diferentes clones de *S.suis* podem estar associados a patologias em suínos.

A partir do teste de RAPD obtivemos um dendograma onde pudemos identificar um grande “cluster” denominado por nós de “cluster” A, e este, por sua vez, subdividido em outros dois “clusters” A1 e A2 . Em A1 pudemos agrupar 10% das amostras e no “cluster” A2 ficaram agrupadas 90% das amostras, incluindo a amostra padrão

31533 (corresponde a amostra 31 no dendograma). Esta amostra padrão originária da França, apresentou um grau de similaridade de aproximadamente 40% em relação as amostras de *S.suis* sorotipo 2 isoladas no Brasil. Este dado poderia indicar que estas amostras teriam um ancestral comum que as originou.

Todas as amostras apresentaram alto grau de similaridade e parece que os “clusters” formados estão mais relacionados ao fenótipo das amostras definido por MRP,EF e hemolisina do que pela origem geográfica. Todas as amostras isoladas por nós apresentaram o mesmo padrão fenotípico (MRP+ EF* SUI+). Neste grupo duas amostras se diferenciaram um pouco: 527 , de fenótipo MRP+ EF+ Suilisina+ e a amostra 21 com o mesmo padrão fenotípico das demais (MRP+ EF* Suilisina+).

Um estudo recente indicou que amostras MRP+ (ou MRPs+) EF+ exibem um único padrão ribotípico (SMITH et al,1997) o que sugere que tanto a ribotipagem como a análise através do RAPD podem ser usados na detecção de patógenos MRP+EF+SUI+. Porém quando se tratam de amostras que não expressam MRP e EF , como por exemplo as amostras canadenses, estes métodos não são suficientes para detecção destes patógenos. De acordo com CHATELIER et al (1999), foi observada uma nova correlação genotípica e fenotípica entre amostras que não expressam MRP,EF e Suilisina . Através do RAPD foi formado um “cluster” composto por nove isolados de animais doentes e seis isolados de animais sãos . O fato de isolados de animais sãos estarem relacionados do ponto de

vista genômico com isolados de animais doentes reforça a importância dos fatores relacionados ao hospedeiro para a ocorrência da infecção.

Os autores sugerem que a virulência de *S.suis* é um processo multifatorial no qual funções particulares podem ser preenchidas por fatores alternativos também sugerem que a síntese das proteínas MRP e EF estão mais coincidentemente associadas à virulência do que sendo realmente fatores de virulência por si. No entanto a produção de MRP e EF associada com virulência é observada em alguns países e não em outros. As amostras Norte americanas isoladas de casos agudos de septicemia ou meningite, tanto isoladas de humanos como de suínos são MRP e/ou EF negativos (GOTTSCALK et al.1998; CHATELIER et al.1999) . Novamente o termo virulência é pobre para definir *S.suis*.

Em termos de Brasil, é muito importante a identificação correta deste patógeno, através de testes bioquímicos e sorológicos adequados, pelo fato de até o momento não temos este patógeno causando problemas mais sérios de Saúde Pública.

Outro aspecto bastante interessante é que embora as amostras tenham sido isoladas de diferentes regiões brasileiras ilustradas na Tabela 1, as amostras apresentaram uma distribuição clonal quando submetidas ao teste de RAPD com diferentes iniciadores e comparadas a amostras padrão de outros países. Pela distância entre as cidades das quais as amostras foram isoladas poderíamos supor que todas tenham tido uma amostra ancestral comum. A distribuição

com relação à frequência de sorotipos isolados pode mudar com o passar do tempo e dependendo da região em que é isolada a amostra.(ARENDS & ZANEN, 1988; GOTTSCHALK & SEGURA, 2000)

Porém como se tratam de estudos preliminares em nosso país seria necessário o isolamento de um número maior de amostras, inclusive provenientes de outras regiões, para que pudéssemos compreender o que ocorre neste momento com relação a este importante agente zoonótico, o *Streptococcus suis*, na Suinocultura Brasileira.

Ressalte-se, em relação as amostras isoladas nesta pesquisa, a predominância dos sorotipos 2 e 3, no que tange aos demais sorotipos, como agente causal de enfermidades em suínos, em especial o sorotipo 2. Estudos mais detalhados, relativos à produção de marcadores de virulência estão sendo levados a efeito com as amostras de sorotipo 2, para compararmos estas amostras com as isoladas em outros países, onde também predomina o sorotipo 2, como causa de enfermidade em suínos.

Finalmente chamamos a atenção para o fato que diante da literatura nacional disponível, é este o primeiro relato abrangente sobre a ocorrência de *S. suis* em nossas criações de suínos, em particular ao que tange a prevalência do sorotipo 2, causando enfermidade típica em suínos, em diferentes municípios, abrangendo os estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná (Tabela1), caracterizada mormente por septicemia, meningite e pneumonia. Não

podemos deixar de chamar a atenção para o encontro de outros sorotipos com uma frequência considerável, em especial em relação aos sorotipos 3 e 7. Digno de nota, embora tenha sido isolada apenas uma amostra é o sorotipo 14, considerado como um dos mais zoonóticos, no sentido de produzir meningite em humanos (ARENDS & ZANEN, 1988).

Portanto, com o intuito de alertar as autoridades sanitárias, achamos que este trabalho é pioneiro em relação à América do Sul e que esforços não devem ser poupados no sentido de estimular os laboratórios de diagnóstico veterinário para incrementar suas infra-estruturas para isolamento da bactéria e posterior encaminhamento a centros como o que foi criado na UNICAMP, como resultado deste trabalho de tese, para uma identificação primária, dirigida mais especificamente aos sorotipos 1 a 8, particularmente ao sorotipo 2, que é o mais encontrado em quase todos os países como causa de enfermidade em suínos, o que foi por nós confirmado.

7- Conclusão

Os resultados obtidos no estudo das 51 amostras de *Streptococcus suis* permitiu-nos apresentar as seguintes conclusões:

- 1- Os meios seletivos e testes bioquímicos simplificados utilizados nesta pesquisa permitiram a identificação exata das amostras de *Streptococcus suis* isoladas de quadros clínicos compatíveis com enfermidades causadas por este agente.
- 2- O teste de Coaglutinação mostrou-se eficaz na identificação sorológica das amostras de *Streptococcus suis*.
- 3- A frequência dos sorotipos isolados encontrados no Brasil até o momento indica o sorotipo 2 como o mais prevalente, seguido pelos sorotipos 3,7,1 e 14.
- 4- O teste de Hemaglutinação com hemáceas de diferentes espécies animais não apresentou resultados significativos.
- 5- O teste de PCR identificou as amostras produtoras das proteínas MRP e EF tendo sido confirmadas no teste de Immunoblotting. Todos os fenótipos descritos para *Streptococcus suis* com relação a estas proteínas foram encontrados em nossas amostras.

6- As amostras produtoras de Suilisina só puderam ser identificadas por Immunoblotting por nosso co-orientador no laboratório do GREMIP-Canadá.

7- O teste de RAPD mostrou-se eficaz no agrupamento das amostras de *Streptococcus suis* apresentando um dendograma com distribuição clonal das amostras brasileiras, com grau de similaridade de 40% em relação à amostra 31533 originária da França e com fenótipo MRP+, EF+ e Suilisina +.

8- Apêndice

1.0-Soluções

1.1. Tampão Salina Fosfatada (PBS) 0,1M

NaCl.....	80,0 g
KCl.....	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O.....	28,9 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
Água Milli-Q.....	1000 ml

1.2. Formalina

PBS.....	100 ml
Formaldeído a 37%.....	8 ml

1.3. Tripsina

Tripsina (DIFCO).....	2,0 g
Solução Salina.....	10 ml

1.4. Solução Bloqueadora

Triton.....	0,1%
Leite MOLICO.....	4%
PBS 0,05M pH 7,4	

1.5. Tampão TE 10x

100mM Tris/HCl

10mM EDTA

1.6. Solução SDS/Proteinase K

Misturar 5 μ l de uma solução de proteinase K (10 mg/ml) com 70 μ l de SDS 10%

1.7. Solução CTAB/ NaCl

4,1 g de NaCl em 80 ml de água Milli -Q

10g de CTAB (aquecer a 65°C para dissolver)

Ajustar o volume para 100ml. Estocar em temperatura ambiente.

1.8. Tris Borato (TBE)

Tris Base.....54 g

Ácido Bórico.....27,5 g

EDTA 0,5M.....20 ml

Água destilada.....1000 ml

Ajustar o pH da solução de EDTA em 8.0 e autoclavar

1.9. Tampão de Ressuspensão

0,25% de azul de bromofenol

0,25% de xileno cianol

40% de sacarose

RNAse 20 μ g/ml

1.10. Tampão TRIS 0,05M pH 7,6

Dissolver 6,1g de Tris-base (trishydroxymethyl aminomethane) em 50ml de água destilada. Adicionar 37ml de ácido hidrocloreídrico 1N. Diluir a um volume total de 1 litro com água destilada.

1.11. Tampão TRIS-SALINA

Misturar 100 ml de Tampão TRIS 0,05M em 900ml de Salina a 0,85%.

1.12. Solução estoque para Tampão de Amostra

Estocado a temperatura ambiente

Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.....	1,2 ml
Glicerol.....	1,0 ml
SDS 10% (p/v).....	2,0 ml
Azul de bromofenol 10,1% (p/v).....	0,5 ml

1.13. Tampão de Amostra

Preparado antes de usar

β - mercaptoetanol.....	25 μ l
tampão de amostra (estoque).....	475 μ l

1.14. Gel de Poliacrilamida 5%

H2O Milli-Q.....	7,85 ml
Tampão Tris 1,5 pH 8,8.....	4,37 ml
Acrilamida /bisacrilamida 30%.....	4,65 ml
SDS 10%.....	175 μ l
TEMED.....	12,50 μ l
Persulfato de Amônio 10%.....	125 μ l

1.15. Gel de Empacotamento

H2O Mili-Q.....	3,34 ml
Tampão Tris 1,5M pH6,8.....	2,50 ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30%.....	0,75 ml
SDS 10%.....	50 μ l
TEMED.....	15 μ l
Persulfato de Amônio 10%.....	15 μ l

1.16. Tampão de Corrida (10x)

Tris Base.....	6,06 g
Glicina.....	28,82 g
SDS.....	1,00 g
H2O destilada.....	100 ml

1.17 Tampão de Transferência

Glicina.....	2,93g
Tris Base.....	5,81 g
SDS.....	0,375 g
Metanol.....	200 ml
H2O destilada.....	1000 ml

1.18. Solução de Ponceau S (Solução reversível)

Ponceau S	0,5%
Ácido Acético Glacial.....	1 ml
H2O destilada.....	100 ml

1.19. Solução Reveladora

Misturar as soluções A e B descritas abaixo

Solução A

Cloronaftol	30mg
Metanol.....	10 ml

Solução B

Peróxido de Hidrogênio.....30 μ l

Tampão Tris – Salina.....10 ml

Referências Bibliográficas

AMASS, S. F. 1997. Erradication, prevention, and treatment of meningitis in weaned pigs caused by *Streptococcus suis*. Proc. Am. Assoc. Swine Pract: 411-414. Quebec, Canada

AUSUBEL, F. M; BRENT, R; KINGSTON, R.E.E; MOORE, D. D.; SMITH, J.A.; SEIDMAN, J.G.; & STRUHL, K. 1988. Current Protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates, Brooklyn. N.Y.

ARENDS, J. P; and H. C. ZANEN. 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. Vet. Infet. Dis. 10: 131-137.

BEAUDOIN, M., HAREL, J., HIGGINS, R., GOTTSCHALK, M., FRENETTE, M., & MACINNES, J.I. 1992. Molecular analysis of isolates of *Streptococcus suis* capsular type 2 by restriction-
endonuclease-digested DNA separated on SDS-PAGE and by hybridization with a rDNA probe. J.Gen. Microbiol., 138: 2639-2645.

BENTLY, R. W., LEIGH, J. A., & COLLINS, M. D. 1991. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol., 41: 487-494

BRISEBOIS, L.M., CHALESBOIS, R., HIGGINS, R., & NADEAU, M. 1990. Prevalence of *Streptococcus suis* in four to eight week old clinically healthy piglets. Can. J.Vet. Res., 54: 174-177.

CANTIN, M., HAREL, J., HIGGINS, R. & GOTTSCHALK, M. 1992. Antimicrobial resistance patterns plasmids profiles of *Streptococcus suis* isolates. J. Vet. Diag. Invest., 4: 170-174.

CHANTER, N., JONES, P. W., & ALEXANDER, T.J.L. 1993. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis*- a speculative review. Vet. Microbiol., 36: 39-55.

CHARLAND, N., KOBISH, MARTINEAU-DOIZÉ, B., JACQUES, M., & GOTTSCHALK, M. 1996. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. Proc. 14 th Int. Pig. Vet. Soc., 297.

CHATELLIER, S., GOTTSCHALK, M., HIGGINS, R., BROUSSEAU, R., HAREL, J., 1999. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographical origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. J. Clin. Microbiol. 37:362-366.

CLIFTON-HARDLEY, F. A. 1984. Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. Vet. Res. Comm., 8: 217-227.

CLIFTON-HARDLEY, F. A., ALEXANDER, T. J. L., & ENRIGHT, M. R. 1986a. Diagnosis of *Streptococcus suis* infection in pigs. Proc. Pig. Vet. Soc., 14: 27-34.

CLIFTON-HARDLEY, F. A., ALEXANDER, T. J. L., & ENRIGHT, M. R. 1986b. The epidemiology, diagnosis, treatment and control of *Streptococcus suis* type 2 infection. Proc. Am. Assoc. Swine. Pract: 473-491.

CLIFTON-HARDLEY, F. A., ALEXANDER, T. J. L., ENRIGHT, M. R., & GUISE, J. 1984. Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2 by sampling tonsils of slaughtered pigs. Vet. Rec., 115: 562-564.

CLIFTON-HARDLEY, F. A., & ENRIGHT, M. R. 1984. Factors affecting the survival of *Streptococcus suis* type 2. Vet. Rec., 114: 585-587.

COOPER, V. L., DOSTER, A. R., HESSE, R. A., & HARRIS, N. B. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome-NEB-1 PRRSV infection did not potentiate bacterial pathogens. J. Vet. Diagn. Invest., 7: 313-320.

DEE, S. A., & CARLSON, A. R., WINKELMAN, N. L., & COREY, M. M. 1993. Effect of management practices on the *Streptococcus suis* carrier in nursery swine. J. Am. Vet. Med. Assoc., 203: 295-299.

DEE, S.A., & COREY, M. M. 1993. The survival of *Streptococcus suis* on farm and veterinary equipment. Swine. Health. Prod., 1: 17-20.

DEL CAMPO SEPULVEDA, E., M., ALTMAN, E., KOBISH, M., D'ALLAIRE, S., & GOTTSCHALK, M. 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. Vet. Microbiol., 52: 113-125.

DEVRIESE, L. A., CEYSSENS, K., HOMMEZ, J., KILPPER-BALZ, R., & SCHLEIFER, K. H. 1991. Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method. Vet. Microbiol., 26: 141-150.

DEVRIESE, L. A., CRUZ COLQUE, J. I., DE HERDT, P., & HAESBROUCK, F. 1992b. Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. J. Appl. Bacteriol., 73: 421-425.

DEVRIESE, L. A., HOMMEZ, J., POT, B., HAESBROUCK, F. 1994b. Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. J. Appl. Bacteriol., 77: 31-36.

DEVRIESE, L. A., KILPPER-BALZ, R., & SCHLEIFER, K. H. 1988. *Streptococcus hyointestinalis* sp. nov. from the gut of swine. Int. J. Syst. Bacteriol., 38: 440-441.

ELLIOT, S.D. 1966. Streptococcal infection in young pigs. I. An immunological study of the causative agent (PM *streptococcus*). J. Hyg. Camb 64: 205-212.

ENRIGHT, M. R., ALEXANDER, T. J. L., & CLIFTON-HARDLEY, F. A. 1987. Role of houseflies (*Musca domestica*) in the epidemiology of *Streptococcus suis* type 2. Vet. Rec., 121: 132-133. *suis* isolations by

serotype and tissue of origin. Proc. Am. Assoc. Swine. Pract., 79-81.

ERICKSON, E. D., DOSTER, A.R., & POKOMY, T. S. 1984. Isolation of *Streptococcus suis* from swine in Nebraska. J. Am. Med. Vet. Assoc., 185: 666-668.

FIELD, H. I., BUNTAIN, D., DONE, J.T. 1954. Studies on piglet mortality. I. Streptococcal meningitis and arthritis. Vet. Rec., 66: 453-455.

GALINA, L., COLLINS, J. E., PIJOAN, C. 1992. Porcine *Streptococcus suis* in Minnesota. J. Vet. Diagn. Invest., 4: 195-196.

GALINA, L., PIJOAN, C., SITJAR, M., CHRISTIANSON, W. T., ROSSOW, K., & COLLINS, J. E. 1994. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. Vet. Rec., 143: 60-64

GALINA, L., VECHT, U., WISSELINK, H. J., & PIJOAN, C. 1996. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A based on the presence of muramidase-released protein and extracellular-factor. Can. J. vet. Res., 60: 72-74

GOGOLEWSKI, R. P., COOK, R. W., & O'CONNEL, C. J. 1990. *Streptococcus suis* serotypes associated with disease in weaned pigs. Austr. Vet. J., 67: 202-204.

GOTTSCHALK, M., HIGGINS, R., JACQUES, M., MITTAL, K. R., & HENRICHSEN, J. 1989 Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol., 27: 2633-2635.

GOOTSCHALK, M., PETIBOIS, S., HIGGINS, R., and JACQUES, M. 1991. Adherence of *Streptococcus suis* capsular type 2 to lung sections. Can. J. Vet. Res., 55: 302-304.

GOTTSCHALK, M., SEGURA, M. 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *S. suis* : the unresolved questions. *Vet. Microbiol.*, 76: 259-272.

HAMPSON, D. J., TROTT, D. J., CLARKE, I. T., MWANIKI, C. G., & I. D. ROBERTSON. 1993. Population structure of Australian isolates of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 2895-2900.

HAREL, J., HIGGINS, R., GOTTSCHALK, M., & BIGRAS-POULIN, M. 1994. Genomic relatedness among reference strains of different *Streptococcus suis* serotypes. *Can. J. Vet. Res.*, 58: 259-262.

HAATAJA, S., TIKKANEN, K., LIUKONEN, J., FRANÇOIS-GERARD, C., & FINNE, J. 1993. Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, 268: 4311-4317.

HEALTH, P. J., HUNT, B. W., DUFF J. P., and WILKINSON, J. D. 1996. *Streptococcus suis* serotype 14 as a cause of pig disease in the UK. *Vet. Rec.*, 139: 450-451.

HIGGINS, R., & GOTTSCHALK, M. 1990. Na update on *Streptococcus suis* identification. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2: 249-252

HIGGINS, R., and GOTTSCHALK, M. 1996. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1995. *Can. Vet. J.*, 37: 242

HIGGINS, R., GOTTSCHALK, M., BOUDREAU, M., LEBRUM, A., HENRICHSEN, J. 1995. Description of Sex new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *J. vet. Diagn. invest.*, 7: 405-406.

HOGG, A., AAMASS, S. F., HOFFMAN, L. J., WU, C. C., and CLARK, L. K. 1996. A survey of *Streptococcus suis* isolations by serotype and tissue of origin. *Proc. Am. Assoc. Swine. Pract.*, 79-81.

IGLESIAS, J. G., TRUJANO, M., & XU, J. 1992. Inoculation of pigs with *Streptococcus suis* type 2 alone or in combination with pseudorabies virus. Am.J .Vet. Res., 53: 364-367.

JACOBS, A. A. C., VAN DEN BERG, A. J. G., & LOEFFEN, P. L. W. 1996. Protection of experimentally infected pigs by suilisin, the thiol-activated hemolysin of *Streptococcus suis*. Vet .Rec., 139: 225-228.

JACOBS, A. A. C., LOEFFEN, P. L. W., VAN DEN BERG, A. J. G., & STORM, P. 1994. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. Infect. Immun., 62: 1742-1748.

JACQUES , M., GOTTSCHALK, M., FOIRY, B., and HIGGINS, R. 1990. Ultrastructural study on surface components of *Streptococcus suis* . J. Bacteriol., 172: 2833-2838.

JANSEN, E. J., & VAN DORSSSEN, C. A. 1951. Meningoencephalitis bij varkens door streptococcen. Tijdschr. Diergeneeskd., 76: 815-832.

KATAOKA, Y., SUGIMOTO, C., NAKAZAWA, M., MOROZUMI, T., & KASHIWAZAKI, M. 1993. The epidemiological studies of *Streptococcus suis* infections in Japan from 1987 to 1991. J. Vet. Med. Sci., 55: 623-626.

KATAOKA, Y., YAMASHITA, T., SUNAGA, S., IMADA, Y., ISHIKAWA, H., KISHIMA, M., & NAKAZAWA, M. 1996. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody against *Streptococcus suis* type 2 in infected pigs. J. Vet. Med. Sci., 58: 368-372. 1996.

KATSUMI, M.J., SAITO,T.,KATAOKA,Y., ITOH, T., KIKUSHI, N., and HIRAMUNE,T.1996. Comparative preparation methods of syalilated capsule antigen from *Streptococcus suis* type 2 with specific
 KILPER-BALZ, R., & Schleifer, K. H. 1987. *Streptococcus suis* sp. nov.;nom. rev. Int. J .Syst. Bacteriol., 37: 160-162.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227: 680-685.

MACLENNAN,M., FOSTER, G., DICK, K., SMITH, W. J., & NIELSEN, B.1996. *Streptococcus suis* serotypes 7,8 and 14 from diseased pigs in Scotland. Vet. Rec., 139: 423-424.

MITTAL, K., R. HIGGINS, S. LAVRIÉRE, and D. LEBLANC. 1984. A 2-mercaptoetanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. Am J. Vet. Res. 45: 715-719.

MONGOLLON, J. D., PIJOAN, C., MURTAUGH, M. P., KAPLAN, E. L., CLEARY, P. P.1990. Characterization of prototype and clinically defined strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. J. Clin. Microbiol., 28: 2462-2466.

MONTER FLORES , J. L., HIGGINS, R., D'ALLAIRE, S., CHARETTE, R., BOUDREAU, M., & GOTTSCHALK, M. 1993. Distribution of the different capsular types of *Streptococcus suis* in nineteen swine nurseries. Can. Vet .J., 34: 170-171.

MWANIKI, C. G., ROBERTSON, I. D., & HAMPSON, D. J. 1994. The prevalence of *Streptococcus suis* type 2 in Western Australian piggeries. Austr. Vet. J., 71: 385-386.

NIELSEN, N. C., BILLE, N., LARSEN, J.L., AND SVENDSEN, J. 1975. Preweaning mortality in pigs. 7. Polyarthrititis. Nord. Vet. Med., 27:529-543.

ORR, J., COPELAND, S., & CHIRINO-TREJO, M. 1989. *Streptococcus suis* type 9 outbreak in swine. Can. Vet. J., 30: 680.

PERCH, B., PEDERSEN, K. B., & HENRICHSEN, J. 1983. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol., 17: 993-996.

PIJOAN, C. 1996. Bacterial respiratory pathogens: what is their impact ?Proc. 4th .Ann .Swine.Dis .Conf. Swine. Pract., 45-47.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. & OWEN, R.J.- 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with Guanidium thiocyanate. Letters in Applied Microbiology. 8 : 151-156.

PRIETO, C., GARCIA, F.J., SUAREZ, P., IMAZ, M., & CASTRO, J. M. 1994. Biochemical traits and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughtered pigs. J. Vet. med. B., 41: 608-617.

QUESSY, S., BUSQUE, P., HIGGINS, R., JACQUES, M., DUBREUIL, J. D. 1997. Description of an albumin binding activity for *Streptococcus suis* serotype 2. FEMS. Microbiol. Lett., 147: 245-250.

QUESSY, S., DUBREUIL, D., CAYA, M., LÉTOUMEAU, R., & HIGGINS, R. 1994a. Comparison of pig, rabbit and mouse IgG response to *Streptococcus suis* serotype 2 proteins and active immunization of mice against the infection. Can. J. Vet. Res., 58: 220-223.

REAMS, R. Y., GLICKMAN, L. T., HARRINGTON, D. D., THACKER, H. L., & BOWERSOCK, T. L. 1994. *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. J .Vet. Diagn. Invest., 6: 326-334.

REAMS, R. Y., HARRINGTON, D. D., GLICKMAN, L. T., THACKER, H. L., BOWERSOCK, T. L. 1995. Fibrinohemorrhagic pneumonia in pigs naturally infected with *Streptococcus suis*. J. Vet. Diagn. Invest., 7: 406-408.

REAMS, R. Y., HARRINGTON, D. D., GLICKMAN, L. T., THACKER, H. L., & BOWERSOCK, T. L. 1996. Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. J .Vet. Diagn. Invest., 8: 119-121.

ROBERTSON, I. D., & BLACKMORE, D. K. 1989a. Prevalence of *Streptococcus suis* type 1 e 2 in domestic pigs in Australia and New Zeland. Vet. Rec., 124: 391-394.

ROBERTSON, I. D., & BLACKMORE, D. K. 1989b. Occupational exposure to *Streptococcus suis* type 2. Epidemiol. Inf., 103: 157-164.

ROBERTSON, I. D., & BLACKMORE, D. K., HAMPSON, D. J., & FU, Z. F. 1991.A longitudinal study of natural infection of piglets with *Streptococcus suis* types 1 and 2. Epidemiol. Infect .,107: 119-126.

ROBINSON, I. M., STROMLEY, J. M., VAREL, V. H., & CATO, E. P. 1988. *Streptococcus intestinallis*: a new species from the colons and feces of pigs. Int. J. Syst .Bacteriol ., 38: 245-248

SALA,V.,COLOMBO ,A., & GEROLA,L. 1989. Infections risks of *Streptococcus suis* type 2 localizations in slaughtered swine. Arch. Vet.Italiano., 40: 180-184

SANFORD, S.E. 1987a. Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs. II. Central nervous system lesions. Can.J. Vet. Res.,51: 481-485.

SANFORD, S.E. 1987b. Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs. II. Central nervous system lesions. Can. J .Vet. Res., 51: 486-489.

SANFORD,S.E., & TILKER, A.M.E. 1982. *Streptococcus suis* type II-associated diseases in swine: observations of a one-year study. J. Am. Med. Vet .Assoc., 181: 673-676.

SERHIR, B.,HIGGINS,R., FOIRY,B., & JACQUES ,M. 1993. Detection of immunoglobulin-G-binding proteins in *Streptococcus suis*. J. Gen. Microbiol., 139: 2953-2958.

SIHVONEN, L., KURL, D.N., & HENRICKSEN,J. 1988. *Streptococcus suis* isolated from pigs in Finland. Acta. Vet. Scand .,29: 9-13.

TIKKANEN,K., HAATAJA,S., & FINNE,J. 1996. The galactosyl-(alpha-1-4)-galactose-binding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies. Infect. Immun., 64: 3659-3665.

VAN DER VOSSEN, J. M. B. M., J. KOK, & G. VENEMA. 1985. Construction of cloning, promoter-screening, and terminator-screening shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

VAN ZIJDERVELT, F. G., F. WESTENBRINK, J. ANAKOTTA, R. A. M. BROUWERS, & A. M. VAN ZIJDERVELT. 1989. Characterization of F41 fimbrial antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* by using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, 57: 1192-1199.

VASCONCELOS, D., MIDDLETON, D.M., & CHIRINO-TREJO, J.M. 1994. Lesions caused by natural infection with *Streptococcus suis* type 9 in weaned pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6: 335-341.

VECHT, U., WISSELINK, H.J., JELLEMA, M.L. & SMITH, H.E. 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect. Immun.*, 59: 3156-3162.

VECHT, U., WISSELINK, H.J., REEK, F.H., STOCKHOFER-ZURWIEDEN, N., & SMITH, H.E. 1996. Diagnosis of several capsular serotypes of *Streptococcus suis* by phenotype and PCR and the relation with virulence for pigs. *Proc. 14th. Int. Pig .Vet .Soc.*, 298.

VECHT, U., J. P. ARENDS, E. J. VAN DER MOLEN, and L. A. M. G. VAN LEENGOED. 1989. Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 50: 1037-1043.

VENA, M.M., MIQUET, J.M., & ISEN, S. 1991. *Streptococcus suis* isolated from an outbreak of pig pneumonia. *Vet. Arg.*, 8: 316-319

WILLIAMS, A.E.1900. Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. Microbiol.Pathogen., 8: 189-196.

WILLIAMS, J.G; KUBELICK, A. R.; LIVAK,K.J.; RAFALSKY, J.A & TINGLY, S.V.- 1990. DNA POLYMORPHISMS AMPLIFIED BY ARBITRARY PRIMERS ARE USEFUL AS GENETIC MARKERS. Nucleic Acids Res. 18 (22): 6531-6535.

WISSELINK, H, J., SMITH,H. E., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N., PEPPERKAMP, KK., VECHT, U. 2000. Distribution of capsular types and production of muramidase released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. Vet Microbiol., 74:237-248.

ZANEN, H. C., AND H.W.. B. ENGEL. 1975. Porcine streptococci causing meningitis and septicemia in man. Lancet in: 1286-1288.