

T636.089 69  
C 837b  
2000

Adrienny Trindade Reis Costa

SOROTIPIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE AMOSTRAS DE  
*Streptococcus suis* ISOLADAS DE SUÍNOS

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial para obtenção de grau de Mestre em Medicina  
Veterinária.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Francisco Carlos Faria Lobato

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2000

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

21/02/01

151701-05

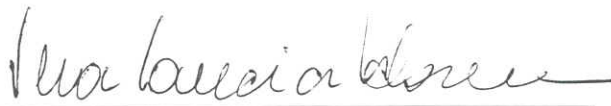
0305 - 57660

C837 Costa, Adrienny Trindade Reis, 1968-  
2000 Sorotipificação e avaliação da patogenicidade de amostras de *Streptococcus suis* isoladas de suínos / Adrienny Trindade Reis Costa. – Belo Horizonte: UFMG–Escola de Veterinária, 2000.  
29p.: il.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Meningoencefalite – Teses. 3. Estreptococo – Teses. I. Título.  
CDD – 636.408 96

Dissertação defendida e aprovada em 27 de setembro de 2000, pela Comissão Examinadora constituída por:



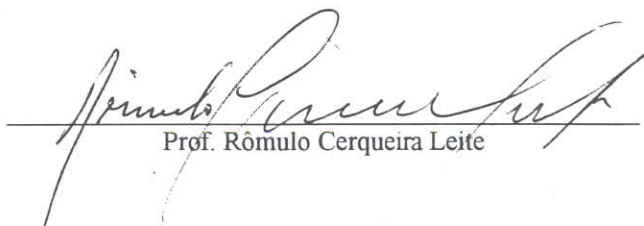
Prof. Francisco Carlos Faria Lobato  
Orientador



Profa. Vera Lúcia Viegas de Abreu



Prof. José Britto de Figueiredo



Prof. Rômulo Cerqueira Leite



Prof. Israel José da Silva

A Rodrigo, meu marido e a Gabriel, meu filho, pelo amor, incentivo e carinho que possibilitaram a realização deste trabalho. A Lucinha, minha mãe e a Ronaldo, meu pai, pelo grande apoio e estímulo constantes. Às minhas irmãs e a meu irmão, pela amizade, apoio e ensinamentos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Francisco Lobato, pela orientação, atenção e amizade.

Aos diretores do laboratório IPEVE, Prof. Ernane Fagundes do Nascimento e Dra. Hélen Bernadete Coelho Ferreira, pela oportunidade e fornecimento das condições básicas para a realização da fase experimental deste trabalho.

Ao Prof. Ronaldo Reis, meu pai, pelo indispensável conhecimento, suporte técnico e paciência.

À Profa. Vera Lúcia Viegas de Abreu, pela constante orientação e dedicação.

Ao Dr. Britto, pela contribuição técnica e amizade.

Ao Prof. Israel José da Silva, pela contribuição científica.

Aos professores do curso de pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva, em especial ao Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins, pelos ensinamentos

Às amigas Ana Paula Guerra dos Santos e Rosana Rodrigues Baia, pelo coleguismo e ajuda prestada na execução do projeto.

A todos os funcionários do IPEVE, pela solidariedade e coleguismo.

Aos veterinários do Laboratório Biovet, pelo suporte técnico.

Ao colega Dr. Ricardo Aurélio do Nascimento, do LARA, pela disponibilidade, atenção e colaboração técnica.

Aos colegas Dr. Sérgio Madureira, Dr. Itamar Piffer, Dra Suzete Lora Kuana, Dr. Rubens Faria Filho, Dr. José Eustáquio Cavalcanti, Dr. Anísio Alvarenga Pires, pelo constante envio de materiais para diagnóstico.

À Dra. Flávea Trindade Reis Zagury, minha irmã e amiga, pelo interesse, incentivo e contribuição.

Ao Dr. Marcelo Gottschalk, pelos inesgotáveis ensinamentos e fundamental colaboração técnica.

Ao Prof. Hilton Girão, pelo apoio e orientações.

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite, pelo estímulo e apoio demonstrado no decorrer do curso.

Ao colega Dr. Nelson Éder Martins, pelo apoio e agradável convivência.

Ao Dr. Ronaldo Sanches, pela contribuição.

Aos colegas do curso de mestrado, pelo companheirismo e agradável convivência.

Aos funcionários da Biblioteca da Escola, pela colaboração e eficiência.

Àqueles que, de alguma maneira, contribuíram para realização deste trabalho.

A Deus, por haver me dado saúde e disposição para executar este trabalho.

SUMÁRIO

	pág.
RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	13
2 LITERATURA CONSULTADA .....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 Locais da pesquisa .....	16
3.2 Amostragem .....	16
3.3 Animais de experimentação .....	16
3.4 Meios de cultura .....	17
3.5 Isolamento das amostras .....	17
3.6 Caracterização bioquímica das amostras isoladas .....	17
3.7 Classificação dos sorotipos .....	17
3.7.1 "Kit" utilizado .....	17
3.7.2 Preparo do antígeno .....	17
3.7.3 Prova de coaglutinação .....	18
3.8 Teste de patogenicidade em camundongos .....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
5 CONCLUSÕES .....	25
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25

---

LISTA DE TABELAS

---

TABELA 1- Número de amostras de <i>Streptococcus suis</i> isoladas de suínos em quatro regiões do Brasil, no período de 1997-2000. ....	19
TABELA 2- Sorotipos de <i>Streptococcus suis</i> isolados de suínos, por espécime clínico, oriundos das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, no período de 1997-2000. ....	19
TABELA 3- Frequência de sorotipos de <i>Streptococcus suis</i> isolados em quatro regiões do Brasil- 1997-2000. ....	21
TABELA 4- Patogenicidade em camundongos dos sorotipos de <i>Streptococcus suis</i> , isolados em espécimes clínicos de suínos das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, no período de 1997-2000. ....	22

---

FIGURA

---

FIGURA 1- Camundongos apresentando andar em círculos e opistótono, após inoculação por <i>Streptococcus suis</i> .....	23
--	----

---

## RESUMO

Um total de 186 amostras de *Streptococcus spp* foram isoladas de suínos com quadros de meningoencefalite, em quatro regiões do Brasil. Dentre elas, 110 foram identificadas como *Streptococcus suis*, pelas provas de amilase, acetoína (Voges Proskauer), catalase, crescimento em NaCl a 6,5%, hemólise e coloração de Gram. Submetidas à prova de coaglutinação para sorotipificação, os seguintes resultados foram encontrados: 42 amostras do sorotipo 2 (38,2%), 10 do sorotipo 14 (9,1%), 7 do sorotipo 9 (6,4%), três do sorotipo 7 (2,7%), três do sorotipo 11 (2,7%), duas do sorotipo 1 (1,8%), duas do sorotipo 8 (1,8%) e uma amostra de cada um dos sorotipos ½, 3, 5, 6, 10 (0,9%). Reações cruzadas entre os sorotipos 1, 14 e 7 foram observadas em 21 das amostras testadas (19,1%) e 15 (13,7%) não foram tipificadas. O teste de patogenicidade mostrou que 40,0% das amostras estudadas foram letais para camundongos.

Palavras-chave : Sorotipificação, meningoencefalite, *Streptococcus suis*, suínos, Brasil

## ABSTRACT

A total of 186 samples of *Streptococcus spp* were isolated from swine showing signs of meningoencephalitis of four regions of Brazil. Among these, 110 strains were identified as *Streptococcus suis* based on Gram staining, growth on 6,5% NaCl, hemolysis and biochemical tests for amylase, acetoin (Voges - Proskauer) and catalase. Serotyping of the strains resulted on the following classification: 42 strains of serotype 2 (38.2%), 10 strains of serotype 14 (9.1%), 7 strains of serotype 9 (6.4%), three strains of each serotype 7 and 11 (2.7%), two strains of each serotype 1 and 8 and one strain of each serotypes ½, 3, 5, 6 and 10 (0.9%). Cross reactions among serotypes 1, 14 and 7 were observed in 21 strains (19.1%). Only 40,0% of the isolated samples were lethal for mice at the pathogenicity test.

Key words: *Streptococcus suis*, meningoencephalitis, serotyping, Brazil

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções por *Streptococcus suis* têm aumentado em importância, tornando-se um dos maiores problemas sanitários para a indústria suinícola mundial, seja em criações convencionais, em rebanhos livres de patógenos específicos (SPF) ou de desmama precoce medicada e segregada (Mogollon et al., 1991; Clark et al., 1994). Fatores como o estresse térmico, lotação excessiva, doenças concorrentes, como a Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos (PRRS), pseudorraiva e infecções por *Bordetella bronchiseptica* contribuem para o aparecimento da doença (Staats et al., 1997; Halbur, 2000). Nos Estados Unidos, o *S. suis* tem sido encontrado em rebanhos infectados com o vírus da PRRS. Nessas granjas, as taxas de mortalidade na maternidade chegam a atingir até 25%. Problemas de *S. suis* associados à PRRS, em animais de engorda estão se tornando cada vez mais comuns. De acordo com resultados emitidos pelo laboratório de Iowa State University, nos últimos cinco anos, o número de casos de *S. suis* aumentou três vezes e o de PRRS associado ao *S. suis*, nove vezes (Halbur, 2000).

Com base nos antígenos capsulares polissacarídeos, já foram classificados 35 sorotipos de *S. suis* (sorotipo 1 a 34 e 1/2), e mais de um sorotipo pode ser encontrado em um mesmo rebanho ou em um mesmo animal (Gottschalk, 1999).

A forma mais comum da entrada do agente no rebanho dá-se pela introdução de fêmeas portadoras, que podem albergar o *S. suis* na vagina e também nas tonsilas (Rosendal et al., 1986). Vetores como moscas, fômites e roedores, podem participar na transmissão da doença entre animais e granjas (Gottschalk, 1999). A morbidade e a letalidade causadas pelo *S. suis* variam entre rebanhos. A morbidade geralmente alcança 5%, e a mortalidade oscila de 0 a 5%, mas pode, sem tratamento adequado, atingir 20% (Rosendal et al., 1986; Staats et al., 1997).

Nos Estados Unidos, as perdas econômicas na indústria suinícola por *S. suis* são

estimadas em mais de 300 milhões de dólares ao ano. Desta forma, medicações estratégicas, melhorias no manejo e vacinações têm sido realizadas com o objetivo de controlar a doença (Holt et al., 1988; 1989; 1990; Blouin et al., 1994; Busque et al., 1997; Hogg & Roggers, 1994; Quessy et al., 1994; Simonson et al., 1990). No Brasil, embora a doença tenha importância reconhecida, nenhum estudo foi feito visando a determinar os prejuízos por ela causados (Staats et al., 1997; Blouin et al., 1994).

É uma zoonose ocupacional, atingindo trabalhadores de frigoríficos, açougueiros e veterinários. O sorotipo 2 é o principal envolvido, causando febre e mal estar, podendo resultar em perdas auditivas permanentes, endocardite, meningite, septicemia e morte (Staats et al., 1997). Apenas um caso foi atribuído ao sorotipo 4 e 14. Até o momento, 153 casos foram relatados em vários países, principalmente na Europa e Sudeste da Ásia. O agente também tem sido isolado de cães, gatos, aves, cavalos e ruminantes (Clifton-Hadley et al., 1986; Vecht et al., 1985; Staats et al., 1997).

Suínos de todas as idades podem ser afetados, podendo apresentar a forma superaguda ou fulminante, quando os animais são encontrados mortos. Na forma aguda nervosa, a doença caracteriza-se por movimentos de pedalagem, opistótono, nistagmo, septicemia e morte; finalmente, na forma crônica, predomina um quadro de artrite, endocardite e pneumonia (Gottschalk, 1999).

O diagnóstico da enfermidade é possível pela associação entre a história, sinais clínicos, lesões macroscópicas, microscópicas e, principalmente, pelo isolamento do agente (Hommeiz et al., 1986; Kataoka et al., 1991; Rosendal et al., 1986; Moreau et al., 1989). Pelo fato de o *S. suis* ser um comensal da mucosa nasal, tonsilas e canal vaginal, materiais colhidos desses órgãos não são indicados para fins de diagnóstico. Cuidados de assepsia durante a coleta são essenciais para não haver a contaminação das amostras com outros

agentes durante o isolamento, em especial enterococos. Provas bioquímicas associadas à sorotipificação têm sido utilizadas para identificação final do agente. Dentre as técnicas para sorotipificação, a coaglutinação é a mais recomendada, por se tratar de um teste sensível e de fácil realização (Gottschalk, 1999; Gottschalk et al., 1993b, Gottschalk et al., 1995; Amass, 2000).

A necessidade da sorotipificação é fundamentada na produção de bacterinas compostas por sorotipos específicos e em estudos soro epidemiológicos, em função da diferença entre a cápsula polissacáride de cada sorotipo e da patogenicidade entre os sorotipos (Gottschalk, 1999; Holt et al., 1988).

O objetivo deste trabalho foi isolar, identificar, avaliar a patogenicidade em camundongos e sorotipificar as amostras de *S. suis* isoladas de suínos, provenientes das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do país, no período de 1997 a 2000.

## 2 LITERATURA CONSULTADA

Os primeiros relatos do isolamento de *S. suis* de suínos com artrite e meningite foram publicados em 1951, na Holanda e no Reino Unido (Staats et al., 1997). Desde então, o problema tem sido relatado em todos os países, onde a indústria suinícola é importante. No Brasil, a meningoencefalite estreptocócica foi relatada em vários estados por diferentes pesquisadores (Reis et al., 1980; Santos et al., 1999; Madureira & Soncini, 1999). Reis et al. (1980) relataram em Minas Gerais, oito surtos de meningoencefalite em suínos, na idade de 40 a 120 dias, causados pelo *S. suis*. O agente foi isolado de cérebro, sangue e exsudato sinovial, não sendo possível sua sorotipificação. Infecções associadas a esse microrganismo são observadas nos sistemas de criação tradicional e no moderno intensivo (Vecht et al., 1985).

O *Streptococcus suis* foi originalmente descrito como causa de artrite e meningite de leitões. O espécime continha os

sorotipos 1 e 2 (Sanford & Higgins, 1992; Staats et al., 1997), que correspondem aos sorogrupos S e R descritos em 1963 por De Moor. Mais recentemente, outras amostras mostrando características da espécie têm sido isoladas de uma variedade de condições clínicas e outros sorotipos têm sido acrescentados aos originais (Perch et al., 1983; Gottschalk et al., 1991).

É agente comum, podendo causar septicemia, meningite supurada, artrite, endocardite, polisserosite, pneumonia, septicemia e aborto, ocorrendo principalmente nos sistemas intensivos de produção (Staats et al., 1997; Mac Lennan et al., 1996). As amostras de referência originaram-se de suínos doentes, exceto o sorotipo 14, isolado em humanos e os sorotipos 17, 18, 19 e 21, de suínos clinicamente saudáveis. Os sorotipos 20, 31, 33 foram isolados de animais doentes; os dois primeiros de bovinos e o último de uma ovelha (Staats et al., 1997; Gottschalk & Higgins, 1990).

Até o momento, existem 35 sorotipos identificados, sendo o 2 mundialmente o mais isolado de casos clínicos de meningite, septicemia e pneumonia (Clifton - Hadley, 1984; Staats et al., 1997; Mongolon et al., 1991; Perch et al., 1983; Gottschalk, 1999). Apesar do grande número de sorotipos descritos, a maioria dos isolamentos se agrupa entre os sorotipos 1 e 8 (Gottschalk, 1999; Staats, 1997). Sorotipos isolados com menor frequência, como o 9 e 14, também são responsáveis por sérios surtos epidêmicos, causando septicemia, meningite e pneumonia em suínos após a desmama (Gottschalk, 1999; Gogolewski et al., 1990).

O *S. suis* possui inúmeros fatores de virulência, responsáveis pelas diferenças de patogenicidade entre as amostras, como o "Muramidase Released Protein" (MRP), fator extracelular (EF), cápsula, hemolisina, fímbrias, dentre outros (Vecht et al., 1991, 1993, 1996; Gottschalk et al., 1995, Gottschalk, 1998; Mogollon et al., 1990, 1991; Feder et al., 1994; Galina et al., 1996). Sugere-se que amostras que possuem a proteína MRP e o fator EF sejam

mais virulentas. Entretanto, foram isoladas amostras de animais doentes que não possuíam esses fatores (Vecht et al., 1996; Charland et al., 1996). A virulência para suínos está ligada à cápsula, embora existam amostras capsuladas avirulentas nessa espécie (Vecht et al., 1996; Gottschalk et al., 1993a). A hemolisina, designada suilisina, tem sido associada à virulência, em algumas amostras do sorotipo 2 (Gottschalk et al., 1993a; Jacobs et al., 1995; Feder et al., 1994). Anticorpos contra ela induzem proteção em camundongos e em suínos contra desafio experimental (Jacobs et al., 1996). Como o MRP e o EF, a suilisina também não é produzida por todas as amostras virulentas.

Modelos experimentais para avaliação da virulência das amostras de *S. suis* têm sido desenvolvidos (Staats et al., 1997). Trabalhos realizados com o sorotipo 2 mostraram que a raça e a idade dos camundongos, bem como a dose do inóculo devem ser considerados durante a execução dos testes, e os resultados indicam que o modelo em camundongos é bastante útil para a pesquisa de fatores da virulência desse microorganismo (Kataoka et al., 1991; Quessy et al., 1994; Smith, 1997). Por outro lado, Vecht et al. (1996), na Holanda, não consideram o modelo em camundongos compatível com o modelo em suínos. Segundo os autores, nenhum estudo foi capaz de avaliar o modelo pelo uso suficiente de amostras de *S. suis* sorotipo 2, das quais a patogenicidade também foi estabelecida em suínos.

O sorotipo 1 é endêmico na maioria dos rebanhos e acomete leitões na maternidade, entre uma e duas semanas de idade e, às vezes, até em seis semanas, causando artrite e, raramente, meningite (Sanford & Higgins, 1992).

O sorotipo 2, o mais freqüentemente encontrado, é responsável por um quadro de meningite endêmica, caracterizada por septicemia, pneumonia, endocardite, miocardite, problemas reprodutivos e poliartrite, em animais na fase de creche, recria e terminação. Entretanto, nem todas as amostras desse sorotipo têm a mesma

patogenicidade (Gottschalk et al., 1993b; Clifton-Hadley, 1984).

Os sorotipos 1-5, 7-9, 11 e 1/2 foram isolados de suínos com pneumonia fibrino-hemorrágica, além de meningite, septicemia e pneumonia (Reams et al., 1995; Gogolewski et al., 1990; Heath et al., 1996; Staats et al., 1997).

A freqüência dos sorotipos varia entre países. Na Itália, Coréia, Japão, Reino Unido, Brasil, Estados Unidos e Canadá, o sorotipo 2, isolado de suínos doentes, foi o mais encontrado (Sala et al., 1996; Santos et al., 1999; Gottschalk, 1999; Smith, 1997; Kataoka et al., 1991; Hommez et al., 1986; Luque et al., 1998).

Em estudo realizado por Gottschalk et al. (1999), na América do Norte, o sorotipo 2 foi o mais freqüente (35,48%), seguido pelos tipos 1/2(20,97%), 3(19,35%), 7(9,68%), 8(9,68%), 4(4,84%). No Brasil, em estudo realizado com 241 amostras de *S. suis* isoladas a partir de animais com encefalite e septicemia, foram encontrados, pela prova de coagulação, os sorotipos 2(62,7%), seguido dos sorotipos 1(7,5%), 3(5,4%), 7(2,9%), 8(2,9%), 4(22,1%), 1/2(0,4%), 5(0,4%), 6(0,4%) e 9(0,4%) (Santos et al., 1999). Madureira & Soncini (1999), em Santa Catarina, registraram as maiores prevalências da infecção por *S. suis*, nas idades de 7 a 10 semanas (36,5%) e 11 a 14 semanas (31,8%), tendo sido a meningite mais freqüente na primeira faixa etária. Nesse estudo, os resultados da sorotipificação mostraram maior freqüência do sorotipo 2 (38,6%), seguido pelos 1(9,1%) e 1/2 (9,1%). Encontraram também a presença dos sorotipos 9(6,8%), 4(4,5%), 7(4,5%), 11(2,3%), 17(2,3%) e 21(2,3%). Observou-se o isolamento de dois ou três sorotipos diferentes na mesma propriedade, e um total de 20,5% de amostras foi negativa ao teste de sorotipificação.

O sorotipo 14 foi descrito pela primeira vez na Escócia e tem crescido em importância em países como o Reino Unido (Heath et al., 1996). Foi encontrado em 4,4% das amostras isoladas na Espanha, 1% no Canadá (Gottschalk, 1999) e 25% na

Escócia. Tem sido isolado principalmente de leitões com artrite, meningite e septicemia, quadro semelhante ao encontrado em suínos infectados pelo sorotipo 2 (Mac Lenan et al., 1996; Heath et al., 1996).

O número de amostras não sorotipificadas varia entre países e depende diretamente do número de antissoros testados, presença de fenômenos de auto aglutinação e falta de cápsula. De acordo com Touil et al. (1988), 24% das amostras de *S. suis* isoladas na América do Norte, não foram sorotipificadas devido a esses fenômenos.

O isolamento de vários sorotipos em animais doentes também deve ser levado em consideração. Existe grande variação de virulência entre sorotipos e amostras do mesmo sorotipo (Vecht et al., 1993), embora o estudo realizado por Reams et al. (1995, 1996), não indicasse associação entre sinais clínicos e lesões macroscópicas com os sorotipos específicos. Drolet et al. (1992) verificaram a correlação entre virulência e perfil genético das amostras.

A identificação bioquímica das amostras é realizada com o mínimo de testes, quando a sorotipificação é possível. Devriese et al. (1990, 1991) e Gottschalk (1999) sugerem o uso do mínimo de provas: amilase, acetoina (Voges Proskauer) e a prova em meio contendo 6,5% de NaCl.

A sorotipificação baseada nos antígenos capsulares polissacarídes é parte importante do procedimento de rotina de diagnóstico. A determinação do sorotipo é recomendada por diversos autores e é muito útil quando a vacinação é considerada (Hogg & Rogers, 1994; Torremorell & Pijoan, 1996).

De acordo com Gottschalk et al. (1993b), a prova de coaglutinação é o teste de eleição. São utilizados reagentes polivalentes para triagem, facilitando o trabalho laboratorial e consequentemente resultando em menor consumo de tempo, sendo considerado rápido, sensível e específico.

A técnica de coaglutinação consiste em fenômeno baseado na habilidade da proteína A, produzida pelo *Staphylococcus*

*aureus*, de ligar a IgG pelo fragmento Fc, deixando o sítio de ligação dos anticorpos disponível para o antígeno homólogo. Se um anticorpo específico for ligado após adição do antígeno homólogo, o resultado será a aglutinação.

Algumas amostras reagem cruzadamente com mais de um antissoro, quando se realiza a coaglutinação ou o teste de reação capsular, entretanto estas podem ser removidas pela adsorção dos antissoros (Gottschalk et al., 1993b; Gottschalk & Higgins, 1990; Hampson et al., 1993). Tais reações podem ocorrer com mais de um antissoro ao teste de coaglutinação, como se observa entre os sorotipos 1 e 2 e o 1 e 14 (Done et al., 1998; Gottschalk et al., 1993b). Além disto, reações inespecíficas entre vários sorotipos podem ocorrer, necessitando de confirmação por outros testes, como o da precipitação capilar e da reação capsular (Gottschalk & Higgins, 1990).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Locais da pesquisa

O trabalho foi desenvolvido no Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas em Belo Horizonte, MG (IPEVE) e no Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura e Abastecimento em Pedro Leopoldo, MG, (LARA/P.L.-MG).

#### 3.2. Amostragem

Foram trabalhadas 186 amostras de *Streptococcus spp* isoladas em materiais colhidos de cérebro, líquido cefalorraquidiano, pulmões, articulações, sangue, miocárdio e líquido ascítico de suínos com sinais clínicos de meningoencefalite, originados das regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil.

#### 3.3 Animais de experimentação

Para realização dos testes de patogenicidade, foram empregados camundongos albinos, da raça "swiss", linhagem webster de ambos os sexos,

pesando entre 18-22 gramas, cedidos pelo biotério do LARA/PL, MG.

### 3.4 Meios de cultura

Para isolamento das amostras e provas bioquímicas, foram utilizados os seguintes meios:

- \* Meio modificado para tolerância ao NaCl, conforme Gottschalk et al. (1991);
- \* Meio de ágar sangue com 4% de sangue desfibrinado de carneiro;
- \* Columbia Blood Agar Base (DIFCO);
- \* MR-VP Medium (DIFCO).

No preparo do inóculo para as provas de patogenicidade em camundongos e prova de coaglutinação foi utilizado o meio de Todd Hewitt Broth, THB, (DIFCO)<sup>1</sup>.

Para a estocagem das amostras, foi utilizado o meio de ágar sangue, contendo 4% de sangue desfibrinado de carneiro.

### 3.5- Isolamento das amostras

Para o isolamento das amostras, os materiais colhidos foram semeados em ágar sangue de carneiro a 4%, em atmosfera de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>) e incubados a 37°C, por 12 horas.

### 3.6- Caracterização bioquímica das amostras isoladas

As amostras com características presuntivas de *Streptococcus suis* foram identificadas através da capacidade hemolítica em ágar sangue de carneiro, morfologia pelo método de Gram, provas bioquímicas de amilase, acetoina, catalase e crescimento em NaCl a 6,5% segundo Gottschalk et al. (1993b); Devriese et al. (1990, 1991); Tarradas et al., (1994). As amostras foram mantidas em ágar sangue de carneiro a 4%, à temperatura de 2 e 8°C, para realização da sorotipificação e prova de patogenicidade. Como controle das provas bioquímicas, foram utilizadas amostras de *S. suis*, *S. bovis* e *Enterococcus spp.*, gentilmente cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisas de Suínos e Aves (CNPSA)/ Embrapa/SC<sup>2</sup>.

### 3.7- Classificação dos sorotipos

#### 3.7.1- "Kit" utilizado

Foram utilizados três "Kits" comerciais, produzidos pelo laboratório Biovet<sup>3</sup>, composto pelos seguintes reagentes:

- 1- Reagentes polivalentes contra 16 sorotipos, assim agrupados:
  - Pool 1- Sorotipos 2, 3, 4 e 8
  - Pool 3- sorotipos 5, 6, 9 e 16
  - Pool 4- Sorotipos 10, 12, 13 e 14
  - Pool 6- Sorotipos 1, 7, 11 e 15
- 2- Antígenos de *S. suis* controles do sorotipo 1 ao 16
- 3- Reagentes monovalentes contra o sorotipo 1-16

#### 3.7.2- Preparo do antígeno

O antígeno para o teste de coaglutinação foi preparado segundo Gottschalk et al. (1993b), com modificações. As amostras de *S. suis* foram repicadas em ágar sangue, incubadas por 18 horas, a 37°C, em microaerofilia. Um subcultivo foi feito em tubos contendo cinco mL de caldo Todd Hewitt Broth e incubados durante 12 horas a 37°C. Em seguida, duas gotas de formol PA-37%(v/v)<sup>4</sup> não diluído foram acrescentadas aos cultivos, que foram incubados durante duas horas a 37°C, para inativação.

Os cultivos inativados foram centrifugados a 2000 x g por 10 minutos, em temperatura ambiente, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenso em salina tamponada (PBS), pH 7,2, contendo 0,5% de formol (v/v), até que o antígeno atingisse turvação semelhante a do tubo 10 da Escala de Mc Farland.

1 DIFCO Laboratories, Detroit, MI 48232

2 CNPSA-Centro Nacional de Pesquisas de Suínos e Aves, Concórdia, SC

3 Biovet-USA, Inc. 3055, Old Highway 8, Suite 100, St Anthony, MN 55418

4 Laboratório Reagen

### 3.7.3- Prova de coaglutinação

Uma gota do antígeno (30µL) foi misturado a uma gota de mesmo volume de cada um dos quatro reagentes polivalentes, em placa de vidro, em temperatura ambiente. A placa foi agitada com movimentos circulares e examinada contra fundo escuro. A primeira leitura foi realizada aos 30 segundos e a leitura final, aos 60 segundos, para observação do fenômeno da aglutinação, caracterizado por distinta formação de grande agregado de partículas. As amostras positivas foram retestadas com os reagentes monovalentes dentro do grupo, para identificação final do sorotipo. As que reagiram cruzadamente com outros sorotipos foram novamente repicadas e uma colônia isolada foi reutilizada para a prova de coaglutinação. Uma suspensão de *Staphylococcus aureus*, cedidas pelo Laboratório IPEVE, com soro normal de coelho, foi utilizada como controle negativo do teste (Gottschalk et al., 1993b).

### 3.8- Teste de patogenicidade em camundongos

As amostras identificadas como *S. suis* foram testadas quanto à sua patogenicidade em camundongos, por inoculação de 0,2 mL, via intraperitoneal, de uma suspensão bacteriana de, aproximadamente, seis horas de incubação, em caldo "Todd Hewitt Broth", com concentração equivalente ao tubo 10, da Escala de Mc Farland. A concentração do inóculo foi aferida através de contagem bacteriana, em placas de ágar sangue, de 11 amostras, escolhidas aleatoriamente. Para cada amostra, foram inoculados cinco camundongos, e os animais foram

observados durante sete dias, para verificação do aparecimento de sintomas nervosos e mortalidade (Singh et al., 1994; Quesy et al., 1994; Kataoka et al., 1991; Williams et al., 1988; Staats et al., 1998).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De 186 amostras isoladas, 110 foram classificadas como *S. suis* (59,0%), com base na coloração Gram positiva e morfologia de cocos em cadeias curtas ou em pares, alfa hemólise em ágar sangue de carneiro, positividade para amilase e negatividade às provas de acetoina (Voges Proskauer), NaCl a 6,5% e catalase.

Das demais amostras, 56 foram classificadas como *Streptococcus spp* (30,0%) e 20 como *Enterococcus spp* (11,0%), conforme perfil bioquímico proposto por Gottschalk et al. (1993b), Devriese et al. (1991) e Tarradas et al. (1994).

Em relação às 110 amostras de *S. suis*, 51 (46,4%) foram isoladas na região Sul, 52(47,2%) na região Sudeste e as restantes em outras regiões do país (Tab. 1). O grande número de amostras provenientes da região Sul e Sudeste justifica-se por serem regiões onde há maior concentração de suínos criados intensivamente em granjas tecnificadas.

Dentre as amostras de *S. suis* isoladas, 77 (70,0%) foram de materiais provenientes de cérebro, 18 (16,4%) de pulmões, 8 (7,3%) de líquido cefalorraquidiano (LCR), 3 (2,7%) de articulações, 2(1,8%) de sangue, 1(0,9%) de líquido ascítico e 1(0,9%) de miocárdio (Tab. 2).

Tabela 1- Número de amostras de *Streptococcus suis* isoladas de suínos, em quatro regiões do Brasil, no período de 1997-2000

Região	Número de amostras de <i>S. suis</i>	Porcentagem
Sul	51	46,4
Sudeste	52	47,2
Centro- Oeste	06	5,5
Nordeste	01	0,9
Total	110	100

Tabela 2- Sorotipos de *Streptococcus suis* isolados de suínos, por espécime clínico, oriundos das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, no período de 1997-2000.

Espécime	SOROTIPOS														Total	%
	1	½	2	3	5	6	7	8	9	10	11	14	1/14/7	N/S		
Cérebro	1	-	36	1	-	1	2	2	3	1	2	5	15	8	77	70,0
Pulmões	1	1	5	-	1	-	-	-	1	-	1	2	1	5	18	16,4
LCR*	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	4	1	8	7,3
Articulações	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	3	2,7
Liq. Ascítico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	0,9
Miocárdio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	0,9
Sangue	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	2	1,8
Total	2	1	42	1	1	1	3	2	7	1	3	10	21	15	110	100
%	1,8	0,9	38,2	0,9	0,9	0,9	2,7	1,8	6,4	0,9	2,7	9,1	19,1	13,7	100	100

\*LCR: Líquido cefalorraquidiano

N/S: Amostras negativas à prova de coagulação

A maior frequência de isolamento do cérebro e LCR (77,3%) está relacionada ao maior número de amostras (85) desses espécimes, recebidos para diagnóstico laboratorial. Amass et al. (2000) e Torremorel et al., (1998), sugerem o isolamento a partir de cérebro e líquido cefalorraquidiano, pelo fato de tais amostras apresentarem maior patogenicidade e menor índice de contaminação que as amostras isoladas de outros órgãos.

Neste experimento, o sorotipo 2 foi o mais frequente no cérebro (85,7%) mostrando associação entre ele e o órgão de isolamento, fato também constatado por Torremorel et al., 1998. Esse sorotipo tem sido associado a vários achados patológicos, principalmente meningite e pneumonia. Aarestrup et al. (1998) encontraram 53,4% das amostras do sorotipo 2 isoladas de pulmões e 24,2% de cérebro e 46,2% das amostras de cérebro pertenciam ao sorotipo 2. Em estudo

realizado por Perch et al. (1983), as infecções pelo *S. suis* sorotipos 1 a 8 foram associadas à pneumonias (55,0%), septicemias (32,0%), e apenas um número limitado de amostras foi isolado de meningites (2,0%) e endocardites (2,0%).

Neste trabalho, houve uma relação entre o sorotipo 2 e a idade dos animais. Dos materiais trabalhados, 80% foram isoladas de animais na fase de recria (65-90 dias). Os resultados concordam com os primeiros relatos do Brasil (Reis et al., 1980) e diferem dos de Gottschalk (1999) que verificou a presença da doença em animais mais jovens.

Foram observadas reações cruzadas entre os sorotipos 1, 14 e 7 em 21 (19,1%) das amostras isoladas. De acordo com Gottschalk (1999)<sup>1</sup>, reações cruzadas entre os sorotipos 1 e 7 não são comuns, embora sejam freqüentes reações cruzadas entre os sorotipos 1 e 14, sendo considerado como sorotipo 1/14 (Done et al., 1998). O tempo de leitura do teste é um fator que influencia no aparecimento de reações cruzadas. Neste trabalho, a leitura final foi realizada criteriosamente, aos 60 segundos, eliminando-se a possível interferência. De acordo com estes resultados, é possível que tenha havido o isolamento de culturas contaminadas com os sorotipos 1 e 7, ou mesmo o aparecimento de um novo sorotipo 1(+14+7). Gottschalk & Higgins (1990) evidenciaram que alguns sorotipos podem reagir cruzadamente, indicando possuir determinantes antigênicos comuns na cápsula polissacáride. Esses autores encontraram reações cruzadas entre os sorotipos 1 e 2; 6 e 16 e 2 e 22. É possível que o fato tenha também ocorrido neste trabalho.

Neste estudo, 15 amostras (13,7%) não reagiram ao teste de coaglutinação. É importante comentar que as amostras foram testadas apenas contra 16, dos 35 sorotipos existentes. Por outro lado, a perda, por razões desconhecidas, de antígenos capsulares, poderia justificar o aparecimento de amostras não sorotipificadas. Touil et al. (1988), no Canadá e Sala et al. (1996), na Itália, encontraram 24% e 17,8% respectivamente, de amostras não sorotipificadas. Resultados similares foram encontrados por outros autores, que observaram alta percentagem de amostras não sorotipificadas pelos procedimentos atuais (Staats et al., 1997). Rosendal et al. (1986) demonstraram que inconsistências na sorotipificação têm ocorrido, possivelmente devido à diferenças na interpretação, procedimento ou perdas de antígenos tipo-específicos durante o cultivo. Foram encontradas apenas duas amostras auto aglutinantes, resultado que difere dos obtidos por Coronado et al. (1994), que encontrou 37,7% de amostras auto aglutinantes.

Pela prova de coaglutinação, 74 (67,2%) amostras reagiram positivamente com um sorotipo, 21(19,1%) com três sorotipos e em 15 (13,7%) o resultado foi negativo. O sorotipo 2 foi o mais freqüente (38,2 %) dentre as amostras estudadas, seguido pelos sorotipos 14 (9,1%), 9 (6,4%), 7 (2,7%), 11 (2,7%), 8(1,8%), 1(1,8%), ½ (0,9%), 3 (0,9%), 5 (0,9%), 6 (0,9%), e 10 (0,9%) (Tab. 2). A alta freqüência do sorotipo 2, verificada neste trabalho, está portanto, de acordo com os relatos encontrados em outros países.

Resultados similares de sorotipificação foram obtidos por outros autores. Sala et al. (1996), na Itália, encontraram os sorotipos 1, 1/2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 28. O sorotipo 2 foi o mais prevalente (57/163), seguido dos 1(23/163), 9(11/163), ½(9/163), 3(9/163), 7(9/163), 4(7/163), 8(7/163). Um total de 29 amostras não foram sorotipificadas pela técnica de reação capsular. Touil et al. (1988), no Canadá, encontraram 33,0 % das 151 amostras de *S. suis* isoladas pertencentes ao sorotipo 2, seguido pelos sorotipos 3 (12%), 5(10%), 7 (7%), 4(4%), 6(3%), 8 (3%), 1(2%), ½(2%), além de 24% de amostras não sorotipificadas. Na Holanda e na França, o sorotipo 2 foi o mais prevalente, seguido pelo 9, enquanto na Dinamarca, o sorotipo 2 foi seguido pelo 7 (Jacobs et al., 1995). No Canadá, Gottschalk (1999) encontraram o sorotipo 2 como o mais prevalente, representando 35,48% das amostras isoladas, seguido dos sorotipos ½ (20,96%) 3 ( 19,35%), 7( 9,68%), 8(9,68%),4 (4,84%).

Neste trabalho, o sorotipo 14 foi detectado em 9,1% das amostras estudadas. De acordo com a literatura consultada, este sorotipo ainda não foi descrito no Brasil e também não foi identificado em alguns países. No Canadá, a freqüência deste sorotipo é baixa, com 1,0 % das amostras de *S. suis* isoladas.

1 GOTTSCHALK, M. (Comunicação Pessoal). Associate Professor, Facultad de Medicina Veterinaria-Universidad de Montreal, Quebec, Canadá, 1999.

Por outro lado, Mac Lenan et al. (1996), no Reino Unido encontraram 6/24 (25,0%) de amostras classificadas como sorotipo 14. Esses resultados indicam um aumento em importância deste sorotipo, que foi inicialmente isolado de um caso humano (Done et al., 1998). O sorotipo 11 detectado neste trabalho, em 2,7% das amostras estudadas, não foi identificado no Canadá, de acordo com a literatura consultada. O sorotipo 9 encontrado em 6,4% das amostras, foi citado por Jacobs et al. (1995) como o segundo sorotipo mais comum na Holanda e na França. No Brasil, foi relatado com frequência de 0,4% em estudo realizado por Santos et al. (1999) e de 6,8% em trabalho feito por Madureira & Soncini (1999). A Tabela 3 mostra a frequência dos sorotipos de *S. suis* isolados nas quatro regiões estudadas.

Pode-se observar, na região Sudeste, que o sorotipo 2 foi o mais frequente, seguido pelos sorotipos 1/14/7, 9, 1, 1/2, 5, 10 e 11. A maior frequência do sorotipo 2 está de acordo com Santos et al., 1999 que verificou a presença deste sorotipo em 62,7% das amostras estudadas no Estado de Minas Gerais. Por outro lado, os autores não

registraram a presença dos sorotipos 10 e 11, encontrados nesta pesquisa. Além disso, encontraram uma baixa prevalência do sorotipo 9 (0,4%), identificado em 5,8% das amostras estudadas (Tab. 3). Um maior número de amostras não sorotipificadas nessa região, pode ser explicado pela perda de antígenos capsulares, em razão destas terem sido mantidas em temperatura de 2 a 8°C, por um longo período.

Em relação à região Sul, o sorotipo mais frequente foi o 1/14/7, seguido dos sorotipos 2, 14, 9, 7, 8, 11, 3 e 6. Madureira & Soncini (1999) em Santa Catarina encontraram o sorotipo 2 como o mais prevalente, não havendo descrição do sorotipo 14, diferente do encontrado nesta pesquisa. Na região Centro-Oeste, foi constatado a presença dos sorotipos 1/14/7, 1, 2, 9 e 14 e na região Nordeste, embora apenas uma amostra tenha sido isolada, observou-se, na granja estudada, a presença do sorotipo 2.

Os resultados da prova de patogenicidade em camundongos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 3- Frequência de sorotipos de *Streptococcus suis* isolados em quatro regiões do Brasil, 1997-2000.

Sorotipo	Sudeste		Sul		Centro-Oeste		Nordeste		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	1	1,9	-	-	1	16,7	-	-	2	1,8
1/2	1	1,9	-	-	-	-	-	-	1	0,9
2	31	59,6	9	17,6	1	16,7	1	100	42	38,2
3	-	-	1	2,0	-	-	-	-	1	0,9
5	1	1,9	-	-	-	-	-	-	1	0,9
6	-	-	1	2,0	-	-	-	-	1	0,9
7	-	-	3	5,9	-	-	-	-	3	2,7
8	-	-	2	3,9	-	-	-	-	2	1,8
9	3	5,8	3	5,9	1	16,7	-	-	7	6,4
10	1	1,9	-	-	-	-	-	-	1	0,9
11	1	1,9	2	3,9	-	-	-	-	3	2,7
14	-	-	9	17,6	1	16,7	-	-	10	9,1
1/14/7	4	7,7	15	29,4	2	33,2	-	-	21	19,1
N/S*	9	17,3	6	11,7	-	-	-	-	15	13,7
Total	52	100	51	100	6	100	1	100	110	100

\* N/S= Amostras negativas à prova de coagulação

Tabela 4- Patogenicidade em camundongos dos sorotipos de *S. suis* isolados em espécimes clínicos de suínos das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, no período de 1997 – 2000.

Sorotipos isolados	Patogênicos	Não patogênicos	Total testado
1	1	-	1
2	18	21	39
3	1	-	1
5	1	-	1
6	-	1	1
7	-	3	3
8	1	1	2
9	4	3	7
10	-	1	1
11	-	3	3
14	5	5	10
1/14/7	7	14	21
NS*	6	9	15
TOTAL	44	61	105

\* NS: Não sorotificada

Do total das 110 amostras isoladas, foram trabalhadas 105 em razão de cinco amostras terem se perdido entre o isolamento e a execução da prova. Destas, 44 foram patogênicas para camundongos. Os sorotipos mais freqüentemente encontrados, 2 e 1/14/7, apresentaram patogenicidade, respectivamente, de 46,2% e 33,3%. As 15 amostras não sorotificadas apresentaram patogenicidade de 40,0%.

Das 18 amostras patogênicas de sorotipo 2, 17 (94,4%) foram isoladas do cérebro (Tab.2), mostrando tendência a maior patogenicidade das amostras isoladas deste órgão.

O elevado número de amostras não patogênicas sugere que algumas possam ter perdido fatores de virulência, em consequência de sua manutenção, entre 2 e 8°C, durante um período de três anos, entre o isolamento e a avaliação da patogenicidade. Os resultados concordam com Staats et al. (1998), que explicam a diferença de virulência entre amostras, com base na idade delas. Nesse trabalho, a virulência das amostras para camundongos e suínos foi baseada na data da coleta

durante o estudo, podendo explicar as diferenças entre elas, e os resultados também indicam que a virulência em suínos pode estar associada a possíveis mudanças resultantes de estocagem e subcultivos contínuos, diferente do observado por outros autores, que não têm considerado essas informações no estudo da virulência do *S. suis*.

A grande maioria dos estudos de patogenicidade em camundongos foi feito com o sorotipo 2, em função de ser o mais freqüentemente isolado no mundo. Trabalho realizado por Singh et al. (1992), na Índia, mostrou que camundongos inoculados com o sorotipo 4 desenvolveram sintomas nervosos. Esses achados concordam com os resultados encontrados neste trabalho, que demonstraram a patogenicidade de outros sorotipos para camundongos. Foram observados também a presença de sintomas nervosos e morte súbita nos animais inoculados, com as 44 amostras pertencentes aos sorotipos 1, 2, 3, 5, 8, 9, 14; naquelas que tiveram reações cruzadas e nas que foram negativas a prova de coaglutinação (Fig. 1).



Figura 1- Camundongos apresentando andar em círculos e opistótono, após inoculação por *S. suis*.

Staats et al. (1998) relataram que a virulência em camundongos é dose dependente. Neste trabalho, os inóculos foram padronizados, minimizando assim os efeitos da dose dependência sobre a virulência. Em estudos realizados por Vecht et al. (1996), admite-se que as oscilações na patogenicidade entre as amostras de *S. suis* sorotipo 2 possa ser explicada pelas diferenças genéticas ou na resposta imune. A variação da resposta ao desafio em camundongos é compensada por estudos em grupo, como os realizados neste trabalho. As diferenças genéticas são baseadas na análise das amostras com relação a presença do MRP, EF, hemolisinas e outros fatores que podem estar ligados à virulência do agente. Em estudo realizado por Williams et al. (1988), amostras de *S. suis* patogênicas e apatogênicas para suínos foram inoculadas em camundongos, mostrando que as amostras virulentas e avirulentas foram patogênicas e as taxas de mortalidade variaram entre 33 a 66% em ambos os grupos.

Vecht et al. (1996), em trabalho realizado na Holanda, relataram que o modelo em

camundongos não é compatível com o modelo em suínos, para o estudo das infecções pelo *S. suis*. Nesse trabalho, um total de 13 amostras de *S. suis* foram estudadas, e não houve correlação significativa da virulência entre suínos e camundongos. Em trabalho realizado por Staats et al. (1998), também não houve correlação significativa da virulência entre suínos e camundongos, entretanto das 19 amostras testadas, quatro das sete altamente virulentas para suínos, foram também altamente virulentas para camundongos e discorda dos resultados de Kataoka et al. (1991) e Drolet et al. (1992), que demonstraram ser a condição de doença em camundongos assemelhada à observada em suínos. Quessy et al. (1994) mostraram que resultados de infecções experimentais no hospedeiro natural confirmam a utilização de modelos em camundongos para o estudo das infecções pelo *S. suis* sorotipo 2. Assim, estas pesquisas sugerem a necessidade de mais estudos da patogenicidade do *S. suis*, quando se utilizam camundongos como modelo.

## 5 CONCLUSÕES

- A sorotipificação, realizada pela técnica de coaglutinação, das 110 amostras de *S. suis* isoladas, confirma a existência dos sorotipos 1, 1/2, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 14, sendo o sorotipo 2 o mais freqüente.
- Embora a amostragem não tenha sido estatisticamente estudada, as amostras mais patogênicas para camundongos foram as isoladas de cérebro.
- As amostras recentemente isoladas foram as mais patogênicas para camundongos.
- O encontro dos sorotipos 10 e 14, não citado na literatura brasileira revista, indica a necessidade de amplas pesquisas visando ao melhor mapeamento dos sorotipos de *S. suis*.
- Recomendam-se estudos complementares sobre os fatores de virulência destas amostras de *S. suis*, visando à seleção para produção de vacinas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M., JORSAL, S. E., JENSEN, N. E. Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *S. suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Vet. Microbiol.*, v.60, n.1, p.59-66, 1998.
- AMASS, S. *Streptococcus suis*. What's New? In: ANUAL MEETING, 31, 2000, Indiana. *Proceedings...* Indiana: [scientific committee], 2000. p.315-317.
- BLOUIN, C., HIGGINS, R., GOTTSCHALK, M., SIMARD, J. Evaluation of the antibody response in pigs vaccinated against *S. suis* capsular type 2 using a double antibody sandwich enzyme - linked immunosorbent assay. *Can. J. Vet. Res.*, v.58, p.49-54, 1994.
- BUSQUE, P., HIGGINS, R., CAYA, F., QUESSY, S. Immunization of pigs against *S. suis* serotype 2 infection using a live avirulent strain. *Can. J. Vet. Res.*, v.61, n.4, p.275-279, 1997.
- CHARLAND, N., KOBISCH, M., MARTINEAU-DOIZÉ, B. et al. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *S. suis* capsular type 2. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 14, 1996, Bologna. *Proceedings...* Bologna: Point, 1996. p.297.
- CLARK, L. K., HILL, M. A., KNIFFEN, T. S. et al. An evaluation of components of medicated early weaning. *Swine Health Prod.*, v.2, n.3, p.5-11, 1994.
- CLIFTON-HADLEY, F. A. Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. *Vet. Res. Comm.*, v.8, n.3, p.217-227, 1984.
- CLIFTON-HADLEY, F. A., ENRIGHT, M. R., ALEXANDER, T. J. L. Survival of *S. suis* type 2 in pig carcasses. *Vet. Rec.*, v.118, p.275, 1986.
- CORONADO, N., RIANO, S., MOGOLLON, J. D. et al. Characterization antimicrobial susceptibility pattern and plasmid profile of *S. suis* strains. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 13, 1994, Bangkok. *Proceedings...* Bangkok: Prachak Poomvisses & Pringssri Ingkaninun, 1994, p.138.
- DEVRIESE, L. A., HOMMEZ, J., HAESBROUCK, F. M. et al. A simplified identification method for *S. suis* and characteristics of an unusual ecovar isolated from the genital tract of swine. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 11, 1990, Lausanne. *Proceedings...* Lausanne: Copyright, 1990. p.166.

- DEVRIESE, L. A., CEYSSSENS, K., HOMMEZ, J. et al. Characteristics of different *S. suis* ecovars and description of a simplified identification method. *Vet. Microbiol.*, v.26, n.1/2, p.141-150, 1991.
- DONE, S. H., HIGGINS, R. J., EVANS, R. Tracheitis with mucosal gland necrosis associated with *S. suis* type 14 and swine influenza H1N1 virus infection. *Pig J.*, v.41, p.121-126, 1998.
- DROLET, R., BEAUDOIN, M., HIGGINS, R. Pathological findings in mice experimentally infected with *S. suis* capsular type 2. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 12, 1992, Netherlands. *Proceedings...* Netherlands: [scientific committee], 1992 (P.I) p.338.
- FEDER, I., CHENGAPPA, M. M., FENWICK, B. et al. Partial characterization of *S. suis* type 2 hemolysin. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, n.5, p.1256-1260, 1994.
- GALINA, L., VECHT, U., WISSELINK, H. J., PIJOAN, C. Prevalence of various phenotypes of *S. suis* isolated from swine in USA based on the presence of MRP and EF. *Can. J. Vet. Res.*, v.60, n.1, p. 72-74, 1996.
- GOGOLEWSKI, R. P., COOK, R. W., O'CONNEL, C. J. *Streptococcus suis* serotypes associated with disease in weaned pigs. *Austr. Vet. J.*, v.67, n.6, p. 202-204, 1990.
- GOTTSCHALK, M., HIGGINS, R. An update on *S. suis*. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 11, 1990, Lausanne. *Proceedings...* Lausanne: [scientific committee], 1990. p.169.
- GOTTSCHALK, M., HIGGINS, R., JAQUES, M. et al. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.*, v.29, n.11, p.2590-2594, 1991.
- GOTTSCHALK, M., HIGGINS, R., JAQUES, M. Production of capsular material by *Streptococcus suis* serotype 2 under different growth conditions. *Can. J. Vet. Res.*, v.57, n.1, p.49-52, 1993a.
- GOTTSCHALK, M., HIGGINS, R., BOURDREAU, M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, n.8, p.2192-2194, 1993b.
- GOTTSCHALK, M., LACOUTURE, S., DUBREUIL, J. D. Characterization of *S. suis* capsular type 2 hemolysin. *Microbiol.* v.141, p.189-195, 1995.
- GOTTSCHALK, M. Production of virulence - related proteins by Canadian strains of *S. suis* capsular type 2. *Can. J. Vet. Res.*, v.62, p.75-79, 1998.
- GOTTSCHALK, M. Avances recientes en el diagnostico, tipificacion y control de *Streptococcus suis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: SIMPÓSIO SOBRE MENINGITE ESTREPTOCOCCICA SUÍNA E PLEUROPNEUMONIA SUÍNA, 1999, Lages. *Anais...* Lages: Embrapa, CNPSA, 1999. p. 24-27.
- HALBUR, P.G. PRRSV and *S. suis* type 2 coinfection of nursery pigs. In: ANNUAL MEETING, 31, 2000, Indiana. *Proceedings...* Indiana: [Scientific comitee], 2000. p.319.
- HAMPSON, D. J., TROTT, D. J., CLARKE, I. L. et al. Population structure of Australian isolates of *S. suis*. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, n.11, p.2895-2900, 1993.
- HEATH, P. J., HUNT, B. W., DUFF, J. P. et al. *S. suis* serotype 14 as a cause of pig disease in the UK. *Vet Rec*, v.139, p.450-451, 1996.

- HOGG, A., ROGERS, D. G. *S. suis*: Efficacy study of a new bacterin adjuvanted with a unique oil in water adjuvant. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 13, 1994, Bangkok. Proceedings... Bangkok: Prachak Poomvisses & Pringssri Ingkaninun, 1994. p. 143.
- HOLT, M. E., ENRIGHT, M. R.; ALEXANDER, T. J. L. Immunisation of pigs with live cultures of *Streptococcus suis* type 2. Res. Vet. Sci., v.45, n.3, p.349-352, 1988.
- HOLT, M. E., ENRIGHT, M. R., ALEXANDER, T. J. L. Studies of the protective effect of different fractions of sera from pigs immune to *Streptococcus suis* type 2. Infec. J. Comp. Pathol., v.100, p.435-442, 1989.
- HOLT, M. E., ENRIGHT, M. R., ALEXANDER, T. J. L. Immunisation of pigs with killed cultures of *Streptococcus suis* type 2. Res. Vet. Sci., v.48, n.1, p.23-27, 1990.
- HOMMEZ, J., DEVRIESE, L. A., HENRICHSEN, J., CASTRYCK, F. Identification and characterization of *Streptococcus suis*. Vet. Microbiol., v.11, n.4, p.349-355, 1986.
- JACOBS, A. A. C., VAN DEN BERG, A. J. G., LOEFFEN, P. L. W. Protection of experimentally infected pigs by suliyisin, the thiol-activated haemolysin of *S. suis*. Vet. Rec., v.139, N.1, p.225-228, 1996.
- JACOBS, S. S. C., VAN DEN BERG, A. J. G., BAARS, J. C. et al.. Production of suliyisin, the thiol-activated haemolysin of *S. suis* by field isolates from diseased pigs. Vet. Rec., v.137, N.12, p.295-296, 1995.
- KATAOKA, Y., HARITANI, M., MORI, M. et al.. Experimental infections of mice and pigs with *S. suis* type 2. J. Vet. Med. Sci., v. 53, n.6, p.1043-1049, 1991.
- LUQUE, I., TARRADAS, C., ARENAS, A. et al. *S. suis* serotypes associated with different disease conditions in pigs. Vet. Rec., v.142, N.26, p.726-727, 1998.
- MAC LENNAN, M., FOSTER, G., DICK, K. et al. *Streptococcus suis* serotypes 7, 8 and 14 from diseased pigs in Scotland. Vet. Rec., v. 139, N.17, p.423-424, 1996.
- MADUREIRA, S. J., SONCINI, R. Meningite estreptocócica, experiência da agroindústria. In: SIMPÓSIO SOBRE MENINGITE ESTREPTOCÓCCICA SUÍNA E PLEUROPNEUMONIA SUÍNA, 1999, Lages. Anais...Lages: Embrapa, CNPSA, 1999. Lages: p. 24-27.
- MOGOLLON, J. D., PIJOAN, C., MURTAUGH, M. P. et al. Characterization of prototype and clinically defined strains of *S. suis* by genomic fingerprinting. J. Clin. Microbiol., v.28, n.11, p.2462- 2466, 1990.
- MOGOLLON, J. D., PIJOAN, C., MURTAUGH, M. P. et al. Identification of epidemic strains of *S. suis* by genomic fingerprinting. J. Clin. Microbiol., v. 29, n. 4, p. 782-787, 1991.
- MOOR, D. E. Septicaemic infection in pigs caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R. S and T. Antonie van Leeuwenhoek, v. 29, p.272, 1963.
- MOREAU, A., HIGGINS, R., BIGRAS-POULIN, M., NADEAU, M. Rapid detection of *S. suis* serotype 2 in weaned pigs. Am. J. Vet. Res., v.50, n.10, p.1667-1671, 1989.
- PERCH, B., PEDERSEN, K. B., HENRICHSEN, J. Serology of capsulated Streptococci pathogenic for pigs: Six new serotypes of *S. suis*. J. Clin. Microbiol, v.17, p.993-996, 1983.

- QUESSY, S., DUBREUIL, J. D., HIGGINS, R. Vaccination of mice against *S. suis* serotype 2 infections using an avirulent strains. *Can. J. Vet. Res.*, v.58, n.4, p.299-301, 1994.
- REAMS, R. Y., HARRINGTON, D. D., GLICKMAN, L. T. et al. Fibrinohaemorrhagic pneumonia in pigs naturally infected with *S. suis*. *J. Vet. Diag. Inv.*, v.7, p.406-408, 1995.
- REAMS, R. Y., HARRINGTON, D. D., GLICKMAN, L. T. et al. Multiples serotypes and strains of *S. suis* in naturally infected swine herds. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.8, n.1, p.119-121, 1996.
- REIS, R., COELHO, A. M. B., NASCIMENTO, E. F., LEITE, R. C. Doenças do suíno no Estado de Minas Gerais. Meningoencefalite Estreptocócica em leitões desmamados. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v.32, n.3, p.325-381, 1980.
- ROSENDAL, S., BRETON, J., HENRICHSEN, J. et al. Isolation of *S. suis* using a selective medium. *Can. J. Vet. Res.*, v.50, n.4, p.537-539, 1986.
- SALA, V., ANTONINI, M., VISCHI, O. et al. Distribution of capsular types and hemolysin production of *Streptococcus suis* isolates in northern Italy. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 14, Bologna, 1996. *Proceedings...* Bologna: Point, 1996. p.307.
- SANFORD, S. E., HIGGINS, R. Streptococcal diseases. In: LEMAN, A. D., STRAW, B. E., MENGELING, W. L. et al. (Eds.) *Diseases of swine*, 7.ed., Ames: Iowa State University, 1992. p.585-590.
- SANTOS, J. L., DEL ARCO, A. E., RIBEIRO, M. C. E. et al. Distribuição de sorotipos de *S. suis* em suínos clinicamente doentes no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9, 1999, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, Abraves, 1999. p.239-240.
- SIMONSON, R. R., CARLSON, M. M., ABRAHAM, A. *Streptococcus suis* immunology: Stimulation of immunity using a commercial bacterin (Strep Bac™) In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 11, 1990, Lausanne. *Proceedings...* [scientific committee], Lausanne: Copyright, 1990. p.1174.
- SINGH, D. P., CHATURVEDI, V. K., GUPTA, R. N. Prevalence of *S. suis* in Pigs in India. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 13, 1994, Bangkok. *Proceedings...* Bangkok, ... Prachak Poomvisses & Pringsssri Ingkaninun, 1994. p. 207.
- SMITH, H. E. Virulent strains of *S. suis* serotype 2 and highly virulent strains of *S. suis* serotype 1 can be recognized by a unique ribotype profile. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, n.5, p.1049-1053, 1997.
- STAATS, J. J., FEDER, I., OKWUMABUA, O., CHENGAPPA, M. M. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet. Res. Com.*, v.21, n.6, p.381-407, 1997.
- STAATS, J. J., PLATTNER, B. L., NIETFELD, J. et al. Use of ribotyping and hemolysin activity to identify highly virulent *S. suis* type 2 isolates. *J. Clin. Microbiol.*, v.36, n.1, p.15-19, 1998.
- TARRADAS, C., ARENAS, A., MALDONATO, A. et al. Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine: proposal for biochemical parameters. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, n.2, p.578-580, 1994.

- TORREMORELL, M., PIJOAN, C. Intraperitoneal vaccination against *Streptococcus suis* serotype 2, with an autogenous vaccine. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 14, Bologna, 1996. Proceedings... Bologna: Point , 1996. p.304.
- TORREMORELL, M., CALSAMIGLIA, M., PIJOAN, C. Colonization of suckling pigs by *S.suis* with particular reference to pathogenic serotype 2 strains. Can. J. Vet. Res., v.62, p.21-26, 1998.
- TOUIL, F., HIGGINS, R., NADEAU, M. Isolation of *S. suis* from diseased pigs in Canada. Vet. Microbiol., v.17, n.2, p.171-177, 1988.
- VECHT, U., SMITH, H. E., WISSELINK, H. J. et al. *Streptococcus suis* mutants in which the genes encoding muramidase-released protein (MRP) and extracellular protein factor (EF) are inactivated or virulent for pigs. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 14, Bologna, 1996. Proceedings... Bologna: Point , 1996. p.302.
- VECHT, U., TETENBURG, B. J., WISSELINK, H. J. et al. Incompatibility between experimental murine and pig models of *Streptococcus suis* type 2 infection. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 14, Bologna, 1996. Proceedings... Bologna: Point , 1996. p.303.
- VECHT, U., VAN LEENGOED, L. A .M. G., VERHEIJEN, E. R. M. *S. suis* infections in pigs in the Netherlands (Part I). Vet. Q., v.7, n.4, 1985.
- VECHT, U., WISSELINK, H. J., ANAKOTTA, J., SMITH, H. E. Discrimination between virulent and non virulent *S. suis* type 2 strains by enzyme linked immunosorbent assay. Vet. Microbiol., v.34, n.1, p.71-82, 1993.
- VECHT, U., WISSELINK, H. J., JELLEMA, M. L., SMITH, H. E. Identification of two proteins associated with virulence of *S. suis* type 2. Inf. Immunol., v.59, p.3156-3162, 1991.
- VECHT, U., WISSELINK, H. J. REEK, F. H. et al. Diagnosis of several capsular serotypes of *S. suis* by phenotype and PCR and the relation with virulence for pigs. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 14, Bologna, 1996. Proceedings... Bologna: Point , 1996. p.298.
- WILLIAMS, A. E., BLAKEMORE, W. F., ALEXANDER, T. J. L. A murine model of *Streptococcus suis* type 2 meningitis in pigs. Res. Vet. Sci., v.45, n.3, p.394-399, 1988.