

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *STREPTOCOCCUS EQUI*
SUBESPÉCIE *EQUI* EM EQUINOS DIAGNOSTICADOS
COM ADENITE EQUINA NA REGIÃO DA
ZONA DA MATA DE MINAS GERAIS**

Pedro Pires da Cunha Lima¹, Raffaella Bertoni Cavalcanti
Teixeira², Lucas Fernando dos Santos³

Resumo: A Adenite Equina é uma das enfermidades contagiosas mais prevalentes no mundo equestre. A enfermidade é causada pela bactéria *Streptococcus equi* subespécie *equi* (*S. equi*) e devido a sua alta morbidade traz grandes perdas econômicas aos rebanhos equinos. Nos últimos anos, propriedades na região da zona da mata de Minas Gerais apresentaram surtos frequentes de garrotilho. Existe diversidade genética entre amostras de *S. equi* em diversos países, porém, até o momento, nenhuma informação sobre a diversidade genética desse agente na Zona da Mata de Minas Gerais foi relatada. O presente trabalho tem por finalidade identificar os sorotipos de *S. equi* presentes nas propriedades da Zona da Mata de Minas Gerais e avaliar a diversidade genética das amostras de *S. equi* das diferentes propriedades através do uso de técnicas de biologia molecular.

Palavras-chave: Garrotilho, *SeM*, cavalos

Introdução

A Adenite Equina, conhecida popularmente por Garrotilho, é uma das enfermidades contagiosas mais prevalentes no meio equestre. A enfermidade é causada pela bactéria *Streptococcus equi* subespécie *equi* (*S. equi*) e devido a sua alta morbidade traz grandes perdas econômicas aos rebanhos equinos (Sweeney, 2005).

¹ Graduando em Medicina - FAVIÇOSA/UNIVIÇOSA. E-mail: pedro280596@gmail.com

² Professora da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. E-mail: teixeiraraffa@gmail.com

³ Microvet Microbiologia Especial Ltda. e-mail: lucas@microvet.com.br

Os equinos jovens são os mais susceptíveis ao Garrotilho e surtos são frequentes em propriedades equestres. O impacto causado por essa enfermidade está ligado ao alto gasto com medicamentos, veterinários e até mesmo a perda de animais de alto valor genético (Sweeney, 2005). Os métodos de prevenção da doença constituem em vacinação de potros acima de seis meses e animais adultos, quarentena de animais novos, isolamento de animais doentes e identificação de portadores assintomáticos em plantéis (Sweeney, 2005).

Nos últimos anos, propriedades na região da zona da mata de Minas Gerais apresentaram surtos frequentes de garrotilho. Esses surtos podem estar ligados a diferentes fatores tais como: susceptibilidade dos animais, falha vacinal, a proximidade entre as propriedades, a comercialização de animais entre essas propriedades ou entre propriedades diferentes e até mesmo o compartilhamento de veterinários e funcionários entre as propriedades.

Diversos trabalhos identificaram diversidade genética entre amostras de *S. equi* bem como a presença de mais de um sorotipo de *S. equi* em diversos países (Kelly and others 2006; Wallerand Jolley 2007; Patty and Cursons 2014, Ivens and others 2011). Porém, até o momento, nenhuma informação sobre a diversidade genética desse agente na Zona da Mata de Minas Gerais foi relatada. O presente trabalho tem por finalidade identificar a presença de *S. equi* nas propriedades da Zona da Mata de Minas Gerais e avaliar a diversidade genética das amostras de *S. equi* das diferentes propriedades através do uso de técnicas de biologia molecular.

Material e Métodos

Foram isoladas 11 amostras de *Streptococcus equi sub. equi*, de oito propriedades no estado de Minas Gerais, entre os anos de 2009 e 2017 (duas amostras da propriedade A, duas amostras da propriedade B, duas amostras da propriedade C e as demais propriedades com apenas uma amostra cada). Essas

amostras foram previamente isoladas e tipificadas pelo setor de diagnóstico do laboratório Microvet. Para extração do DNA, cada isolado foi cultivado em 5 mL de meio BHI a 37°C por 24 horas. Em seguida o DNA foi extraído utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de polimerase em cadeia (PCR) para amplificação do Gene *SeM* foi realizada segundo essas condições: 95°C a 30 segundos para etapa de desnaturação, seguido por 30 ciclos de 95°C a um minuto, 55°C por 30 segundos, 72°C por um minuto, seguido por um período de extensão de 72°C durante 10 minutos utilizando os primers ASW73 (5'-CAGAAAATAAGTGCCGGTG) e ASW74 (5'-ATTTCGTAAGAGCTTGACGC). Os produtos do PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo e visualizados por meio de luz UV e fotografados em sistema de fotodocumentação. O produto de PCR amplificado foi purificado e enviado para sequenciamento. As sequências foram alinhadas e analisadas utilizando-se o Programa MEGA 7 (Mega Software).

Resultados e Discussão

As 11 amostras testadas tiveram seu DNA extraído, amplificado e sequenciado para o gene *SeM*. Um total de 524 nucleotídeos foram obtidos no sequenciamento para cada isolado. Realizando a análise comparativa entre essas sequências observamos que na propriedade A ocorreu diferença genética entre as duas amostras diferindo, elas em três nucleotídeos. Na propriedade B não houve diferença entre as amostras. Na propriedade C entre as duas amostras analisadas ocorreram diferença em apenas um nucleotídeo. As demais amostras (D, E, F, G e H) tiveram diferenças genotípicas entre elas.

Não foi possível encontrar amostras geneticamente idênticas nesse estudo, o que sugere a diversidade genética desse agente na zona da mata de Minas Gerais. Não se conhece ainda a causa

desta diversidade genética, porém pode estar associada ao uso indiscriminado de antibióticos, uma vez que as amostras foram isoladas em períodos e propriedades diferentes.

O efetivo controle da doença requer o desenvolvimento de vacinas mais eficientes que as disponíveis. Embora a proteína *SeM* seja o principal antígeno estudado, outras proteínas estão sendo avaliadas para uso na produção de imunógenos (MARTINS, 2008, p.32).

Esse foi o primeiro estudo da diversidade genética de *S.equi* na zona da mata de Minas Gerais. Novos estudos devem ser realizados no intuito de se elucidar a relação entre esses isolados e o motivo dessa variação genética.

Considerações Finais

Existe diversidade genética de *S.equi equi* na região da zona da mata de Minas Gerais. Essa diversidade é observada dentro da mesma propriedade e entre propriedades diferentes. Novos estudos devem ser realizados para melhor investigar a diversidade deste microrganismo.

Agradecimentos

A minha orientadora, Raffaella Berton Cavalcanti Teixeira, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho e a empresa MICROVET e meu co-orientador Lucas dos Santos pela disponibilidade e interesse em ajudar na pesquisa deste trabalho.

Referências Bibliográficas

IVENS P.A; MATTHEWS D; WEBB K; NEWTON J. R; STEWARD K; WALLER A.S; ROBINSON C; SLATER J.D; Molecular characterisation of 'strangles' outbreaks in the UK: the use of M-protein typing of *Streptococcus equi* ssp. *equi*. Equine Veterinarian Journal, v. 43, p. 359–364, 2011.

KELLY C; BUGG M; ROBINSON C; MITCHELL Z; DAVIS-POYNTER N; NEWTON J.; JOLLEY K.A; Maiden M.C, WALLER A.S. **Sequence variation of the *SeM* gene of *Streptococcus equi* allows discrimination of the source of strangles outbreaks.** J Clin Microbiol. 2006 Feb; 44(2):480-6.

PATTY OA, Cursons RT. The molecular identification of *Streptococcus equi* subsp. *equi* strains isolated within New Zealand. *N Z Vet J.* 2014 Mar; 62(2):63-7.

SWEENEY C.R; TIMONEY J.F, Newton R, Hines MT: *Streptococcus equi* infections in horses: Guidelines for treatment, control and prevention of strangles. *J Vet Intern Med* 19:123-124, 2005.

WALLER A.S, JOLLEY KA. GETTING a grip on strangles: recent progress towards improved diagnostics and vaccines. *Vet J.* May; 173(3):492-501, 2007

MORAES, C. M. Produção e avaliação de proteína SeM recombinante para o controle de Adenite Equina. 2008. 79 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Aprovação do comitê de ética, numero de protocolo 019\2017-I