

CARLOS EMILIO CABRERA MATAJIRA

**Identificação de estirpes do gênero *Streptococcus* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e espectrometria de massa MALDI-TOF**

São Paulo

2015

CARLOS EMILIO CABRERA MATAJIRA

**Identificação de estirpes do gênero *Streptococcus* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e espectrometria de massa MALDI-TOF**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

**Departamento:**

Medicina Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses


**Orientador:**

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

  
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
E ZOOTECNIA DA USP  
1617/15

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo)

T.3181  
FMVZ

Cabrera Matajira, Carlos Emilio  
Identificação de estirpes do gênero *Streptococcus* pela técnica de reação em cadeia da  
polimerase (PCR) e espectrometria de massa MALDI-TOF / Carlos Emilio Cabrera Matajira. --  
2015.  
54 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia. Departamento Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. Sequenciamento. 2. *Streptococcus suis*. 3. PCR. 4. MALDI-TOF MS. I. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Análise fenotípica e genotípica de amostras de *Streptococcus suis* isoladas suínos no Brasil”, protocolado sob o nº 3102/2013, utilizando 150 (cento e cinquenta) suínos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Fernando Ferreira, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research “Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus suis* strains from swine in Brazil”, protocol number 3102/2013, utilizing 150 (one hundred fifty) swine, under the responsibility Prof. Dr. Fernando Ferreira, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CABRERA MATAJIRA, Carlos Emilio

Título: **Identificação de estirpes do gênero *Streptococcus* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e espectrometria de massa MALDI-TOF**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: 19 / 08 / 2015

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Veresinha Knöbl

Instituição: FMVZ-USP Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. FRANCO FERRARO CALDERARO

Instituição: UNG Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. ANDREA MICKÉ MORENO

Instituição: FMVZ-USP Julgamento: Aprovado

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e a virgem por todas as bênçãos durante toda minha vida.

Aos meus pais Maria Teresa Matajira e Hermes Cabrera, pela dedicação e luta para que eu alcançasse meu sonho de ser Médico Veterinário, além disso, continuar obtendo triunfos dia a dia.

À Prof. Dra. Andrea Micke Moreno, pela confiança e dedicação com minhas atividades, pela sua orientação como excelente professora e pessoa. Pelo acolhimento quando iniciei meus estudos neste belo país, e por todo conhecimento que compartilhou comigo.

A todos os amigos e colegas que fiz no Laboratório de Sanidade Suína e Virologia: Luisa Moreno, Ketrin da Silva, Vasco Túlio de Moura Gomes, Bárbara Letícia Costa, Maria Roberta Felizardo, Givago Faria, Pedro Filsner, Maria Gabriela de Oliveira, Mirela Vilela, Renan Mesquita, Nicholas Lotto, Thais Ferreira, Fabiana Miraglia, Ana Paula Santos da Silva, Rosi Andrade, Jucelia Pereira, Alexandre Sanches. Agradeço pela ajuda contínua.

A Maria Inês Z. Sato e Ana Paula Guarnieri Christ encarregadas do laboratório de Biologia Molecular - ELP CETESB - Cia. Ambiental do Estado de São Paulo, pela colaboração e oportunidade de trabalhar com o MALDI-TOF.

À CAPES, pela bolsa que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal.

Aos meus amigos Jason Ardila, Nicolas Cardenas, Sebastian Muñoz, Claudia Carranza, Pamela Juarez, Luis Luna, Carlos Sacristan, Yeison Caicedo.

Aos integrantes da minha família pelo contínuo apoio e carinho, Julio Cesar Cabrera, Sonia Orduz, Diego Julian Cabrera, Diana Sandoval, Marta Oviedo, Blanca, Cristina, Hercilia, Diego, Sebastian Cabrera, Luisa, Modesto, Frank, Lorena, Inocencia, Maritza, Anderson, Consuelo, Rosario Matajira Lizeth, Paola, Miller Hernandez.

Aos meus amigos que estão na Colômbia, Cesar Delgado, Fredy Ochoa, Fredy Sandoval, jhon Arenales, Alirio Arenales, Juana Rodriguez, Katerine Rodriguez, Diego Correa, Carlos Guecha, Edwin Rodriguez, Sergio Ayala, Ferney Manrique, Jose Luis Rincon, Manuel Santos, Pedro Salazar, Luis Jaimes e Yeni Joya pelo apoio e confiança.

## RESUMO

CABRERA MATAJIRA, C. E. **Identificação de estirpes do gênero *Streptococcus* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e espectrometria de massa MALDI-TOF.** [Identification of strains from *Streptococcus* genus by polymerase chain reaction (PCR) and MALDI-TOF mass spectrometry MALDI-TOF]. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Métodos microbiológicos tradicionais como isolamento, coloração de Gram e testes bioquímicos auxiliam na identificação do gênero *Streptococcus*, no entanto, as espécies apresentam ampla variação fenotípica, tornando difícil a identificação ou diferenciação das mesmas apenas por estes métodos. Uma das espécies mais importantes em suínos, *Streptococcus suis*, tem provocado grandes prejuízos em todo o mundo e tem sido descrito como uma importante zoonose em alguns países. *S. suis* está presente nas vias respiratórias superiores, colonizando principalmente tonsilas, cavidades oral e nasal facilitando a alta disseminação por contato direto, principalmente em leitões entre 4 e 12 semanas de vida. Os quadros clínicos mais frequentes em suínos infectados pelo *S. suis* são meningite, artrite e pneumonia. O objetivo do presente estudo foi identificar estirpes do gênero *Streptococcus* mediante as técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR), sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e espectrometria de massa MALDI-TOF (MALDI-TOF MS). As análises por PCR e por MALDI-TOF MS resultaram na identificação de 215 estirpes como *S. suis* e 35 como diferentes espécies pertencentes ao gênero *Streptococcus*. Os resultados da identificação das 35 estirpes pertencentes a outras espécies do gênero *Streptococcus* pelo MALDI-TOF MS foram confirmados pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, sendo que as duas técnicas apresentaram 100% de concordância. Os resultados obtidos indicam grande eficácia na utilização das técnicas avaliadas para a identificação de *S. suis* e de outras espécies do gênero *Streptococcus*. A técnica de MALDI-TOF MS, apesar do custo elevado do equipamento, apresentou a vantagem de ser rápida, apresentar baixo custo por análise e reduzida utilização de material.

Palavras-chave: Sequenciamento. *Streptococcus suis*. PCR. MALDI-TOF MS.

## ABSTRACT

CABRERA MATAJIRA, C. E. **Identification of strains from *Streptococcus* genus by polymerase chain reaction (PCR) and MALDI-TOF mass spectrometry.** [Identificação de estirpes do gênero *Streptococcus* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e espectrometria de massa MALDI-TOF]. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Traditional microbiological methods such as isolation, Gram staining and biochemical tests help to identify the *Streptococcus* genus, however, the species present broad phenotypic variation, making it difficult for their identification or even differentiation just by these methods. One of the most important species in swine, *Streptococcus suis*, has led to great losses worldwide and has been described as an important zoonosis in some countries. *S. suis* is present in the upper airways, especially colonizing tonsils, oral and nasal cavities facilitating the high dissemination by direct contact, especially among piglets between 4 to 12 weeks of age. The most common clinical manifestations in pigs infected by *S. suis* are meningitis, arthritis and pneumonia. The aim of this study was to identify *Streptococcus* strains by polymerase chain reaction (PCR), 16S rRNA gene partial sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry (MALDI-TOF MS). PCR and MALDI-TOF MS analysis resulted in the identification of 215 strains as *S. suis* and 35 as different species of the *Streptococcus* genus. The identification of the 35 strains belonging to other species of the genus by MALDI-TOF MS was confirmed by 16S rRNA gene partial sequencing, and both techniques presented 100% concordance. These results demonstrate the high efficiency in the use of the evaluated techniques for the identification of *S. suis* and the other species of the *Streptococcus* genus. The MALDI-TOF MS technique, despite the equipment high cost, presented the advantage of being fast, have low cost per analysis and reduced material usage.

Keywords: Sequencing. *Streptococcus suis*. PCR. MALDI-TOF MS.



## SUMARIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1	HISTORICO .....	12
1.2	ETIOLOGIA .....	13
1.3	EPIDEMIOLOGIA .....	14
1.4	INFECÇÃO EM HUMANOS .....	15
1.5	DIAGNÓSTICO E IDENTIFICAÇÃO .....	17
<b>1.5.1</b>	<b>Microbiológico .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Bioquímico .....</b>	<b>18</b>
<b>1.5.3</b>	<b>Reação em cadeia pela polimerase - PCR.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5.4</b>	<b>Espectrometria de massa por ionização/ dessorção a laser assistida por matriz em analisador por tempo de voo - MALDI-TOF MS.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>22</b>
3.1	AMOSTRA.....	22
3.2	REATIVAÇÃO BACTERIANA .....	22
3.3	IDENTIFICAÇÃO POR PCR .....	23
<b>3.3.1</b>	<b>Extração de DNA .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Eletroforese de gel de agarose .....</b>	<b>25</b>
3.4	IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF MS .....	25
<b>3.4.1</b>	<b>Extração de proteína ribossomal bacteriana .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Preparo de matriz.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Captura de espectros proteicos pelo MALDI-TOF MS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Identificação bacteriana pela comparação de espectros proteicos .....</b>	<b>27</b>
3.5	CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES .....	27
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	28
<b>3.6.1</b>	<b>Análise descritiva.....</b>	<b>28</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Análise de agrupamento e de componentes principais (PCA).....</b>	<b>28</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Análise filogenética do 16S rRNA.....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>

4.1	RESULTADOS do MALDI-tof ms .....	32
4.2	DENDROGRAMA e PCA .....	33
4.3	ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	36
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>44</b>
	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Streptococcus* é composto por bactérias de formato esférico que crescem em cadeias de comprimento variável. São cocos Gram-positivos, apresentam reação negativa para catalase, são anaeróbios facultativos e imóveis, exibem crescimento ótimo em meio de cultura adicionado de sangue ou soro fetal bovino. (QUINN et al., 2002). Alguns representantes deste gênero são *Streptococcus alactolyticus*, *S. dysgalactiae*, *S. gallinaceus*, *S. gallolyticus*, *S. henryi*, *S. hyointestinalis*, *S. hyovaginalis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. ovis*, *S. pluranimalium*, *S. sanguinium* (DEVRIESE et al., 1994; FACKLAM, 2002).

A espécie *Streptococcus suis*, é a que apresenta maior importância para a indústria suína (STAATS et al., 1997; GOYETTE-DESJARDINS et al., 2014). O agente exibe alfa ou beta hemólise em ágar sangue (QUINN et al., 2002). Com base em seus antígenos polissacarídeos capsulares é classificado em 35 sorotipos (HIGGINS et al., 1992; GOTTSCHALK; HIGGINS; BOUDREAU, 1993; HIGGINS et al., 1995) dos quais o sorotipo 2 é o mais comum quando o animal apresenta sinais clínicos da doença (STAATS et al., 1997; BERTHELOT-HÉRAULT et al., 2000; GOTTSCHALK; SEGURA, 2000).

Normalmente a bactéria tem como habitat o trato respiratório superior, principalmente tonsilas e cavidade nasal (O'SULLIVAN et al., 2011). É facilmente transmitido entre os animais em sistemas intensivos devido ao grande número de suínos (HIGGINS; GOTTSCHALK, 2006). Os animais afetados são principalmente leitões entre 3 e 12 semanas de idade, estes animais apresentam quadros clínicos como meningite, pneumonia, artrite, endocardite, septicemia, abscessos e morte súbita (PERCH; PEDERSEN; HENRICHSEN, 1983; GOTTSCHALK; SEGURA, 2000).

*Streptococcus suis* foi reconhecido como espécie em 1987 (KILPPER-BALZ; SCHLEIFER, 1987) e tem sido descrito como patógeno oportunista em várias espécies animais, além dos suínos, incluindo aves, cães, cavalos, bovinos, carneiros, cabras, bisões e zebras (DEVRIESE et al., 1990; DEVRIESE et al., 1994). O agente é ainda um

importante agente zoonótico, com descrição de casos clínicos afetando seres humanos em mais de 30 países, sendo descritos mais de 1600 casos com maior frequência em países do sudeste asiático como Tailândia, Vietnam e China (FENG et al., 2014).

As infecções em humanos que são expostos aos suínos doentes, carcaças de suínos contaminados ou que consomem a carne contaminada podem levar a um quadro clínico severo de meningite, artrite e septicemia, sendo muitas vezes fatal (GOYETTE-DESJARDINS et al., 2014; HUONG et al., 2014). Um aumento dramático no número de infecções humanas por *S. suis* tem sido reportado mundialmente na última década (MAI et al., 2008).

Os principais métodos de identificação da espécie em laboratório são: provas bioquímicas, identificação dos sorotipos e testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) ou sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (PRIETO et al., 1994; STAATS et al., 1997; GOYETTE-DESJARDINS et al., 2014).

Técnicas que tiveram seu uso adaptado a microbiologia nos últimos anos como a espectrometria de massa por ionização/dessorção a laser assistida por matriz em analisador por tempo de voo (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) (MALDI-TOF MS), contam com vantagem de precisar de baixo tempo na identificação dos agentes, eficácia e baixo custo (BIZZINI; GREUB, 2010).

## 1.1 HISTORICO

O termo "*Streptococcus*" foi descrito pela primeira vez por Friedr Rosenbach (1884). As primeiras tentativas de classificação dos membros do gênero foram realizadas com base nas características de hemólise em ágar sangue de carneiro (FACKLAM, 2002). Os grupo A, B, C, e D de Lancefield foram classificados a partir de carboidratos da parede celular (HIGGINS; GOTTSCHALK, 2006). Mais tarde foram descritos os grupos S e R de Lancefield, que posteriormente foram denominados *Streptococcus suis*

tipo 1 e 2 respectivamente (DE MOOR, 1963; TARRADAS et al., 1994). Ao longo dos anos surtos por *Streptococcus suis* foram descritos em vários países. Os primeiros surtos foram descritos no Reino Unido e na Holanda em 1950 caracterizado por meningite em leitões (DE MOOR, 1963), seguido por casos registrados nos Estados Unidos em 1969. Desde então o agente é reconhecido em diversos países (STAATS et al., 1997; WISSELINK et al., 2000).

## 1.2 ETIOLOGIA

O gênero *Streptococcus* é formado por bactérias que se caracterizam morfológicamente por cocos que formam cadeias de diferentes comprimentos. São bactérias Gram positivas com diâmetro variável. Todas as espécies deste gênero são anaeróbias facultativas e catalase negativas. Em ágar sangue de carneiro, diferentes espécies são classificadas de acordo com o padrão de hemólise como alpha ou beta hemolíticos após 24 ou 48 horas de incubação a 37° C (QUINN et al., 2002).

*Streptococcus suis* foi classificado em 35 sorotipos com base na composição de polissacarídeos capsulares, sendo descritos inicialmente os sorotipos 1 até 34 e o 1/2 (PERCH; PEDERSEN; HENRICHSEN, 1983; GOTTSCHALK et al., 1989; GOTTSCHALK et al., 1991; HIGGINS et al., 1995; HIGGINS; GOTTSCHALK, 1996). O sorotipo mais frequentemente isolado em suínos de vários países é o sorotipo 2, também sendo considerado o de maior ocorrência em casos zoonóticos (CLIFTON-HADLEY, 1984; STAATS et al., 1997; GOTTSCHALK; SEGURA; XU, 2007; LUN et al., 2007). Estudos realizados com a análise dos genes 16s rRNA e do gene *cpn60* indicaram que os sorotipos 32 e 34 se distanciam geneticamente dos outros *S. suis* sugerindo que os mesmos sejam classificados na espécie *Streptococcus orisratti* (HILL et al., 2005). A análise das sequências dos genes *sodA* e *recN* indicaram que os sorotipos 20, 22, 26 e

33 atualmente identificados como *S. suis* devem compor uma nova espécie (TIEN et al., 2013).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA

*Streptococcus suis* está normalmente presente nas vias respiratórias superiores colonizando principalmente as tonsilas e cavidade nasal, também podem ser isolados nos tratos geniturinário e cavidade oral (HIGGINS; GOTTSCHALK, 2006), desta forma a transmissão da bactéria se dá por contato nasal, oral ou através do trato geniturinário; as porcas e marrãs são consideradas fontes de infecção para os leitões durante e depois do parto. A doença pode-se manifestar em suínos de 4 a 12 semanas de vida sendo as taxas mais altas de infecção observadas entre 5 e 10 semanas de idade (ROBERTSON; BLACKMORE, 1989; STAATS et al., 1997).

A morbidade e mortalidade variam muito entre os diferentes sistemas de produção de suínos. A morbidade pode variar entre 1 e 50%, sendo que sem nenhum tratamento, a mortalidade pode chegar a 20% dos animais infectados. Medidas de controle ambientais como limpeza, temperatura e ventilação reduzem os níveis de estresse e geralmente levam a uma menor taxa de mortalidade (STAATS et al., 1997). Os suínos carreadores (portadores saudáveis) que ingressam em novos rebanhos disseminam o agente, mas esta não é a única forma de introdução de novas linhagens em um rebanho. Outras fontes de infecção são o ambiente contaminado, funcionários, outras espécies animais como ratos e aves, e poeira (WILLIAMS; BLAKEMORE; ALEXANDER, 1988; DEE; COREY, 1993).

Entre alguns países da Europa ocorrem diferentes distribuições dos sorotipos mais importantes. Na Bélgica, Reino Unido, França, Itália, Alemanha, Espanha e Holanda estudos indicam que o sorotipo 2 é mais prevalente, representando 32% das estirpes isoladas, seguido pelo sorotipo 9 encontrado em 20% dos animais examinados na

Alemanha, Bélgica e Holanda. Animais infectados pelo sorotipo 1 são descritos em 12% dos animais no Reino Unido (WISSELINK et al., 2000).

*S. suis* pertencente ao sorotipo 2 é sem dúvida o mais isolado em todo o mundo. Na china este sorotipo está relacionado com doenças sistêmicas em 42% dos casos de infecção (HIGGINS; GOTTSCHALK, 2000; WEI et al., 2009).

#### 1.4 INFECÇÃO EM HUMANOS

A primeira descrição de infecção humana por *S. suis* data de 1968 na Dinamarca e desde então vários casos foram descritos em mais de 30 países (FENG et al., 2014), no entanto a doença ainda não foi descrita em alguns países como por exemplo, Brasil. A ausência de relatos da infecção humana por *S. suis* nestes países pode ser decorrente do desconhecimento sobre a doença entre os clínicos ou dificuldades na identificação do agente (AMASS, 1998).

O sorotipo 2 é o mais frequente em infecções humanas, sendo descritos ainda casos de infecção pelos sorotipos 1, 4, 5, 14, 16 e 24 (KAY; CHENG; TSE, 1995; FENG et al., 2014). Dois grandes surtos de infecção humana por *Streptococcus suis* sorotipo 2 que ocorreram na China em 1998 e em 2005, trouxeram graves consequências e mudaram a visão convencional sobre o agente, que era tido como causador de doença esporádica. Estudos genômicos elucidaram a razão da alta virulência das estirpes epidêmicas chinesas de *S. suis* sorotipo 2. Estas linhagens possuem uma ilha de patogenicidade denominada 89K PAI a qual possuem um comportamento semelhante a um transposon facilitando sua transferência horizontal para outras cepas da espécie de forma epidêmica (FENG et al., 2014).

Além dos casos de epidemia, a maior parte dos casos endêmicos de infecção pelo agente tem sido descritos no sudeste da Ásia (especialmente no Vietnã, Tailândia e sul

da China), indicando um marcante tropismo geográfico. Não há até o momento explicações claras para este tropismo, mas os seguintes fatores parecem estar correlacionados com a frequente ocorrência de infecções humanas pelo *S. suis* sorotipo 2: 1) semelhanças em clima e ambiente; 2) criação de suínos de subsistência (fundo de quintal); 3) consumo de carne suína crua ou mal cozida em pratos típicos em mercados de rua (FENG et al., 2014).

As infecções mais brandas pelo *S. suis* tipo 2 em humanos podem causar meningites e/ou septicemia seguida de surdez (CAMMAERT; VERSTRAETE; BAECK, 1990; PERSEGHIN et al., 1995). Os sintomas como ataxia e surdez ocorrem em 50 a 75% dos casos de pacientes com meningite, persistindo na metade desses casos (DUPAS et al., 1992). Além destes sintomas são descritos outros como presença de petéquias e mais raramente necrose de extremidades. Os casos mais graves e recentes incluem endocardite, pneumonia, artrite, espondilodiscite, gastroenterite e choque séptico (KAY; CHENG; TSE, 1995; FENG et al., 2014).

Nas regiões em que os casos são esporádicos os profissionais mais expostos à contaminação por *S. suis* são funcionários ou proprietários de criações de suínos, trabalhadores de matadouros e frigoríficos, transportadores de suínos e carne, açougueiros, inspetores de carne, veterinários e cozinheiros (KAY; CHENG; TSE, 1995).

Grande parte dos pacientes infectados nestes casos apresentavam algum corte ou queimadura antes da manifestação dos sintomas, sugerindo que a pele pode ser uma importante porta de entrada para o microrganismo. Por outro lado, alguns pacientes não tinham histórico de lesões de nenhuma natureza, sendo que a via oral ou respiratória não pode ser descartada como uma eventual porta de entrada do agente nos indivíduos susceptíveis (KAY; CHENG; TSE, 1995).

Arends e Zanen (1988) demonstraram em estudo realizado com 34 amostras de *S. suis* tipo 2 isoladas de tonsilas de funcionários de matadouros, frigoríficos e proprietários de granjas de suínos que estes profissionais apresentam um risco de se infectar por *S. suis* aproximadamente 1500 vezes maior do que os profissionais que não trabalham nesta área. Arends e Zanen (1988) citam uma taxa de mortalidade de 7% entre casos descritos na Alemanha e em outros países, no entanto, sequelas como surdez uni



ou bilateral são frequentes. A perda de audição variando de leve a severa foi observada em 54% dos casos descritos na Alemanha e em 64% dos casos em outros países.

A infecção por *Streptococcus suis* tipo 2 é uma zoonose que pode se tornar uma importante doença ocupacional no futuro, com a agravante de que muitos casos podem estar sendo ignorados em países em que o consumo e a criação de suínos são expressivos (KAY; CHENG; TSE, 1995).

## 1.5 DIAGNÓSTICO E IDENTIFICAÇÃO

Em suínos, o diagnóstico presuntivo de infecções causadas por *S. suis* geralmente baseia-se nos sinais clínicos, lesões macroscópicas e a idade do animal, sendo confirmado através do isolamento e identificação do agente (STAATS, 1997; FENG et al., 2014). As estirpes de *S. suis* geralmente são identificadas e classificadas com base nas características morfológicas, bioquímicas e sorológicas (VECHT et al., 1985).

### 1.5.1 Microbiológico

*Streptococcus suis* pode ser cultivado em caldo cérebro-coração (BHI) enriquecido com soro fetal bovino ou caldo Todd Hewitt (Difco BBL). Em meio sólido pode-se utilizar ágar sangue de carneiro e incubar a 37° C por 24 horas. Após este período pode-se observar colônias pequenas, apresentando alfa hemólise (DE OLIVEIRA, 2012).

### 1.5.2 Bioquímico

As características bioquímicas são muito variáveis, sendo comum a dificuldade de identificação e muitas vezes, para confirmação, é necessário associar a bioquímica com a sorotipagem (HIGGINS; GOTTSCHALK, 1990). Devriese et al. (1991), sugerem o uso de apenas dois testes para diferenciação do agente, a amilase e acetoína rápida (VP-Voges-Proskauer). A sorotipagem ainda é um importante procedimento na rotina de diagnóstico e pode ser feita através de várias técnicas, sendo o método de coaglutinação o mais utilizado pela maioria dos laboratórios (GOTTSCHALK, 1999).

*S. suis* apresenta as seguintes reações metabólicas quando submetido ao crescimento junto a diferentes substratos: é positivo para hidrólise de esculina, produção de ácido a partir de trealose, glicogênio, lactose, sacarose, amido, leucina, salicina. Apresenta reação negativa para hidrólise de hipurato, fermentação de ribose, arabinose, sorbitol, manitol, melibiose, inulina, arginina, produção de dihidrolase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase, metil- $\beta$ -d-glucopiranosideo, glicil-triptofano arilamidase (KILPPER-BALZ; SCHLEIFER, 1987; FACKLAM, 2002; DE OLIVEIRA, 2012; STANOJKOVIC et al., 2014).

### 1.5.3 Reação em cadeia pela polimerase - PCR

A identificação e a caracterização molecular dos agentes infecciosos tem favorecido análises que refletem uma das propriedades mais fundamentais de um organismo, seu código genético. A caracterização genotípica possui uma versatilidade que ultrapassa as fronteiras da caracterização fenotípica por métodos tradicionais. A análise do ácido nucléico facilita a identificação e a rápida detecção de um

microrganismo, a determinação de sua posição taxonômica e a investigação de relações genéticas intra-espécie. As diversas ferramentas de análise molecular têm sido amplamente aplicadas na identificação e caracterização de estirpes de *S. suis* (WISSELINK et al., 2000; OKWUMABUA; O'CONNOR; SHULL, 2003).

A identificação e caracterização do agente através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) podem ser de grande importância ao diagnóstico, dada sua vantagem em sensibilidade e solidez (FENG et al., 2014). A PCR pode ser empregada para analisar diferentes características das bactérias do gênero. A amplificação de genes de *S. suis* como o glutamato desidrogenase (*gdh*) possibilitam a identificação da espécie, a PCR para as diferentes sequências de genes codificadores de polissacarídeos capsulares (*cps*) possibilitam a diferenciação de sorotipos. A PCR pode ser usada também para detecção de diferentes fatores de virulência como MRP (“muraminidase released protein”), suilisina (*sly*), arginina desaminase (*arcA*), e fator extracelular (*epf*) que podem estar ou não associados com algum sorotipo em particular (OKWUMABUA; O'CONNOR; SHULL, 2003; SILVA et al., 2006).

#### **1.5.4 Espectrometria de massa por ionização/ dessorção a laser assistida por matriz em analisador por tempo de voo - MALDI-TOF MS**

A tecnologia de espectrometria de massa por ionização/dessorção a laser assistida por matriz em analisador por tempo de voo (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight - MALDI-TOF MS) tem sido descrita como uma nova ferramenta para os laboratórios na identificação de microrganismos, e sua precisão e agilidade podem revolucionar a identificação de agentes patogênicos.

A técnica foi inicialmente descrita por Maurer, Winkler e Anhalt (1975) e tem como base comparar padrões de proteínas bacterianas de extratos celulares. Classificada como uma das técnicas moleculares de terceira geração, o MALDI-TOF MS tem sido

estudado ao longo do tempo por diversos pesquisadores com o objetivo de melhorar a técnica e as matrizes ampliando assim o aproveitamento da bactéria e obtendo resultados mais específicos (KARAS; BACHMANN; HILLENKAMP, 1985; HELLER et al., 1988; TANAKA et al., 1988).

Os bancos de espectros de referência (ER) fornecidos pelos fabricantes (Bruker® ou BioMérieux®) são muitas vezes insuficientes para identificação de toda gama de espécies patogênicas na área veterinária. Sendo assim, novos bancos de espectros de referência com maior diversidade taxonômica e clonal são necessários para a identificação correta dos agentes de importância. Esta metodologia de análise baseada nos perfis proteicos dos agentes tem ainda grande potencial para caracterização e discriminação de estirpes (SPINALI et al., 2015). Até o presente momento não foram identificados artigos relatando a caracterização do perfil de proteínas totais de cepas de *Streptococcus suis* pela Espectrometria de Massa MALDI-TOF.

Para realização da análise por MALDI-TOF MS as proteínas presentes no isolado são extraídas e posteriormente misturadas com a matriz, geralmente composta de pequenos cristais e moléculas de ácidos (alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, ácido sinapínico ou ácido 2,5-dihidroxi benzoico). A matriz exerce função de absorvência de raios ultravioletas (UV), para que a estirpe sofra dessorção e ionização. O princípio utilizado é o da relação massa/ carga ( $m/z$ ), onde cada molécula é caracterizada de acordo a valores destas variáveis. As moléculas ionizadas são aceleradas através de um campo eletrostático em tubo de vôo a vácuo até atingirem o detector. A partícula com menor valor consegue alcançar um maior tempo de vôo dos que as moléculas mais pesadas, gerando assim um perfil espectral único detectado para uma mesma espécie ou gênero bacteriano. Os perfis são então comparados a uma base de referência de padrões espectrais de diferentes bactérias (CARBONNELLE et al., 2011; KLIEM; SAUER, 2012; BISWAS; ROLAIN, 2013; DE CAROLIS et al., 2014).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar estirpes com características morfológicas de *Streptococcus* spp., pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Sanidade Suína (FMVZ-USP), por meio da PCR e de MALDI-TOF MS.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reativar as estirpes suspeitas de pertencer ao gênero *Streptococcus*;
- Realizar a identificação das estirpes pela PCR ou pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA;
- Identificar as estirpes suspeitas por MALDI-TOF MS;
- Analisar o agrupamento dos perfis proteicos das estirpes identificadas pelo MALDI-TOF MS.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 AMOSTRA

Foram analisadas 250 estirpes de cocos Gram-positivos com características morfológicas sugestivas de *Streptococcus suis*, pertencentes a coleção de culturas do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), Brasil.

As estirpes utilizadas neste estudo foram isoladas de suínos doentes de diferentes estados brasileiros entre os anos de 2001 a 2014. Os animais avaliados apresentavam quadros clínicos de encefalite, artrite, pneumonia, metrite, infecção urinária ou septicemia. As estirpes foram agrupadas de acordo com o sítio de isolamento do agente como provenientes de: sistema respiratório, sistema nervoso central (SNC), sistema gênito-urinário, articulações, sangue, cavidade torácica, peritônio e coração.

#### 3.2 REATIVAÇÃO BACTERIANA

As estirpes foram reativadas a partir do estoque em BHI com 30% de glicerol mantido a -80 °C. Cada cultura foi semeada em 4 ml de caldo BHI (*brain heart infusion*) enriquecido com 5% de soro fetal bovino e em ágar sangue de carneiro 5%, incubadas em aerobiose, durante 24 horas a 37°C.

A partir do crescimento foi selecionada uma colônia isolada e a mesma foi semeada em 3 mL de caldo BHI incubado a 37° C por 24 horas. A partir deste cultivo foram separadas duas alíquotas de 1 ml, sendo uma utilizada para extração de DNA e outra para purificação de proteína ribossomal.

### 3.3 IDENTIFICAÇÃO POR PCR

As etapas da identificação estão descritas abaixo.

#### 3.3.1 Extração de DNA

A extração foi realizada segundo descrito por (BOOM et al., 1990) a partir de 1 ml de cultura bacteriana em caldo BHI. A cultura foi centrifugada durante 5 minutos em velocidade de 12.800 X rpm para formação do sedimento e descarte do sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em 200 µL de água ultrapura (tipo I), recebeu 100 µL de lisozima e 20 µL de proteinase K, em seguida foi incubado a 37° C por 1 hora. Após este período foi adicionado 1ml de tampão de lise (120 g isotiocianato de guanidina, 1 mL Triton 100 X, 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 8,8 mL EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL H<sub>2</sub>O ultrapura (tipo I)), 40 µL de solução carreadora (1 g de Diatomaceous Earth, 50 µL HCl 37 % e 5 mL H<sub>2</sub>O ultrapura (tipo I)) e o microtubo foi agitado em vortex e incubados a temperatura ambiente por 20 minutos. Após a lise celular e a ligação do material genético as partículas de sílica, a amostra foi centrifugada a 12800 x rpm por 90 segundos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi submetido a cinco lavagens seguidas. As duas primeiras com 500 µL de tampão de lavagem (120 g isotiocianato de

guanidina e 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] em 100 mL H<sub>2</sub>O ultrapura (tipo I)), as duas seguintes com 500 µL de etanol 70 % (- 20°C) e a última com 500 µL de acetona. Após as lavagens o microtubo contendo o sedimento foi mantido em estufa a 37 °C por 45 minutos até ficar sem resíduos de acetona. O sedimento foi suspenso em 165 µL de tampão de eluição (1 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 0,2 mL EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura (tipo I)) e mantido a 56°C durante 10 minutos. Após este período o material foi centrifugado a 12800 x rpm por 7 minutos. Nesta última etapa o sobrenadante contendo o DNA foi removido e transferido para um microtubo limpo, o qual foi armazenado a -20 °C até sua utilização.

### 3.3.2 Identificação de gênero e espécie

A PCR foi realizada com uma mistura contendo 32,8 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura (tipo I), 5 µL de tampão de enzima, 0,2 µL de Taq DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de cada dNTP (A, T, G, C), 20 pmoles de cada primer (JP4 e JP5) totalizando volume de 45 µL. A esta mistura foi adicionado 5 µL de DNA extraído. O ciclo utilizado para amplificação dos fragmentos de DNA e os primers foram descritos previamente (OKWUMABUA; O'CONNOR; SHULL, 2003) (Quadro-1).

Quadro 1 - sequência de *primers* para identificação de *Streptococcus suis*

Espécie	Gene	Nome	Sequencia 5' - 3'	Amplicon (pb)
<i>S. suis</i>	<i>gdh</i>	JP4	5P-GCAGCGTATTCTGTCAAACG-3P	688
		JP5	5P-CCATGGACAGATAAAGATGG-3P	

Fonte: (OKWUMABUA; O'CONNOR; SHULL, 2003).



### 3.3.3 Eletroforese de gel de agarose

A eletroforese foi realizada com a mistura de 10 µL dos produtos de amplificação e 0,7 µL do corante BlueGreen® (LGC Biotecnologia). Os fragmentos foram separados em gel de agarose a 1,5 %, utilizando-se tampão TBE 0,5 X (Tris-base 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM, pH 8) em corrida a 120V. Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de foto documentação Gel Doc XR e identificados com base na utilização de marcador de 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

## 3.4 IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF MS

As etapas da identificação estão descritas abaixo.

### 3.4.1 Extração de proteína ribossomal bacteriana

Uma alíquota de 1 ml do cultivo bacteriano em caldo BHI foi centrifugada por 5 minutos em velocidade de 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado mantendo somente o sedimento, o qual é suspenso em 300 µL de água ultrapura (tipo I). O sedimento foi centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento foi suspenso em 300 µL de água ultrapura (tipo I) e misturado com auxílio de pipeta para homogenizar completamente a cultura bacteriana na água ultrapura (tipo I). Foi adicionado 900 µL de etanol absoluto (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) ao microtubo. A amostra foi

centrifugada em velocidade de 13.000 rpm por 2 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Após estas etapas o tubo foi mantido em temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora para secagem do sedimento. Após a secagem foi adicionado 30 µL de ácido fórmico 100% e 30 µL de acetonitrila 70% a amostra foi misturada no vortex e centrifugada a 13.000 rpm por 2 minutos. O sobrenante (50 µL) foi transferido microtubo novo e foi armazenado a -20°C.

### **3.4.2 Preparo de matriz**

A matriz utilizada para leitura no espectrofotômetro de massa foi composta de 10 mg de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico dissolvido em 1 ml de solução de acetonitrila 50%/ ácido trifluoroacético 2,5%.

### **3.4.3 Captura de espectros proteicos pelo MALDI-TOF MS**

Para leitura pelo MALDI-TOF MS foi utilizado o espectrofotômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik). Para leitura 1 uL de suspensão proteica foi transferido para a placa de aço inox de 96 poços. Após secagem em temperatura ambiente, foi adicionado sobre a amostra 1uL da matrix. Cada cepa foi distribuída em três poços (triplicata) e para cada placa foram realizadas duas leituras, totalizando a captura de seis espectros proteicos por estirpe. Para captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa FlexControl™ (Bruker Daltonik) pelo método MTB\_autoX.

### 3.4.4 Identificação bacteriana pela comparação de espectros proteicos

Para a identificação bacteriana pelo espectro proteico foi utilizado o programa BioTyper™ (MALDI Biotyper CA Systems) 3.0 (Bruker Daltonik) a partir do qual foi realizada uma comparação dos espectros capturados para cada estirpe com a biblioteca do fabricante. Desta comparação de presença/ausência de picos específicos por gênero e espécie bacteriana, obtém-se um valor de escore (*log (score) value*). Os critérios para interpretação dos padrões da fabricante Bruker Daltonik foram utilizados neste estudo como segue: escores  $\geq 2.0$  foram aceitos para atribuição de espécie, e escores  $\geq 1.7$  e  $< 2.0$  foram utilizados para identificação de gênero.

## 3.5 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES

Para a confirmação de outras espécies do gênero *Streptococcus* não identificadas pela PCR para *S. suis* foi realizada a amplificação parcial do gene 16S rRNA. A amplificação parcial foi realizada com os iniciadores descritos por TWOMEY et al. (2012) (F8 - AGTTTGATCCTGGCTCAG; 1492R - ACGGCTACCTTGTTACGACTT). Os fragmentos amplificados obtidos foram purificados com o kit *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado pelo Centro de Pesquisa de Genoma Humano (Universidade de São Paulo) a partir dos produtos purificados. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). O material foi analisado no equipamento de sequenciamento automático modelo 3130xl (Applied Biosystems). Foram feitas duplicatas de cada amostra para a obtenção de sequências consenso.

## 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferentes análises estão descritas nas seções abaixo.

### 3.6.1 Análise descritiva

A distribuição de frequências das estirpes segundo origem, resultados da PCR e identificação pelo MALDI-TOF MS foi realizada com o programa SPSS 16.0 (SPSS Inc).

### 3.6.2 Análise de agrupamento e de componentes principais (PCA)

Para a análise de agrupamento e dos componentes principais dos espectros proteicos, foram utilizadas as seis réplicas obtidas por estirpe para gerar um espectro principal/médio a partir do programa Bionumerics 7.5 (Applied Maths). A análise de agrupamento foi realizada utilizando o número de picos diferentes detectados e o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para avaliar a homogeneidade e heterogeneidade dos espectros proteicos, sendo os resultados apresentados em um gráfico tridimensional (*score plot*).

### 3.6.3 Análise filogenética do 16S rRNA

As sequências obtidas foram editadas com o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.9 (HALL, 1999) e alinhadas pelo aplicativo *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994) com as sequências disponíveis no banco de dados *RefSeq* do *GenBank* (NCBI). A análise filogenética foi realizada no programa *Mega* 5.10 (TAMURA et al., 2011) utilizando o método de *Maximum-likelihood* (FELSENSTEIN, 1981) e o modelo *Tamura-3-parameter* (TAMURA, 1992). As sequências obtidas foram depositadas no banco de dados *GenBank* com os números de acesso: KR819485, KR819487-KR819494, KR819496, KR819498, KR819500 e KR819502.

## 4 RESULTADOS

No período de 2001 a 2014 foram isoladas 250 estirpes com características morfológicas sugestivas de *Streptococcus* spp. a partir de amostras recebidas no Laboratório de Sanidade Suína (VPS-FMVZ-USP). A distribuição das estirpes de acordo com o ano de isolamento é descrita na tabela 1. O ano de 2002 apresentou o maior número de isolamentos representando 22% das estirpes (55/250).

As estirpes foram agrupadas de acordo com os sítios de isolamento, sendo que 46,8% foram isoladas de sistema nervoso central (117/250), 32,8% de sistema respiratório (82/250), 5,2% de sistema gênito urinário (13/250), 10% de articulação (25/250), 5,2% de outros sítios (13/250) conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 1 - Frequência de estirpes avaliadas de acordo com o ano e o sítio de isolamento

Ano	Sítio de Isolamento					Total N (%)
	SNC N (%)	Respiratório N (%)	Genito- urinário N (%)	Articulação N (%)	Outros N (%)	
2001	25 (21,4)	3 (3,7)	0 (0,0)	7 (28)	0 (0,0)	35 (14,0)
2002	36 (30,8)	10 (12,2)	0 (0,0)	3 (12)	6 (46,2)	55 (22,0)
2003	20 (17,1)	17 (20,7)	0 (0,0)	4 (16)	2 (15,4)	43 (17,2)
2007	2 (1,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (8)	0 (0,0)	4 (1,6)
2009	2 (1,7)	9 (11)	0 (0,0)	3 (12)	0 (0,0)	14 (5,6)
2010	9 (7,7)	11 (13,4)	2 (15,4)	1 (4)	0 (0,0)	23 (9,2)
2011	8 (6,8)	9 (11)	9 (69,2)	4 (16)	0 (0,0)	30 (12)
2012	3 (2,6)	9 (11)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (15,4)	14 (5,6)
2013	10 (8,5)	13 (15,9)	2 (15,4)	1 (4)	3 (23,1)	29 (11,6)
2014	2 (1,7)	1 (1,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (1,2)
Total	117	82	13	25	13	250

Tabela 2 – Distribuição das estirpes de acordo com os sítios isolamento

Sítio de isolamento	Número de estirpes	%
SNC	117	46,8
Respiratório	82	32,8
Genito-Urinário	13	5,2
Articulação	25	10,0
Outros	13	5,2
Total	250	100,0

Dentre as 250 estirpes avaliadas pela PCR, 86% (215/250) foram positivas para *S. suis*, com fragmento amplificado de 688 pb (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados da PCR para identificação de *Streptococcus suis* dentre as 250 estirpes avaliadas

PCR <i>S. suis</i>	Sítio de isolamento					Total
	SNC	Sistema respiratório	Genito-urinário	Articulação	Outros	
Positivo	107 (91,4)	68 (82,9)	12 (92,3)	20 (80)	8 (61,5)	215 (86)
Negativo	10 (8,6)	14 (17,1)	1 (7,7)	5 (20)	5 (38,5)	35 (14)
Total	117	82	13	25	13	250

#### 4.1 RESULTADOS DO MALDI-TOF MS

Todas as 250 estirpes foram avaliadas pelo MALDI –TOF MS, sendo que 86% (215/250) foram identificadas como *Streptococcus suis* com escore > 2.00.

As 35 amostras negativas para *S. suis* foram identificadas como pertencentes a diferentes espécies do gênero *Streptococcus*, sendo identificadas as espécies *S. hyovaginalis*, *S. oralis*, *S. hyointestinalis*, *S. sanguinis*, *S. henryi*, *S. alactolyticus*, *S. plurianimalium*, *S. dysgalactiae*, *S. gallinaceus*, *S. gordonii*, *S. gallolyticus* e *S. mitis* (Tabela 4).



Tabela 4 - Distribuição das diferentes espécies de *Streptococcus* identificadas pelo MALDI-TOF MS de acordo com o sítio de isolamento

Identificação MALDI-TOF MS	Sítio de Isolamento					Total
	SNC	Respiratóri o	Genito- Urínario	Articulaçã o	Outros	
<i>S. suis</i>	107(91,5)	68(82,9)	12(92,3)	20(80,0)	8(61,5 )	215(86, 0)
<i>S. hyovaginalis</i>	4(3,4)	0(0,0)	0(0,0)	1(4,0)	0(0,0)	5(2,0)
<i>S. oralis</i>	1(0,9)	0(0,0)	0(0,0)	1(4,0)	0(0,0)	2(0,8)
<i>S. hyointestinalis</i>	0(0,0)	5(6,1)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	5(2,0)
<i>S. sanguinis</i>	0(0,0)	2(2,4)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	2(0,8)
<i>S. henryi</i>	0(0,0)	1(1,2)	0(0,0)	0(0,0)	2(15,4 )	3(1,2)
<i>S. alactolyticus</i>	0(0,0)	4(4,9)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	4(1,6)
<i>S. plurianimalium</i>	2(1,7)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	3(23,1 )	5(2,0)
<i>S. dysgalactiae</i>	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	3(12,0)	0(0,0)	3(1,2)
<i>S. gallinaceus</i>	0(0,0)	1(1,2)	1(7,7)	0(0,0)	0(0,0)	2(0,8)
<i>S. gordonii</i>	1(0,9)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	1(0,4)
<i>S. gallolyticus</i>	2(1,7)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	2(0,8)
<i>S. mitis</i>	0(0,0)	1(1,2)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	1(0,4)
Total	117	82	13	25	13	250

#### 4.2 DENDROGRAMA E PCA

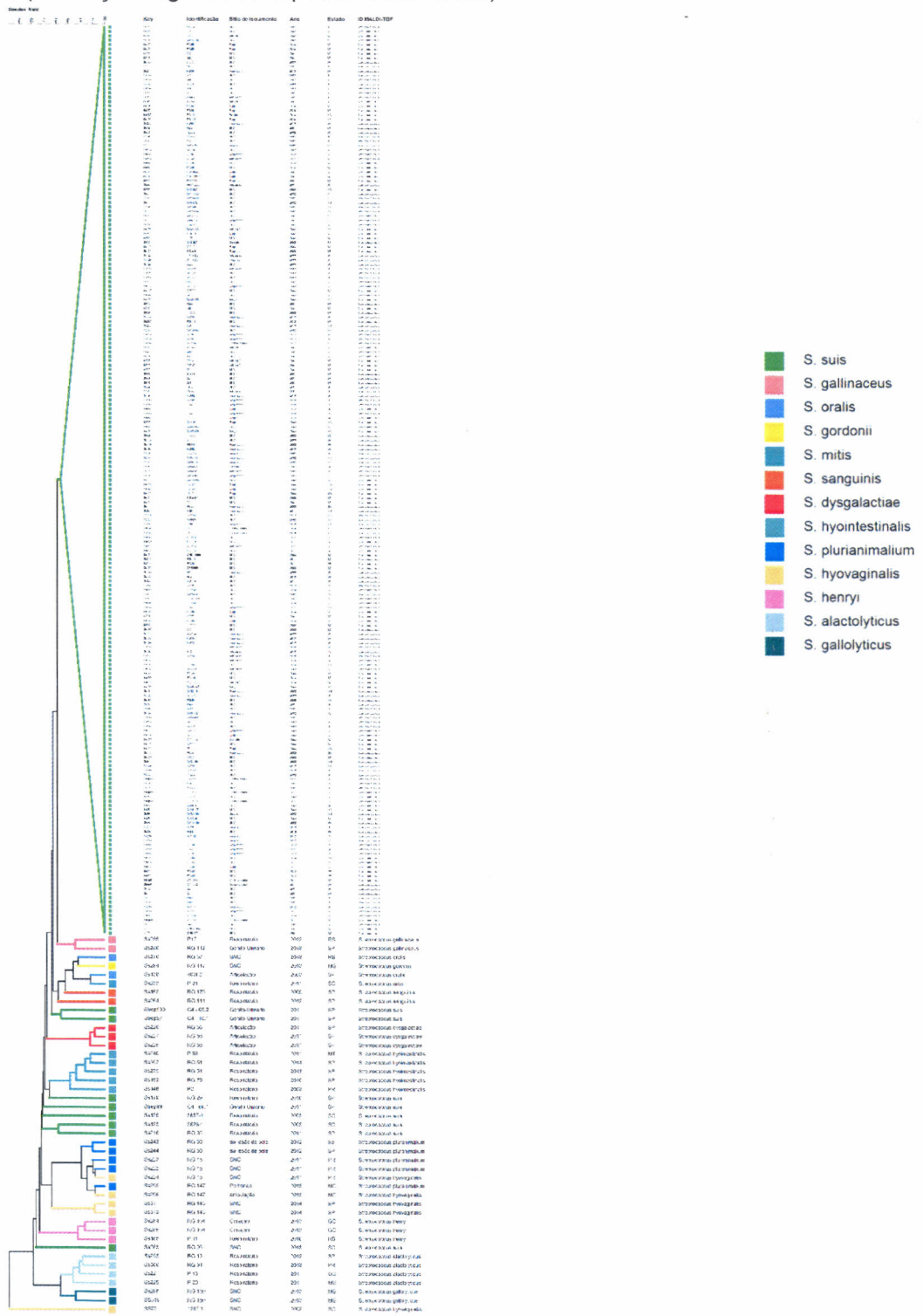
A análise de agrupamento dos espectros proteicos obtidos pelo MALDI-TOF MS resultou no agrupamento dos espectros segundo as espécies identificadas. O dendrograma apresentado na figura 1 apresenta o agrupamento das estirpes estudadas segundo a similaridade dos respectivos espectros proteicos (seja pela presença/ausência de picos proteicos e também pela distância entre estes).

Pode-se observar um grande grupo (em verde) composto por 207 estirpes de *Streptococcus suis*; apenas oito estirpes identificados como *S. suis* ficaram separados deste grupo e originaram agrupamentos próprios (ss283 e strepto100; ss123, ss125, ss179, ss216 e ss332; strepto57). Os espectros identificados como *S. hyovaginalis*, *S. hyointestinalis*, *S. sanguinis*, *S. henryi*, *S. alactolyticus*, *S. plurianimalium*, *S. dysgalactiae*,

*S. gallinaceus* e *S. gallolyticus* também originaram agrupamentos distintos entre as respectivas espécies. Já os espectros de *S. oralis*, *S. gordonii* e *S. mitis* formaram um agrupamento não uniforme e de maior proximidade ao grupo dos espectros de *S. suis*.

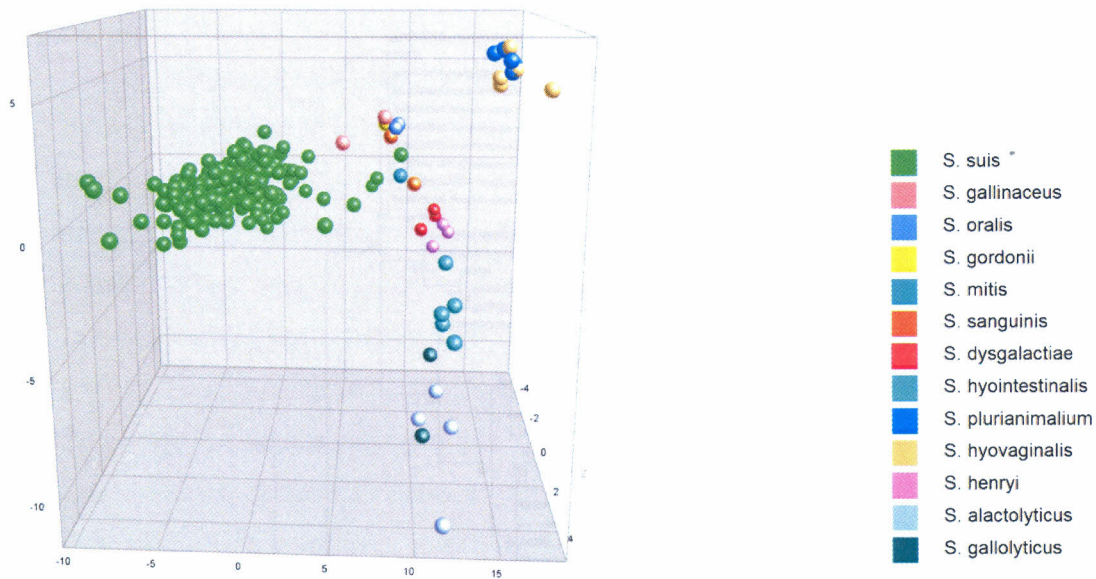
A tendência de agrupamento dos espectros proteicos por espécie também pode ser evidenciada pela análise de componentes principais (PCA) (Figura 2). Os espectros de *S. suis* compõem um grande grupo, como esperado, e apresentam maior distanciamento dos espectros das demais espécies de *Streptococcus* identificadas. Também se observa uma tendência de agrupamento das espécies *S. oralis*, *S. gordonii* e *S. mitis*, conforme observado no dendrograma, enquanto que *S. gallolyticus* e *S. alactolyticus* apresentaram maior distanciamento dos espectros de *S. suis*. Os espectros de *S. plurianimalium* e *S. hyovaginalis* também chamam atenção por se agruparem muito próximos entre si e se distanciarem das demais espécies identificadas.

Figura 1 - Dendrograma das distribuições de similaridade de espectro proteico geradas pelo MALDI-TOF MS (Coloração segundo as espécies identificadas)



Fonte: (CABRERA MATAJIRA, 2015)

Figura 2 – Representação gráfica da análise de componentes principais (PCA) dos espectros proteicos estudados (Coloração segundo as espécies identificadas)

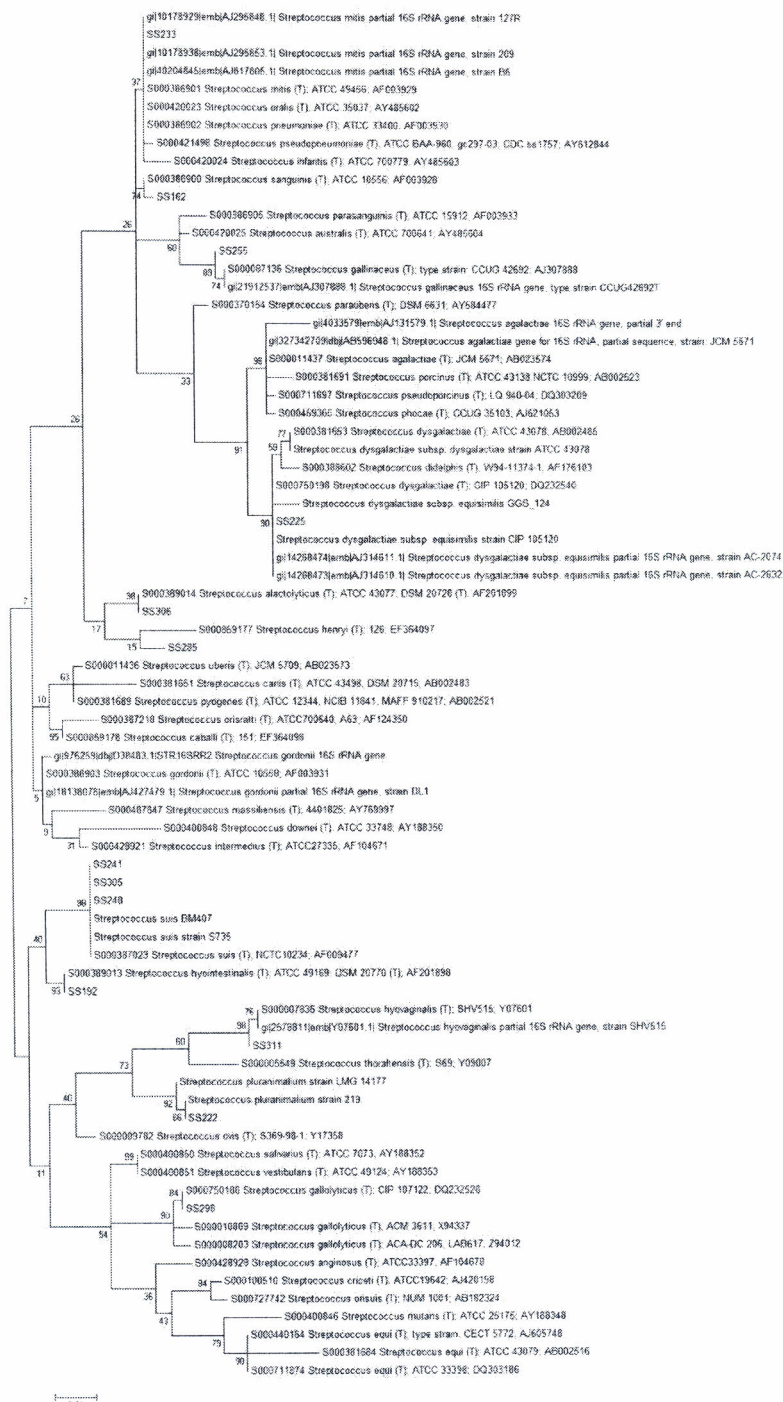


Fonte: (CABRERA MATAJIRA, 2015)

### 4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A confirmação da identificação das diferentes espécies de *Streptococcus* foi realizada mediante a análise do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, sendo avaliados pelo menos um isolado para cada espécie identificada. Pode-se observar na figura 3 que houve concordância de todas as identificações obtidas pelo MALDI-TOF MS. As estirpes que apresentaram resultado positivo na PCR (banda de 688 pb) foram identificadas como *S. suis* pelo sequenciamento, em concordância com os resultados de identificação pelo MALDI-TOF MS.

Figura 3 – Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as espécies de *Streptococcus* com base sequenciamento parcial do gene 16S rRNA Os valores de *bootstrap* apresentados nos ramos correspondentes foram avaliados a partir de 500 réplicas



Fonte: (CABRERA MATAJIRA, 2015)

## 5 DISCUSSÃO

*Streptococcus suis* é uma bactéria patogénica que está amplamente disseminada no mundo afetando diretamente a produção de suínos. Para a identificação de *S. suis* são utilizados métodos microbiológicos tradicionais como cultivo e isolamento em ágar sangue, coloração de Gram e testes bioquímicos. Uma alta porcentagem de bactérias do gênero *Streptococcus* que infectam a espécie suína não é identificada pelos métodos convencionais e frequentemente são reportadas como *Streptococcus* spp. O uso de provas bioquímicas complexas baseadas em testes automatizados ou miniaturizados dificilmente estão acessíveis aos laboratórios veterinários e geralmente apresentam altos custos. O emprego das provas moleculares tem permitido uma classificação mais ampla das diferentes espécies que podem estar presentes em suínos e outros animais, no entanto, para a completa identificação das espécies do gênero é necessário utilizar o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

Neste estudo foram avaliados 250 estirpes do gênero *Streptococcus* pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia do Departamento Medicina Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A identificação pela PCR para a espécie *S. suis*, pelo MALDI-TOF MS e pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA apresentaram 100% de concordância. O resultado obtido foi de 86% das estirpes identificadas como *S. suis* (215/250) e 14% dos estirpes (35/250) foram identificados como outras espécies, entre elas *S. hyovaginalis*, *S. oralis*, *S. hyointestinalis*, *S. sanguinis*, *S. henryi*, *S. alactolyticus*, *S. plurianimalium*, *S. dysgalactiae*, *S. gallinaceus*, *S. gordonii*, *S. gallolyticus* e *S. mitis*.

Estudos utilizando a técnica de MALDI-TOF MS na identificação de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa em comparação com resultados de testes bioquímicos relataram 100% de concordância entre os resultados na identificação do gênero e espécie (BARREIRO et al., 2010). Os resultados do MALDI-TOF MS foram confirmados com o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, confirmando assim sua

eficácia do MALDI-TOF MS. Um dos pontos determinantes na utilização do MALDI-TOF MS para a identificação bacteriana é a existência de bancos de dados de espectros proteicos de referência.

Xiao et al. (2013) avaliaram bactérias do gênero *Streptococcus* pela técnica de MALDI-TOF MS e descrevem 99% das estirpes positivas para gênero *Streptococcus* e 90,1% de identificação positiva para espécie. Uma vez que se construa uma base de dados com maior número de espectros proteicos de referência é possível identificar um maior número de estirpes analisadas.

O MALDI-TOF MS se mostrou uma metodologia de alta eficácia e especificidade para a identificação de diferentes espécies de *Streptococcus* em suínos. Todas as estirpes foram confirmadas com o sequenciamento de 16S rRNA e/ou PCR, comprovando a eficácia da técnica.

Outras vantagens do uso do MALDI-TOF MS são o tempo para identificação da amostra, necessidade de pequena quantidade de material biológico, baixo custo por amostra, baixa produção de resíduos químicos ou biológicos. As limitações são poucas; a principal é o elevado custo do equipamento e outra facilmente sanável é a dependência de banco de dados de padrões proteicos. No entanto, pode-se ampliar a base de dados alimentando o programa do equipamento com perfis proteicos de bactérias previamente identificadas por técnicas de tradicionais ou moleculares.

Dentre as estirpes analisadas no presente estudo foi possível verificar o predomínio de *S. suis* no sistema nervoso central 46,8%(117/250), seguido pelo sistema respiratório 32,8 %(82/250). Foram também identificadas outras espécies de *Streptococcus*, que não são comumente associadas com infecções em suínos.

*Streptococcus hyointestinalis* é uma bactéria que faz parte da microbiota intestinal do suíno (DEVRIESE; KILPPER-BALZ; SCHLEIFER, 1988). No presente estudo, foram identificados 2% das estirpes de *S. hyointestinalis* (5/250) no sistema respiratório (pulmões).

Outra espécie encontrada no pulmão de suínos doentes foi *S. sanguinis*. Esta espécie normalmente habita a cavidade oral de mamíferos, contudo há estudos

descrevendo este agente em abscessos pulmonares de humanos (JERNG et al., 1997), e relatos de pneumonia e fibroses pulmonar em ratos de laboratório (KAZAZ et al., 2000).

A espécie *S. alactolicus* também foi identificada no sistema respiratório dos suínos examinados embora o agente faça parte da microbiota intestinal do suíno (GOBBETTI; CALASSO, 2014). Toepfner et al. (2014) descrevem isolamento desta espécie bacteriana a partir de suabe traqueal de um paciente humano com septicemia.

A espécie *Streptococcus mitis* identificada em 0,2% das estirpes (1/250), foi descrita em humanos que apresentaram pneumonia, causando também endocardite e septicemia (MÁRQUEZ et al., 1997). Esta espécie é habitante normal da região de orofaringe, mucosa da boca e língua de animais (MARCANTONI, 2009) e possivelmente pode infectar o sistema respiratório inferior provocando pneumonia.

*Streptococcus henryi* também foi identificado no presente estudo, sendo um isolado de pulmão e duas estirpes de pericardite. Esta espécie foi descrita pela primeira vez de um caso laminite em equino, apesar de pertencer à microbiota de pele e trato digestivo, principalmente no cólon (MILINOVICH et al., 2008).

*S. oralis* foi identificado em 0,4% das estirpes (2/250), o agente pertence a microbiota dos mamíferos, sendo encontrado na cavidade oral de hospedeiros saudáveis (MARCANTONI, 2009). Quando o agente encontra ambiente favorável para expressar seus fatores de virulência e tornar-se patogênico, é possível encontrá-lo no SNC. Trabalhos realizados em humanos com abscesso em tecido cerebral e meningite, confirmam a participação primária de *S. oralis* como causador da doença (COLVILLE al., 1993; SOLANKI et al., 2014; THIAGARAJAN et al., 2015 No prelo<sup>1</sup>).

*S. plurianimalium* foi identificado em 2% das estirpes (5/250). Duas estirpes foram isoladas no SNC e três em lesão de pele e cavidade abdominal. Esta espécie é descrita em diversos animais, e está presente em diferentes partes do organismo como: amígdalas, trato geniturinário e trato respiratório (GOBBETTI; CALASSO, 2014).

---

<sup>1</sup> THIAGARAJAN, S.; KRISHNAMURTHY, S.; RAGHAVAN, R.; MAHADEVAN, S.; MADHUGIRI, V.; SISTLA, S. *Streptococcus oralis* cerebral abscess following monkey bite in a 2-month-old infant. **Paediatrics And International Child Health**, doi: 2046905515Y.000, 2015.



Aryasinghe et al. (2014) registraram um caso de infecção humana que apresentou meningite causada por esta bactéria.

*S. gallolyticus* foi identificado em 0,8% das estirpes (4/250) e faz parte da microbiota intestinal do suíno e de outros animais, todavia há descrições desta bactéria como causadora de endocardites, meningite e septicemia em humanos (VÉLEZ et al., 2013).

*S. gordonii* foi identificado em 0,4% das estirpes (1/250), em SNC e é relatado como habitante da cavidade oral de mamíferos (LOO; CORLISS; GANESHKUMAR, 2000).

*S. hyovaginalis* representou 2% das estirpes (5/250), sendo quatro estirpes de SNC e uma em articulação. A espécie é descrita como habitante normal do trato geniturinário em suínos e isolado principalmente de descargas vaginais (DEVRIESE et al., 1997).

A espécie *S. dysgalactiae* representou 1,2% das estirpes (3/250), as três provenientes de amostras coletadas de animais que apresentaram artrite. Esta espécie de *Streptococcus* é habitante da boca, orofaringe, pele, sistemas gastrointestinal e geniturinário. Considerado oportunista, é capaz de causar diferentes doenças como: endocardites, linfadenites, artrites, infecções na pele e orofaringe. Descrições de infecções em várias espécies animais como de suínos, bezerros e até em humanos mostraram a capacidade patogênica para causar doença em diversos tecidos (KAWATA et al., 2003; MERYEM et al., 2013; JANDA, 2014; RUTHERFORD; JECKEL; RIDLER, 2015).

Além de possibilitar a identificação de espécies pela comparação com o banco de dados, os espectros proteicos capturados apresentaram diferenças também na análise de agrupamento. A análise de agrupamento dos espectros proteicos obtidos pelo MALDI-TOF MS resultou no agrupamento dos estirpes segundo as respectivas espécies identificadas. Apesar dos estirpes de *S. suis* comporem o maior grupo de espectros, 8 estirpes desta espécie ficaram separados em três agrupamentos distintos. Já que estes apresentaram alto valor de escore para a identificação de gênero e espécie pelo MALDI-

TOF MS, seu distanciamento no dendrograma possivelmente está relacionado a variações espectrais.

De forma semelhante, Wang et al. (2012) analisaram estirpes de *Streptococcus pyogenes* pela técnica de MALDI-TOF MS e observaram que, além de identificar a espécie, havia o agrupamento de espectros proteicos dos diferentes estirpes de *S. pyogenes* que possuíam diferentes tipos de uma proteína relacionada com um fator de virulência (proteína M). Dessa forma, a técnica também possibilitava a distinção dos estirpes em grupos com um mesmo tipo de proteína. É provável que os estirpes de *S. suis* do presente estudo não foram agrupadas por apresentarem uma pequena diferença proteica que pode estar relacionada com a distinção de característica da mesma espécie, por exemplo, sorotipos e fatores de virulência.

O agrupamento composto pelas espécies *Streptococcus gordonii*, *S. oralis* e *S. mitis* também se destaca. Inicialmente, essas espécies faziam parte do grupo *Streptococcus viridans*, composto também por *S. sanguinis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. anginosus* e *S. bovis*. O agrupamento *S. viridans* era fundamentado em características bioquímicas em comum entre as distintas espécies. A partir da análise de sequenciamento dos genes *rpoB*, *tuf*, *sodA* e 16S rRNA, foi possível a completa diferenciação das espécies e o estabelecimento de uma nova classificação, originando o grupo *mitis-sanguinis* composto pelas espécies *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. sanguinis* (JANDA, 2014).

Dessa forma, o agrupamento observado no dendrograma de distância dos espectros é condizente com a similaridade genética das espécies *S. gordonii*, *S. oralis* e *S. mitis*. Além disso, *S. sanguinis*, que também compõe o grupo *mitis-sanguinis*, além de formar um agrupamento próprio de espectros da mesma espécie, apresenta maior proximidade e similaridade com o grupo *S. gordonii-S. oralis-S. mitis* (Figura 2). A similaridade entre essas espécies também pode ser observada na árvore filogenética da sequência parcial do 16S rRNA (Figura 3). De forma semelhante, a proximidade dos espectros de *S. plurianimalium* e *S. hyovaginalis* é observada na análise de agrupamento e mantida tanto na PCA quanto na análise filogenética.

Para confirmar os resultados de identificação do MALD-TOF que mostraram

espécies diferentes ao *S. suis* foi feito o sequenciamento parcial de 16S rRNA de um representante de cada espécie diferente identificada no trabalho. Foi observada concordância de todas as identificações para gênero e espécie em ambas as técnicas. O primer utilizado neste trabalho amplifica o gene *gdh* (*Glutamate dehydrogenase*) designando os primers JP4 e JP5 (OKWUMABUA; O'CONNOR; SHULL, 2003). Observou-se no estudo realizado a amplificação em algumas ocasiões de bandas inespecíficas para diferentes espécies de bactérias do gênero *Streptococcus*. Outros estudos feitos de identificação de *Streptococcus suis*, o primer mostrou amplificação de bandas para espécies além de *S. suis* como o *Streptococcus gallolyticus* (GOYETTE-DESJARDINS et al., 2014).

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que *Streptococcus suis* foi a espécie mais frequente em suínos apresentando quadros encefalite, artrite, pneumonia, metrite, infecção urinária ou septicemia, no entanto, foi possível identificar 12 espécies diferentes deste gênero presentes em diferentes tecidos em 14% dos casos. A identificação destas espécies não é realizada normalmente nos laboratórios de diagnóstico ou de pesquisa por diversos motivos já discutidos. A utilização de métodos moleculares como PCR ou sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e mais recentemente de métodos baseados no espectros proteicos como o MALDI-TOF MS permitirá a ampliação do conhecimento dos profissionais da área sobre a importância destes agentes e poderá refletir em melhores medidas de tratamento e prevenção destas infecções em animais de produção. Algumas das espécies identificadas representam ainda potencial risco zoonótico para os profissionais que atuam em suinocultura ou na produção e manipulação de carne suína.

## 6 CONCLUSÕES

- A espécie *Streptococcus suis* foi a mais frequente em suínos com quadro de encefalite, artrite, pneumonia, metrite, infecção urinária ou septicemia.
- Todas as estirpes de *Streptococcus suis* foram identificadas corretamente pela PCR.
- O MALDI-TOF MS identificou todas as estirpes do gênero *Streptococcus* avaliadas no presente estudo.
- O MALDI-TOF MS apresentou 100% de concordância com o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e com a PCR.
- As análises de agrupamento e PCA diferenciaram as espécies de acordo com o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e com a PCR.

## REFERENCIAS

AMASS, S. F. Review of the Literature: Streptococcus suis infections of people. **Journal of Agromedicine**, v. 5, n. 1, p. 25 – 34, 1998.

ARENDS, J. P.; ZANEN, H. C. Meningitis caused by Streptococcus suis in humans. **Reviews Of Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 131-137, 1988.

ARYASINGHE, L.; SABBAR, S.; KAZIM, Y.; AWAN, L. M.; KHAN, H. K. N. Streptococcus pluranimalium: A novel human pathogen? **International Journal of Surgery Case Reports**, v. 5, n. 12, p. 1242–1246, 2014.

BERTHELOT-HÉRAULT, F.; MORVAN, H.; KÉRIBIN, A. M.; GOTTSCHALK, M.; KOBISCH, M. Production of Muraminidase-Released Protein (MRP), Extracellular Factor (EF) and Suilysin by field isolates of Streptococcus suis capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. **Veterinary Research**, v. 31, n. 5, p. 473–479, 2000.

BISWAS, S.; ROLAIN, J. M. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. **Journal of Microbiological Methods**, v. 92, n. 1, p. 14–24, 2013.

BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 11, p. 1614–1619, 2010.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990.

BARREIRO, J. R. **Identificação de patógenos causadores de mastite subclínica por espectrometria de massas**. 2010. 75 f. Tese (mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; DAY, N.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J. L.; FERRONI, A.; GUTMANN, L.; NASSIF, X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 104–109, 2011.

CHENG, A.F.; KHIN-THI-OO.; LI, E.K.; FRENCH, G.L. Septic arthritis caused by *Streptococcus suis* serotype 2. **Journal of Infection**, v. 14, n.3, p. 237-241, 1987.

COLVILLE, A.; DAVIES, W.; HENEGHAN, M.; GOODWIN, A.; GRIFFITHS, T. A rare complication of dental treatment: *Streptococcus oralis* meningitis. **British Dental Journal**, v. 175, n. 4, p.133-134.1993.

DE CAROLIS, E.; VELLA, A.; VACCARO, L.; TORELLI, R.; SPANU, T.; FIORI, B.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **Journal of Infection In Developing Countries**, v. 8, n. 9, p.1081-1088, 2014.

DE MOOR, C. E. Septicaemic infections in pigs, caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R, S and T. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 29, n. 1, p. 272–280, 1963.

DE OLIVEIRA, S. J. **Guia bacteriológico pratico**: bactérias gram-positivas de interesse em veterinária: *Streptococcus*. 3. ed. Canoas:Ulbra, 2012. p. 77 - 82

DEE, S. A; COREY, M. M. The survival of *Streptococcus suis* on farm and veterinary equipment. **Journal of Swine Health and Production**, v. 1, n. 1, p. 17 – 20, 1993.

DEVRIESE, L. A.; KILPPER-BALZ, R.; SCHLEIFER, K. H. *Streptococcus hyointestinalis* sp. nov. from the Gut of Swine. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38 p. 440-441, 1988.

DEVRIESE, L.A.; HOMMEZ, J.; POT, B.; HAESEBROUCK, F. Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs, **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 1, p. 31-36,1994.

DEVRIESE, L. A.; POT, B.; VANDAMME, P.; KERSTERS, K.; COLLINS, M. D.; ALVAREZ, N.; HAESEBROUCK, F.; HOMMEZ, J. *Streptococcus hyovaginalis* sp. nov.

and *Streptococcus thoraltensis* sp. nov., from the genital tract of sows. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1073–1077, 1997.

DEVRIESE, L. A.; SUSTRONCK, B.; MAENHOUT, T.; HAESEBROUCK, F.  
*Streptococcus suis* meningitis in a horse. **Veterinary Record**, v. 127 n. 3, p. 68, 1990.

ELMER, W.; KONEMAN; ALLEN, S. **Diagnostico microbiologico: cocos gram-positivos parte II: estreptococcus, enterococos y bacterias “similares a estreptococcus”**, 6. ed. Buenos Aires: Edital Medica Panamericana S.A. 2008. Cap. 13, 639-727 p.

FACKLAM, R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 613–630, 2002.

FACKLAM, R.; ELLIOT, J. A. Identification, classification, and clinical relevance of catalase negative, gram positive Cocci, excluding the Streptococci and Enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 479–495, 1995.

FALCÓN, L.; VALERA, A. Extracción de acidos nucleicos , **in**: EGUIARTE, L. E. **Ecologia molecular**:ciudad de Mexico: Instituto Nacional de Ecología, 2007. Cap. 16, p. 499-516.

FENG, Y.; ZHANG, H.; WU, Z; WANG, S.; CAO, M.; HU, D.; WANG, C. *Streptococcus suis*infection: an emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases?. **Virulence**, v. 5, n. 4, p. 477-497 2014. Disponivel em: <10.4161/viru.28595>. Acesso em: 14 maio 2015.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach.**Journal of Molecular Evolution**, v. 17, p. 368–376, 1981.

GOBBETTI, M.; CALASSO, M.; *Streptococcus*. In: BATT, C. A. **Encyclopedia of food microbiology**. 2. ed. New York: Academic Press, 2014. p. 535-553.

GOTTSCHALK, M.; HIGGINS, R.; BOUDREAU, M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2192–2194, 1993.

GOTTSCHALK, M.; HIGGINS, M.; JACQUES, M.; BEAUDAIN, M.; HENRICHSEN, J. Characterization of six new capsular types (23–28) of *Streptococcus suis* J. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 11, p. 2590–2594, 1991.

GOTTSCHALK, M.; HIGGINS, R.; JACQUES, M.; MITTAL, K. R.; HENRICHSEN, J. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 12, p. 2633–2636, 1989.

GOTTSCHALK, M.; SEGURA, M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: The unresolved questions. **Veterinary Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 259–272, 2000.

GOTTSCHALK, M.; SEGURA, M.; XU, J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. **Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 8, n. 1, p. 29–45, 2007.

GOYETTE-DESJARDINS, G.; AUGER, J.-P.; XU, J.; SEGURA, M.; GOTTSCHALK, M. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. **Emerging Microbes & Infections**, v. 3, n. 6, p. e45, 2014.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. v.41 p. 95-98, 1999.

HELLER, D. N.; COTTER, R. J.; FENSELAU, C.; UY, O. M. Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. **Analytical Chemistry**. v. 59, n. 23, p. 2806–2809, 1988.

HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1995. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 37, n. 4, p. 242, 1996.

HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 2000. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 42, n. 3, p. 223, 2001.



HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M. Streptococcal diseases, In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J.; WILEY, J. **Diseases of swine**. 9. ed. Iowa: Wiley, 2006. Cap. 37, p. 769- 784.

HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M.; BEAUDOIN, M.; RAWLUK, S. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in Quebec and Western Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v.33, n.1, p.27-30, 1992.

HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M.; BOUDREAU, M.; LEBRUN, a; HENRICHSEN, J. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. **Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 3, p. 405–406, 1995.

HILL, J. E.; GOTTSCHALK, M.; BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; HEMMINGSEN, S. M.; GOH, S. H. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. **Veterinary Microbiology**, v. 107, n. 1-2, p. 63–69, 2005.

HUONG, V. T. L.; HA, N.; HUY, N. T.; HORBY, P.; NGHIA, H. D. T.; THIEM, V. D.; ZHU, X.; HOA, N. T.; HIEN, T. T.; ZAMORA, J.; SCHULTSZ, C.; WERTHEIM, H. F. L.; HIRAYAMA, K. Epidemiology, clinical manifestations, and outcomes of streptococcus suis infection in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 1105–1114, 2014.

JANDA, W. M. The genus *Streptococcus* – Part I: Emerging pathogens in the “Pyogenic Cocci” and the “*Streptococcus bovis*” groups. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 36, n. 20, p. 157–166, 2014.

JERNG, J.; HSUEH, P.; TENG, L.; LEE, L.; YANG, P.; LUH, K. Empyema thoracic and lung abscess caused by Viridans Streptococci. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, p. 1508–1514, 1997.

KARAS, M.; BACHMANN, D.; HILLENKAMP, F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 2935, 1985.

KAWATA, K.; MINAKAMI, T.; MORI, Y.; KATSUMI, M.; KATAOKA, Y.; EZAWA, A.; KIKUCHI, N.; TAKAHASHI, T. rDNA sequence analyses of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates from pigs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1941–1946, 2003.

KAZAZ, J. A.; HOROWITZ, S.; XU, J.; KHULLAR, P.; NIEDERMAN, M. S.; FEIN, A. M.; ZAKERI, Z.; LIN, L.; RHODES, G. C. Differential patterns of apoptosis in resolving and nonresolving bacterial pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 6, p. 2043–2050, 2000.

KILPPER-BALZ, R.; SCHLEIFER, K. H. *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 2, p. 160–162, 1987.

KLIEM, M.; SAUER, S. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 397–402, 2012.

LOO, C. Y.; CORLISS, D. A.; GANESHKUMAR, N. *Streptococcus gordonii* Biofilm Formation: Identification of Genes that Code for Biofilm Phenotypes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 5, p.1374–1382, 2000.

LUN, Z. R.; WANG, Q. P.; CHEN, X. G.; LI, A. X.; ZHU, X. Q. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 201–209, 2007.

MARCANTONI, M. Ecología de la cavidad bucal. In: NEGRONI, M. **Microbiología estomatológica**. 2. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2009. p. 225-246.

MAI, N. T.; HOA, N. T.; NGA, T. V.; LINH, L. E. D.; CHAU, T. T.; SINH, D. X.; PHU, N. H.; CHUONG, L. V.; DIEP, T. S.; CAMPBELL, J.; NGHIA, H. D.; MINH, T. N.; CHAU, N. V.; DE JONG, M. D.; CHINH, N. T.; HIEN, T. T.; FARRAR, J.; SCHULTSZ, C. *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 5, p. 659-667, 2008.

MÁRQUEZ LORENTE, M. A.; FLORES, MENESES, L.; CARRATALÁ, BLASCO, C.; MÍNGUEZ, M. S.; GARCÉS, J. M. Mitral endocarditis secondary to *Streptococcus mitis* bacteremic pneumonia. **Anales de Medicina Interna**, v. 14, n. 1, p. 31-32, 1997.

MAURER, H.; WINKLER, H. U.; ANHALT, J. P. Identification of Bacteria Using Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 500, n. 2, p. 219–225, 1975.

MERYEM, I.; KEREM, B.; HASAN, C.; AKKOYUNLU, Y. *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies *Equisimilis*; An Agent Rarely Encountered in the Etiology of Septic Arthritis. **Jundishapur Journal Of Microbiology**, v. 6, n. 7, p. 10–12, 2013.

MILINOVICH, G. J.; BURRELL, P. C.; POLLITT, C. C.; BOUVET, A.; TROTT, D. J. *Streptococcus henryi* sp. nov. and *Streptococcus caballi* sp. nov., isolated from the hindgut of horses with oligofructose-induced laminitis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 262–266, 2008.

NAGY, E.; MAIER, T.; URBAN, E.; TERHES, G.; KOSTRZEWA, M.; NORD, C. E.; HEDBERG, M.; KÖNÖNEN, E.; DUBREUIL, L.; DOSA, E.; KALENIC, S.; PIÉRARD, D.; DEGENER, J.; WILDEBOER-VELOO, A.; CHMELAROVA, E.; MAZZARIOL, A.; GÜRLER, N.; GÜNER, S.; PAPAPARAKEVAS, J.; VILLA, J. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 8, p. 796–802, 2009.

O'SULLIVAN, T.; FRIENDSHIP, R.; BLACKWELL, T.; PEARL, D.; MCEWEN, B.; CARMAN, S.; SLAVIĆ, D.; DEWEY, C. Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 75, n. 2, p. 106–111, 2011.

OKWUMABUA, O.; O'CONNOR, M.; SHULL, E. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. **FEMS Microbiol Lett**, v. 218, n. 1, p. 79–84, 2003.

PERCH, B.; PEDERSEN, K. B.; HENRICHSEN, J. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: Six new serotypes of *Streptococcus suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 993–996, 1983.

PRIETO, C.; GARCÍA, F.J.; SUÁREZ, P.; IMÁZ, M.; CASTRO, J. M. Biochemical traits and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughtered pigs. **Zentralbl Veterinarmed B. Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 41, n. 9, p. 608–617, 1994.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**: estreptococos. Sao Paulo: Armert, 2002. Cap 9, p. 61–69.

ROSENBAACH, F. J. **Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen**: eiter und abscessbildung. Göttingen: Von J. F. Bergmann, 1884. Cap. 2, p. 06-25.

ROBERTSON, I. D.; BLACKMORE, D. K. Occupational exposure to *Streptococcus suis* type 2. **Epidemiology and Infection**, v. 103, n. 1, p. 157–164, 1989.

RUTHERFORD, S.-J.; JECKEL, S.; RIDLER, A. Characteristics of sheep flocks affected by *Streptococcus dysgalactiae* arthritis. **Veterinary Record**, v. 176, n. 17, p. 435–435, 2015.

SILVA, L. M. G.; BAUMS, C. G.; REHM, T.; WISSELINK, H. J.; GOETHE, R.; VALENTIN-WEIGAND, P. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1-3, p. 117–127, 2006.

SOLANKI, R.; SUBRAMANIAN, S.; LAKSHMI, V.; BHUSHANAM, V.; KUMAR, A. Brain abscess due to *Streptococcus oralis* in an immunocompetent patient. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v. 32, n. 2, p. 179-180, 2014.

STAATS, J. J.; FEDER, I.; OKWUMABUA, O.; CHENGAPPA, M. M. *Streptococcus suis*: Past and present. **Veterinary Research Communications**, v. 21, n. 6, p. 381–407, 1997.

STANOJKOVIC, A.; PETROVIC, M. M.; SKRBIC, Z.; MANDIC, V.; STANISIC, N.; GOGIC, M.; STANOJKOVIC-SEBIC, A. Biochemical characteristics of *Streptococcus suis* strains isolated from healthy and deceased pigs. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 30, n. 4, p. 699–704, 2014.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. **Molecular Biology and Evolution**. v. 9, p. 678-687, 1992.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology And Evolution**. v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TANAKA, K.; WAKI H.; IDO Y.; AKITA S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T. Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry Rapid Commun. **Journal Of Mass Spectrometry**. v. 2, n. 8, p.151-153,1988.

TARRADAS, C.; ARENAS, A.; MALDONADO, A.; LUQUE, I.; MIRANDA, A.; PEREA, A. Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine: Proposal for biochemical parameters. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 578–580, 1994.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W. improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**,v. 22,p. 4673-4680,1994.

TIEN, L. H. T.; NISHIBORI, T.; NISHITANI, Y.; NOMOTO, R.; OSAWA, R. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22, 26, and 33 based on DNA-DNA homology and *sodA* and *recN* phylogenies. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2-4, p. 842–849, 2013.

TOEPFNER, N.; SHETTY, S.; KUNZE, M.; ORLOWSKA-VOLK, M.; KRÜGER, M.; BERNER, R.; HENTSCHEL, R. Fulminant neonatal sepsis due to *Streptococcus alactolyticus* -A case report and review. **Apmis**, v. 122, n. 7, p. 654–656, 2014.

TON-HADLEY, F. a. Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. **Veterinary Research Communications**, v. 8, n. 3, p. 217–227, 1984.

TWOMEY, D. F.; CARSON, T.; FOSTER, G.; KOYLASS, M. S.; WHATMORE, A. M. Phenotypic characterisation and 16S rRNA sequence analysis of veterinary isolates of *Streptococcus pluranimalium*. **Veterinary Journal**, v. 192, n. 2, p. 236–238, 2012.

VÉLEZ BALESTRO, L. M.; BARONI, M. R.; OCHOTECO, M. C.; ZURBRIGGEN, M. L.; VIRGOLINI, S. M. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* isolated from cerebrospinal fluid in a pediatric patient. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 45, n. 4, p. 254-256, 2013.

WANG, J.; ZHOU, N.; XU, B.; HAO, H.; KANG, L.; ZHENG, Y.; JIANG, Y.; JIANG, H. Identification and cluster analysis of *Streptococcus pyogenes* by MALDI-TOF mass spectrometry. **Plos One**, v. 7, n. 11, p.1-8, 2012.

WANGKAEW, S.; CHAIWARITH, R.; THARAVICHITKUL, P.; SUPPARATPINYO, K. Streptococcus suis infection: a series of 41 cases from Chiang Mai University Hospital. **Journal of Infection**, v. 52, n. 6, p. 455–460, 2006.

WEI, Z.; LI, R.; ZHANG, A.; HE, H.; HUA, Y.; XIA, J.; CAI, X.; CHEN, H.; JIN, M. Characterization of Streptococcus suis isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1-2, p. 196–201, 2009.

WILLIAMS, A. E.; BLAKEMORE, W. F.; ALEXANDER, T. J. A murine model of Streptococcus suis type 2 meningitis in the pig. **Research In Veterinary Science**. v. 45, n. 3, p. 394-399, 1988.

WISSELINK, H. J.; SMITH, H. E.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; PEPPERKAMP, K.; VECHT, U. 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. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 237–248, 2000.

XIAO, D.; YOU, Y.; BI, Z.; WANG, H.; ZHANG, Y.; HU, B.; SONG, Y.; ZHANG, H.; KOU, Z.; YAN, X.; ZHANG, M.; JIN, L.; JIANG, X.; SU, P.; BI, Z.; LUO, F.; ZHANG, J. MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of group A Streptococcus isolated from areas of the 2011 scarlet fever outbreak in china. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 14, n. 1, p. 320–326, 2013.

ZANEN, H. C.; ENGEL, H.; W. B. Porcine streptococci causing meningitis and septicaemia in man. **The Lancet**, v. 1, n. 7919, p.1286-1288, 1975.