

CARLOS EMILIO CABRERA MATAJIRA

**Análise comparativa de genomas de estirpes de *Streptococcus suis*
isoladas de suínos no Brasil**

São Paulo
2019

CARLOS EMILIO CABRERA MATAJIRA

Análise comparativa de genomas de estirpes de *Streptococcus suis* isoladas de suínos
no Brasil

Tese 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 Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde ANimal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Ass. Andrea Micke Moreno

São Paulo
2019

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3889
FMVZ

Cabrera Matajira, Carlos Emilio
Análise comparativa de genomas de estirpes de *Streptococcus suis* isoladas de suínos no Brasil / Carlos Emilio Cabrera Matajira. – 2019.
108 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2020.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

Coorientadora: Dra. Luisa Zanolli Moreno.

1. Perfil de resistência aos antimicrobianos. 2. Sequenciamento de genoma. 3. Genotipagem molecular. 4. Sorotipagem. 5. Perfil de virulência. I. Título.



Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Andrea Micke Moreno

Área: Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses

Equipe envolvida: Carlos Emílio Cabrera Matajira - *executor* (fmvz-usp); Andrea Micke Moreno (orientador)

Título do projeto: "Análise comparativa de genomas de estirpes de *Streptococcus suis* isoladas de suínos no Brasil".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

O presente estudo tem os seguintes objetivos:

1. Caracterizar as estirpes de *Streptococcus suis* em relação ao sorotipo através da PCR;
2. Caracterizar o perfil de resistência aos antimicrobianos das estirpes de *Streptococcus suis*;
3. Avaliar a variabilidade genética dos isolados através da eletroforese em campo pulsado (PFGE);
4. Selecionar, a partir dos dados obtidos, um grupo de estirpes que será submetido ao sequenciamento do genoma;
5. Analisar nos genomas sequenciados: os diferentes STs (MLST), a presença de genes de virulência e resistência descritos nesta espécie bacteriana, comparação dos genomas brasileiros com os estrangeiros previamente descritos;
6. Confrontar os dados obtidos através da caracterização fenotípica e genotípica das cepas.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 14/04/2016, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traidi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CABRERA MATAJIRA, Carlos Emilio

Título: Análise comparativa de genomas de estirpes de *Streptococcus suis* isoladas de suínos no Brasil

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus e a virgem por todas as bênçãos durante este período do Doutorado.

Aos meus pais Maria Teresa Matajira e Hermes Cabrera, pelo apoio durante toda minha vida.

À Prof. Dra. Andrea Micke Moreno, pela confiança, por me aceitar como seu aluno e ter me acolhido desde que iniciei meus estudos, pelo constante apoio durante este período da minha vida e pela orientação como excelente professora e pessoa.

A Luísa Moreno por me co-orientar, me ensinar tantas coisas, dar sua amizade e apoiar durante todo o tempo desta fase.

A todos os amigos e colegas que fiz no Laboratório de Sanidade Suína e Virologia desde que cheguei ao Brasil: 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, Ana Paula Santos da Silva, Rosi Andrade, Alexandre Sanches, dona Rose, André Pegoraro, Jéssica Moreira, Matheus Saliba, Andressa Dalmutt, Beatriz Parra, Carol Oliveira, Barbara Peres e Luana Cristina.

A Universidade de São Paulo e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP) por me abrir suas portas.

Ao Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal (VPS). A todos os professores, pós-graduandos e funcionários que fizeram parte deste caminho.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2015/26159-1, pela bolsa que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho e me deu as ferramentas para ser um melhor profissional.

Aos meus amigos Jason Ardila, Nicolás Cardenas, Néelson Santana, Sandy Pulecio, Eliana Galindo e Heidy Martinez pelo apoio de perto.

Aos integrantes da minha família Julio Cesar Cabrera, Sonia Orduz, Diego Julian Cabrera, Diana Sandoval, Marta Oviedo e aos meus amigos que estão na Colômbia, Cesar Delgado, Fredy Ochoa, Fredy Sandoval, Jhon Arenales, Carlos Guecha, Edwin Rodriguez, Sergio Ayala, Ferney Manrique, Jose Luis Rincon, Jesus Suarez, Pedro Salazar e Luis Jaimes pelo apoio de longe.

RESUMO

CABRERA MATAJIRA, C. E. **Análise comparativa de genomas de estirpes de *Streptococcus suis* isoladas de suínos no Brasil** [Comparative genome analysis of *Streptococcus suis* strains isolated from swine in Brazil]. 2019. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Streptococcus suis é um patógeno de grande importância na indústria suína sendo capaz de provocar diferentes quadros clínicos em animais de várias idades e, além disso, também é considerado um agente zoonótico. Dessa forma, é de extrema importância a caracterização das estirpes que causam doença em suínos no Brasil. Os objetivos deste estudo foram a caracterização fenotípica e genotípica de 215 estirpes de *S. suis* isoladas entre os anos de 2001 e 2016, de suínos com sinais clínicos de infecção, provenientes de diferentes Estados do Brasil. Para tanto, as estirpes isoladas neste período e mantidas a -86C foram reativadas e submetidas à confirmação da identificação por PCR e espectrometria de massa MALDI-TOF. Em seguida, foi realizada sorotipagem molecular e a identificação de genes de virulência pela PCR, e a foi realizada a genotipagem pelas técnicas de AFLP e PFGE. Para a identificação dos perfis de resistência aos antimicrobianos foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, obtendo os valores de concentração inibitória mínima (CIM). A partir dos resultados fenotípicos e genotípicos foram selecionadas 24 estirpes para o sequenciamento do genoma utilizando a plataforma Illumina® MiSeq. O sorotipo mais frequentemente identificado foi o 2 / ½ (82,8%); seguido em menor proporção pelos sorotipos 3, 4, 6, 7, 8, 9, 18, 27, 28, 1 / 14, sendo apenas seis estirpes não tipáveis (NT). Para caracterização do perfil de virulência foram avaliados quatro genes *sly*, *arcA*, *epf* e as variantes de *mrp* sendo identificados 11 perfis de virulência nas estirpes estudadas. A genotipagem por AFLP identificou 30 perfis genotípicos e a técnica de PFGE identificou 64 pulsotipos. Para ambas as técnicas não foi identificada uma correlação clara entre dados epidemiológicos e genotípicos, mas pode-se observar uma tendência de agrupamento das estirpes por ano de isolamento. A partir dos resultados de CIM foram identificados nove perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos com

72,1% das estirpes classificadas como multirresistentes. Foram detectadas altas taxas de resistência às tetraciclina, macrolídeos, clindamicina e sulfadimetoxina, enquanto beta-lactâmicos e florfenicol foram os antimicrobianos mais eficazes. A partir da análise genômica não foram detectados marcadores de plasmídeos e apenas três genes de resistência foram identificados nos genomas brasileiros; destaca-se o gene *ermB*, que codifica resistência à macrolídeos e lincosamidas, que foi detectado em 79,2% das estirpes estudadas. Foram identificadas oito novas sequências de alelos na MLST e uma nova combinação alélica, de tal forma que foram identificadas seis novas sequências tipo (STs) dentre os 24 genomas analisados. A partir do mapeamento das nove estirpes do sorotipo 2 foi identificado um elemento genético móvel (CMGETZ080501), relacionado à resistência aos antimicrobianos, em sete destas; as duas estirpes Brasileiras do sorotipo 2 que se diferenciam das demais (45 e 47) foram as mais sensíveis. Em relação às cinco estirpes do sorotipo 3, foi observado no mapeamento que duas destas se distanciam das demais e apresentam maior similaridade ao genoma da referência do sorotipo 4. Este resultado também foi verificado tanto na *wgSNP* quanto na análise da MLST, confirmando que a caracterização capsular de *S. suis* não deve ser utilizada como um indicativo de similaridade genética. Tendo em vista a variabilidade genética e a alta frequência de multirresistência identificada nas estirpes de *S. suis* circulantes no país, é possível avaliar as razões para que o controle do agente continue sendo um grande desafio para a suinocultura intensiva nacional.

Palavras-chave: Perfil de resistência aos antimicrobianos. Sequenciamento de genoma. Genotipagem molecular. Sorotipagem. Perfil de virulência.

ABSTRACT

CABRERA MATAJIRA, C. E. **Comparative genome analysis of *Streptococcus suis* strains isolated from swine in Brazil** [Análise comparativa de genomas de estirpes de *Streptococcus suis* isoladas de suínos no Brasil]. 2019. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Streptococcus suis is a pathogen of great importance in the pig industry and can cause diverse clinical conditions in animals of different ages, in addition of this, is also considered a zoonotic agent. Thus, is essential the characterization of strains that causes disease in swine from Brazil. The current study aimed phenotypic and genotypic characterization of 215 *S.suis* strains isolated between 2001 and 2016 from diseased swine of different Brazilian states. Isolated strains were stored at -86 ° C and were posteriorly reactivated for confirmation through PCR and MALDI-TOF mass spectrometry. Subsequently, molecular serotyping and virulence gene identification were performed by PCR, and genotyping was performed by AFLP and PFGE techniques. To identify the resistant profiles, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the broth microdilution technique. Based on the results obtained from the phenotypic and genotypic characterization, twenty-four strains were selected for genome sequencing using the Illumina® MiSeq platform. The most frequently identified serotype was 2 / ½ (82.8%); followed to a lesser extent by serotypes 3, 4, 6, 7, 8, 9, 18, 27, 28, 1/14, with only six non- typeable strains (NT). For virulence profile characterization, four genes - *sly*, *arcA*, *epf* and *mrp* variants – were screened, and were identified 11 virulence profiles in the studied strains. The genotyping by AFLP technique identified 30 genotypic profiles and the PFGE technique identified 64 pulsotypes. For both techniques, no clear correlation between epidemiological and genotypic data could be identified, but a tendency to group strains per year of isolation can be observed. The MIC results identified nine antimicrobial susceptibility profiles and 72.1% of the strains were classified as multidrug-resistant. High rates of resistance to tetracyclines, macrolides, clindamycin and sulfadimethoxine were observed, while beta-lactams and florfenicol were the most effective antimicrobials. In the genomic analysis, no plasmid

markers were detected and only three resistance genes were identified in the *S. suis* Brazilian genomes; the *ermB* gene, which encodes resistance to macrolides and lincosamides, was detected in 79.2% of the 24 studied genomes. The MLST analysis identified eight new allele sequences and one new allelic combination, such that six new type sequences (STs) were identified among the 24 genomes analyzed. It was identified a mobile genetic element (CMGETZ080501) related to antimicrobial resistance in seven from nine strains of serotype 2; the two Brazilian serotype 2 strains that differ from the others (45 and 47) were the most susceptible strains to antimicrobials. Regarding genetic mapping of the strains from serotype 3, it was observed that two of them differ from the others and show greater similarity to the reference genotype of serotype 4 strains. This result was both verified in wgSNP and MLST analysis, confirming that the capsular characterization of *S. suis* should not be used as an indication of genetic similarity. Given the genetic variability and the high frequency of multidrug resistance identified in the *S. suis* strains circulating in the country, it is possible to evaluate the reasons for the control of the agent to remain a major challenge for the national intensive pig production systems.

Keywords: Antimicrobial resistance profile. Genome sequencing. Molecular genotyping. Serotyping. Virulence profile.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Histórico.....	15
2.2. Etiologia.....	16
2.3. Epidemiologia.....	17
2.4. Patogênese.....	19
2.5. Infecções em humanos.....	20
2.6. Diagnóstico e Identificação.....	22
2.7. Sorotipagem.....	23
2.8. Caracterização genotípica.....	25
2.9. Perfil de Virulência.....	26
2.10. Resistência Antimicrobiana.....	27
2.11. Análise Genômica.....	29
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. Estirpes bacterianas.....	33
4.2. Extração de DNA.....	33
4.3. Sorotipagem molecular.....	33
4.4. Caracterização do perfil de virulência.....	34
4.5. Genotipagem.....	36
4.5.1. Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).....	36
4.5.2. Eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	36
4.6. Caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos.....	37
4.7. Análise estatística.....	39
4.8. Sequenciamento de genomas.....	40
4.9. Análise genômica.....	41
5. RESULTADOS.....	45
5.1. Estirpes bacterianas.....	45
5.2. Sorotipagem molecular.....	47
5.3. Perfil de virulência.....	49

5.4. Perfil de resistência aos antimicrobianos.....	54
5.5. Análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) ..	61
5.6. Análise da eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	66
5.7. Análise genômica.....	71
6. DISCUSSÃO	82
7. CONCLUSÕES.....	93
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

1. INTRODUÇÃO

Streptococcus suis são cocos Gram-positivos que crescem em cadeias de comprimento variável, pertencentes ao gênero *Streptococcus* (DU TOIT et al., 2014). Apresentam reação de catalase negativa, são imóveis, anaeróbios facultativos e para seu crescimento ótimo é necessária adição de sangue ou soro fetal bovino em placas e caldo, respectivamente (HOMMEZ et al., 1986; KILPPER-BALZ; SCHLEIFER, 1987; DU TOIT et al., 2014; FENG et al., 2014).

Em diversos estudos *Streptococcus suis* foi descrito como causador de doenças em animais, mas só foi reconhecido como espécie oficialmente em 1987 (KILPPER-BALZ; SCHLEIFER, 1987). Em relação a infecção em animais, *S. suis* é descrito como responsável por doenças em diversas espécies domésticas e silvestres (KEYMER et al., 1983; DEVRIESE et al., 1990, 1994; SALASIA et al., 1994; ROELS et al., 2009; DE JONG et al., 2014; TANG et al., 2016; FERNÁNDEZ-AGUILAR et al., 2018; OH et al., 2018). A espécie mais afetada por este agente são os suínos, o que causa um grande impacto na cadeia produtiva (GOYETTE-DESJARDINS et al., 2014; HAAS; GRENIER, 2018).

Essa bactéria faz parte da microbiota normal dos suínos, podendo ser encontrado em diversas partes do organismo do animal, preferencialmente nas vias respiratórias altas, e mais especificamente nas tonsilas (O'SULLIVAN et al., 2011). O grande número de animais e o maior contato entre eles dentro dos sistemas intensivos de produção, possibilita a transmissão de *S. suis* mais facilmente, sendo que os animais mais susceptíveis são os leitões com até 12 semanas de idade, que podem apresentar diferentes quadros sistêmicos além de morte súbita (PERCH et al., 1983).

A infecção por *S. suis* é amplamente disseminada nos sistemas de produção de suínos criados no Brasil, e muitas vezes negligenciada pelos veterinários e técnicos que acompanham os rebanhos (FENG et al., 2014). Atualmente *S. suis* é isolado em grande frequência em animais com quadros de pneumonia, poliserosite, artrite e meningite (DOTO et al., 2016).

A resistência à antimicrobianos nesta espécie vem crescendo nos últimos anos, sendo que algumas estirpes se mostraram multirresistentes a diversas classes de antimicrobianos, de tal forma que o agente já é considerado como um reservatório de mecanismos de resistência (HUANG et al., 2016). As avaliações do perfil de susceptibilidade de *S. suis* são de extrema importância, não apenas para a suinocultura, mas também pelo fato deste agente ser relatado em quadros zoonóticos, com maior frequência de descrições de casos clínicos em humanos nos países do sudeste asiático como Tailândia, Vietnam e China (FENG et al., 2014).

Estudos genômicos já estão sendo aplicados à caracterização de *S. suis* revelando diversidade genética significativa entre os diferentes sorotipos e comprovando a variação da virulência das estirpes de acordo a expressão de citosinas e a capacidade de resistência à fagocitose (ZHANG et al., 2011). Weinert et al. (2015) também demonstraram que há variação gênica marcante entre os isolados clínicos e os não associados à doença, e não observaram diferenças genômicas significativas entre as estirpes originárias de suínos das de humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

Friedr Rosenbach em 1884, na Alemanha, foi quem utilizou pela primeira vez o termo “*Streptococcus*” ao se referir a bactérias piogênicas que estavam presentes em feridas de pele. Posteriormente começaram as classificações de possíveis espécies a partir da hemólise em ágar sangue de carneiro (FACKLAM, 2002). Entre 1953 e 1963 foram identificados *Streptococcus* alfa hemolíticos de suínos que ocasionavam quadros sistêmicos; estas bactérias foram caracterizadas a partir dos carboidratos da parede celular nos grupos Lancefield R, S e T (DE MOOR, 1963). No ano de 1966 foi identificada uma similaridade entre o grupo S de Lancefield e *Streptococcus* e foi sugerido uma nova nomenclatura dessas estirpes para *Streptococcus suis* tipo capsular 1 (ELLIOTT, 1966); anos depois, outros *Streptococcus* isolados de suínos e com as mesmas características do tipo capsular 1, foram classificados no grupo Lancefield como tipo R; portanto essa diferença levou a denominação dessas estirpes como *Streptococcus suis* tipo capsular 2 (WINDSOR; ELLIOTT, 1975).

Kilpper-Balz e Schleifer, em 1987, descreveram *S. suis* oficialmente como espécie; entre 1983 e 1995 foram descritos um total de 34 sorotipos. A partir dessa classificação o agente tem sido descrito como patógeno oportunista em diversas espécies animais (KEYMER et al., 1983; DEVRIESE et al., 1990; SALASIA et al., 1994; ROELS et al., 2009; DE JONG et al., 2014; TANG et al., 2016), sendo responsável por surtos na produção de suínos. Os primeiros surtos de quadros neurológicos em suínos foram descritos em 1950 na Europa, principalmente Reino Unido e Países Baixos, e em 1969

nos Estados Unidos (DE MOOR, 1963; STAATS et al., 1997). Desde então o agente é considerado como um importante patógeno mundialmente (WISSELINK et al., 2000).

No Brasil os primeiros relatos de isolamento de animais doentes foram descritos nos anos de 1980 com diferentes quadros sistêmicos (REIS et al., 1980; FARINHA et al., 1981; BARCELLOS et al., 1984). Atualmente já foram identificados no Brasil diversos sorotipos, como o 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 18 e 22, causando diferentes quadros clínicos (MARTINEZ et al., 2003; COSTA et al., 2005; ROCHA et al., 2012; CALDERARO et al., 2016).

2.2. Etiologia

S. suis se caracterizam morfológicamente como cocos Gram-positivos em forma de cadeias de comprimentos variáveis. Trata-se de uma bactéria anaeróbia facultativa e catalase negativa, caracterizada por α ou β hemólise em ágar sangue de carneiro ou cavalo, respectivamente (HOMMEZ et al., 1986; DU TOIT et al., 2014; FENG et al., 2014).

De acordo com os carboidratos da parede celular esta espécie é classificada nos grupos R, S, T e D de Lancefield sendo que os sorogrupos R e D são os mais frequentes (KILPPER-BALZ; SCHLEIFER, 1987).

O perfil bioquímico do *S. suis* pode ser variável entre as estirpes; normalmente pode-se apresentar resultados positivos para substratos como alanina-fenil-alanina-prolina, arilamidase, amido, esculina, glicogênio, lactose, leucina aminopeptidase, sacarose, salicina, e alto percentual positivo em testes de arginina di-hidrolase, β -glucoronidase, α -galactosidase, β -galactosidase, metil- β -d-glucopiranosido, glicil-

triptofano arilamidase e inulina. Com respeito a testes de arabinose, hipurato, sorbitol e Voges-Proskauer apresenta reação negativa (KILPPER-BALZ; SCHLEIFER, 1987; STANOJKOVIC et al., 2014). Em alguns casos é difícil a confirmação com todos esses substratos sendo observada variação dos resultados; dessa forma é necessário realizar outros testes bioquímicos, sorológicos, imunológicos ou moleculares para confirmar a identificação do agente.

2.3. Epidemiologia

Streptococcus suis é uma bactéria que está disseminada mundialmente e tem a capacidade de ser um agente patogênico para diversas espécies animais (DEVRIESE et al., 1990, 1994; FERNÁNDEZ-AGUILAR et al., 2018; OH et al., 2018). Nos suínos está normalmente presente nas vias respiratórias superiores, principalmente nas tonsilas, mas também pode ser isolado de outras áreas do organismo do animal, como do trato geniturinário e da pele. Os leitões são naturalmente infectados durante e após o parto; portanto as matrizes são consideradas como fontes primárias de infecção. As taxas mais altas de infecção são observadas principalmente entre cinco e 10 semanas de idade, mas a doença pode aparecer em animais de quatro a 12 semanas de vida (ROBERTSON; BLACKMORE, 1989; STAATS et al., 1997).

Os suínos carreadores, ou seja, portadores assintomáticos que ingressam em novos rebanhos, assim como ambientes contaminados, funcionários, e outras espécies animais, como ratos e aves, contribuem para disseminação do agente (DEE; COREY, 1993; BONIFAIT et al., 2014; SOARES et al., 2015).

A morbidade e mortalidade são muito variáveis entre os diferentes tipos de produção, e isso decorre das distintas características de manejo das granjas. Boas práticas de limpeza, controle de temperatura e ventilação adequada, reduzem o estresse e a taxa de mortalidade. Em suínos infectados o tratamento é muito importante, visto que se não é realizada antibioticoterapia a mortalidade pode atingir até 20% destes animais (STAATS et al., 1997).

Com respeito a distribuição dos sorotipos no mundo, Wisselink et al. (2000) reportaram dados de alguns países da Europa nos quais o sorotipo 2 é o mais prevalente seguido do 9 e 1, com frequência de 32%, 20% e 12%, respectivamente. Os dados atuais mostram que o sorotipo 2 é o mais isolado em todo o mundo chegando a representar frequências ainda maiores (HIGGINS; GOTTSCHALK, 2000; CALDERARO et al., 2016; KERDSIN et al., 2018). Entretanto, Estrada et al. (2019) relataram a detecção de estirpes patogênicas dos sorotipos ½ e 7, nos Estados Unidos, com maior frequência do que o sorotipo 2.

Em relação ao Brasil, foi verificado maior prevalência do sorotipo 2; os sorotipos 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 14 também já foram descritos, porém em menor proporção (MARTINEZ et al., 2003; COSTA et al., 2005; ROCHA et al., 2012). Recentemente, Calderaro et al. (2016) relataram a presença de sorotipos 1, 2, 3, 4, 7, 18 e 22 em estirpes de suínos doentes no país.

Também foi descrita a detecção de *S. suis* em diversos pontos de abatedouros, incluindo baias de espera, tanques de escalda, áreas de sangria, evisceração, lavagem e inspeção de vísceras, além de facas, mesas e no próprio chão da câmara fria (SOARES et al., 2015). No entanto, nessas estirpes originárias de ambientes de

abatedouros não foi detectado o sorotipo 2, mas sim os sorotipos 4 e 29 com maior frequência, seguidos de 5, 12, e 21 em menores proporções.

2.4. Patogênese

S. suis penetram no organismo do hospedeiro através de ferimentos, por via oral ou nasal. A colonização ocorre nos primeiros cinco dias após o contato do agente com as tonsilas e os animais contaminados podem se tornar portadores sadios ou adoecer, dependendo de variados fatores como o estado imunológico e/ou nível de estresse dos animais, assim como a virulência das estirpes (HIGGINS; GOTTSCHALK, 1990).

O mecanismo envolvido na infecção sistêmica por este patógeno ainda não está bem elucidado; há diferentes descrições de mecanismos que estão associados à patogênese. Inicialmente a bactéria atinge a corrente sanguínea e linfócitos eferentes das tonsilas. Após esta etapa, ocorrerá a fagocitose do agente por monócitos; entretanto, o agente pode resistir a este mecanismo de defesa celular, e dessa forma os monócitos acabam transportando o agente etiológico para diversos sítios de infecção. Se a bactéria atingir o líquido cefalorraquidiano irá provocar estimulação da produção de citocinas e a produção um intenso infiltrado inflamatório, aumentando a permeabilidade vascular e conseqüentemente a pressão intracraniana; ocasionando, dessa forma, as manifestações clínicas neurológicas (BERTHELOT-HÉRAULT et al., 2002).

Recentemente, duas proteínas de superfície de *S. suis*, Fhb e Fhbp, foram descritas por sua capacidade de se ligar ao fator H demonstrando importância na adesão de *S. suis* às células epiteliais e endoteliais (ROY et al., 2016). Para estirpes do sorotipo 2, já

foi descrita a capacidade de secreção da protease de IgM e a hidrolase da IgA1, que podem desintegrar diretamente as imunoglobulinas do hospedeiro (HOUDE et al., 2012); estes mecanismos permitem que as bactérias consigam resistir a defesa imune do hospedeiro, e dessa forma migrem dentro do organismo, provocando diversos quadros sistêmicos.

2.5. Infecções em humanos

Na Dinamarca, no ano 1968, foi relatada a primeira infecção de *S. suis* em humanos; posteriormente, diferentes casos zoonóticos foram relatados em diferentes lugares do mundo (FENG et al., 2014). Em alguns países, como o Brasil, o agente ainda não foi descrito infectando seres humanos. A ausência de dados de infecções zoonóticas por esta bactéria pode estar relacionada ao desconhecimento da doença na rotina médica tradicional (AMASS, 1998). Recentemente foi demonstrada a capacidade de alguns sorotipos sobreviverem em carcaças, carne, mãos e fômites (SOARES et al., 2015) corroborando com o fato de que as pessoas mais susceptíveis a infecção são os funcionários de abatedouros ou outros profissionais que possuem contato com qualquer parte da cadeia produtiva de suínos (KAY et al., 1995).

A preocupação com a infecção humana por *S. suis* aumentou consideravelmente após dois grandes surtos na China nos anos 1998 e 2005; entretanto, esses surtos foram considerados como esporádicos. Recentemente foram realizadas análises das estirpes que provocaram o surto de 2005, na China; estas estirpes foram classificadas geneticamente em oito grupos e apresentaram correlação com o local geográfico de isolamento (FENG et al., 2014; DU et al., 2017). Descrições genômicas anteriores já

havam mostrado que estas estirpes eram mais virulentas, possivelmente por uma transferência de material genético entre bactérias do mesmo gênero (FENG et al., 2014). Até hoje uma grande variedade de sorotipos já foi descrita como causadores de infecção em humanos (1, 4, 5, 14, 16 e 24), sendo que o sorotipo 2 também é o mais frequente (FENG et al., 2014).

A Ásia apresenta a maior parte dos casos endêmicos de infecção humana pelo agente, mas não há uma explicação definida para a maior ocorrência de casos. Alguns fatores como clima, criação de suínos em sistemas de baixa tecnificação, consumo de carne crua ou mal cozida em pratos típicos, ou festivais gastronômicos culturais, têm sido relatados como possíveis causas (FENG et al., 2014; TAKEUCHI et al., 2017). Dessa forma, também foi sugerido que as possíveis portas de entrada para este patógeno podem ser o trato digestivo ou as vias respiratórias.

Recentemente alguns autores têm tentado associar sequências tipo (STs) específicas com estirpes que infectam humanos. A ST7 já foi associada com estirpes que causaram surtos na Ásia, enquanto a ST1 foi descrita em estirpes que provocaram septicemia e endocardite em humanos (DU et al., 2017). Recentemente também foi descrito o primeiro registro de ST665 causando septicemia em humanos (YANASE et al., 2018; HUANG et al., 2019b). Ainda em relação as STs, estudos descrevem as ST377 e ST658 como identificadas exclusivamente em humanos, não afetando os suínos (ZHOU et al., 2017).

2.6. Diagnóstico e Identificação

Em suínos, o diagnóstico presuntivo de quadros clínicos causados por *S. suis* inicia na identificação dos sinais clínicos, idade do animal e lesões macroscópicas, e finaliza com a confirmação através de análises laboratoriais para identificação do agente (STAATS et al., 1997; FENG et al., 2014). As estirpes isoladas são identificadas e classificadas com base nas características morfológicas, bioquímicas, sorológicas, moleculares e com o sequenciamento de genes conservados (VECHT et al., 1985; PÉREZ-SANCHO et al., 2017). As características bioquímicas apresentam como limitação a alta variabilidade entre estirpes da mesma espécie, por isso é recomendável a sua associação com outras técnicas, como a sorotipagem, para aumento da taxa de sucesso na identificação e caracterização do agente etiológico (HIGGINS; GOTTSCHALK, 1990). Diversas técnicas de sorotipagem podem ser realizadas, sendo que a coaglutinação é uma das mais utilizadas enquanto a identificação molecular é a mais rápida e acessível (GOTTSCHALK et al., 1989; KERDSIN et al., 2014; OKURA et al., 2014).

A capacidade de se pesquisar uma parte específica de DNA de um agente bacteriano facilita a identificação e a caracterização deste (WISSELINK et al., 2000; OKWUMABUA; O'CONNOR; SHULL, 2003). No caso de *S. suis*, a identificação do agente pela detecção do gene codificador da glutamato desidrogenase auxilia no diagnóstico. Além disso, também foi descrita a detecção de fatores de virulência de *S. suis* que estão associados a determinados genes, como o *mrp* (*muraminidase released protein*), suilisina (*sly*), arginina desaminase (*arcA*), e o fator extracelular (*epf*) (OKWUMABUA et al., 2003; SILVA et al., 2006; MANEERAT et al., 2013).

O sequenciamento parcial de genes conservados, como o 16S rRNA, também é utilizado na identificação de estirpes, apresentando uma alta especificidade. Outras ferramentas como espectrometria de massa também estão sendo utilizadas na identificação de agentes bacterianos como o *S. suis*, sendo que esta técnica demonstra uma boa concordância de resultados quando comparada à PCR e ao sequenciamento gênico parcial, tornando-se ótima alternativa ao diagnóstico (MATAJIRA et al., 2017; PÉREZ-SANCHO et al., 2017).

2.7. Sorotipagem

S. suis já foi classificado em 35 sorotipos (PERCH et al., 1983; GOTTSCHALK et al., 1989, 1991; HIGGINS et al., 1995; HIGGINS; GOTTSCHALK, 1996) de acordo com a composição dos polissacarídeos capsulares. No entanto, análises filogenéticas dos genes 16S rRNA e chaperonina-60 (*cpn60*) mostraram que as estirpes de referência dos sorotipos 32 e 34 deveriam ser reclassificadas como *Streptococcus orisratti* (HILL et al., 2005). Mais recentemente, a análise de sequências dos genes codificadores da superóxido desmutase manganês dependente (*sodA*) e da proteína de reparação (*recN*) indicaram que as estirpes de referência dos sorotipos 20, 22, 26 e 33 também deveriam ser removidas da espécie *S. suis* (TIEN et al., 2013).

O grande número de sorotipos e sua associação com a manifestação de diferentes quadros clínicos, em determinadas áreas geográficas, demanda não apenas o isolamento e identificação do agente, mas também a sua classificação por sorotipagem para posterior associação de dados genotípicos, fenotípicos e epidemiológicos (FENG et al., 2014).

Técnicas como aglutinação em lâmina e testes de imunodifusão já foram utilizados para caracterização dos sorotipos desta espécie, mas essas técnicas não apresentam alta especificidade (HOMMEZ et al., 1986). A técnica de coaglutinação, na qual *Staphylococcus aureus* são fixados com formalina junto ao antissoro policlonal de coelho previamente exposto ao antígeno de interesse, apresenta melhores resultados de especificidade; no entanto, poucos laboratórios possuem infraestrutura e conhecimento necessários para a realização desta técnica de forma adequada (GOTTSCHALK et al., 1993).

Atualmente, a partir da identificação dos genes associados aos polissacarídeos capsulares é possível a diferenciação molecular de sorotipos de *S. suis*. Protocolos de sorotipagem molecular baseados em reações específicas para estes genes, na forma de reações múltiplas (*PCR multiplex*) associadas aos diferentes pesos moleculares possibilitando uma forma mais rápida, específica e também mais acessível de sorotipagem para a maioria dos laboratórios (KERDSIN et al., 2014; OKURA et al., 2014; ISHIDA et al., 2014).

No entanto, a classificação molecular dos sorotipos ainda apresenta dificuldades, especificamente para a padronização dos protocolos e das respectivas reações. A fim de aprimorar essas técnicas, novas ferramentas genômicas estão sendo desenvolvidas para a classificação de *S. suis*. Athey et al. (2016) descreveram um protocolo que permite a determinação de sorotipos *in silico* a partir de dados de sequências curtas obtidas do sequenciamento do genoma completo (*WGS*). Esta ferramenta promete identificar de maneira rápida e fácil os sorotipos de *S. suis*, reduzindo as desvantagens dos protocolos fenotípicos e até mesmo das reações de *PCR multiplex*.

2.8. Caracterização genotípica

As análises genotípicas de estirpes bacterianas têm sido empregadas para a caracterização de surtos ou ainda para o desenvolvimento de estudos epidemiológicos de doenças que afetam os animais e o homem, sendo esta área denominada de epidemiologia molecular. Dessa forma, busca-se a associação de dados fenotípicos, epidemiológicos e genotípicos para a melhor compreensão da dinâmica das doenças e dos agentes bacterianos.

Nos estudos moleculares com estirpes de *S. suis* já foram utilizadas algumas técnicas genotípicas, incluindo o polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e eletroforese em campo pulsado (PFGE). Bauns et al. (2007) e Rehm et al. (2007) relataram que o AFLP possibilitou o agrupamento de estirpes de *S. suis* de origem suína e humana com histórico clínico invasivo em um mesmo genótipo. Rehm et al. (2007) também relataram a tendência de agrupamento de estirpes de *S. suis* distintas de origens e que apresentavam a mesma ST.

Nos estudos de caracterização de *S. suis* pela PFGE, foram descritas associações de agrupamentos de estirpes de *S. suis* de origem humana com perfis de genes de virulência, além da correlação de pulsotipos com determinadas STs e sorotipos (KERDSIN et al., 2009; THARAVICHITKUL et al., 2014; HUANG et al., 2015).

Mais recentemente, a caracterização das estirpes através da Tipagem por Sequenciamento de *Multilocus* (MLST) vem ganhando destaque. King et al. (2002) descreveram o esquema que é utilizado na caracterização da espécie e os genes avaliados são: *dpr*, *thrA*, *cpn60*, *recA*, *gki*, *aroA* e *mutS*. A ST1 representa 364 estirpes (28%) dentre as descritas até o momento e está presente em 10 dos 16 países em que

há estirpes avaliadas. Até o momento foram descritas 1254 STs diferentes para *S. suis* e apenas uma estirpe brasileira é descrita no banco de dados (<https://pubmlst.org/ssuis/>).

2.9. Perfil de Virulência

A MRP (“*muraminidase released protein*”) é um componente da parede celular com 136 kDa que pode ser encontrada no sobrenadante de culturas de *S. suis*. Estudos baseados em técnicas de *immunoblotting* com uso de anticorpos monoclonais específicos, evidenciaram a presença de variantes da MRP, sendo denominadas MRP* (peso molecular maior que 136kDa) e MRPs (peso molecular menor que 136 kDa). A sua combinação resulta em fenótipos diferentes com variação do grau de virulência das estirpes de *S. suis* (VECHT et al., 1993; GALINA et al., 1996).

O EF (fator extracelular) é um produto secretado de 110 kDa (VECHT et al., 1991b). Algumas estirpes consideradas fracamente virulentas produzem um EF alterado e de peso molecular maior, denominado EF variante (EF*), sendo esta proteína diferenciada pela repetição de algumas unidades de aminoácidos na região C-terminal (SMITH et al., 1992, 1993).

A hemolisina produzida por *S. suis*, denominada de suilisina, é uma proteína extracelular com peso molecular aproximado de 65 KDa, codificada pelo gene *sly*. A suilisina é uma proteína tiol-ativada, integrante da família de toxinas antígenicamente relacionadas à receptores de colesterol que formam poros na membrana plasmática (FEDER et al., 1994; JACOBS et al., 1994; GOTTSCHALK et al., 1995).

Inicialmente, Vecht et al. (1991a) determinaram três padrões fenotípicos de virulência pela presença da MRP e EF: estirpes MRP+ / EF+ são virulentas e isoladas de suínos doentes contendo ambas proteínas; estirpes MRP+ / EF- apresentam baixa virulência com presença apenas de MRP e são isoladas de humanos e suínos clinicamente saudáveis; estirpes não virulentas MRP- / EF- isoladas de suínos clinicamente saudáveis. Posteriormente, Quessy et al. (1994) determinaram outro fenótipo, MRP- / EF+.

As amostras de *S. suis* isoladas de suínos saudáveis capazes de produzir as proteínas MRP e EF podem possuir uma importância epidemiológica significativa na manutenção, transmissão e distribuição de estirpes potencialmente virulentas nos animais de uma mesma granja ou de granjas diferentes (LUQUE et al., 2010)

Já a arginina deiminase, codificada pelo gene *arcA*, é descrita como um fator facilitador para a sobrevivência de *S. suis* em condições ácidas (MANEERAT et al., 2017). Esta já foi descrita anteriormente com alta frequência em estirpes invasivas e respiratórias de *S. suis* isoladas de suínos e humanos (MANEERAT et al., 2013; UNTERWEGER et al., 2018).

2.10. Resistência Antimicrobiana

Vários perfis de resistência aos antimicrobianos de *S. suis* já foram descritos ao longo do tempo. Desde o ano de 1988 foram relatadas estirpes que apresentavam sensibilidade para ampicilina, penicilina, cefradina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprima e resistência para estreptomicina, neomicina e tetraciclina; neste momento, ainda era pequena a proporção de estirpes multirresistentes (TOUIL et al., 1988). Já em 1993, foram descritas estirpes isoladas de diferentes países da Europa

que apresentavam resistência a um número maior de antimicrobianos, como clindamicina, eritromicina, kanamicina, neomicina, estreptomicina e tetraciclina (ESTOEPANGESTIE; LÄMMLER, 1993).

Em relatos mais recentes, Yongkiettrakul et al. (2019) compararam estirpes isoladas na Tailândia entre os anos de 2006 a 2007 e de 2012 a 2015, nos quais identificaram resistência para clindamicina, doxiciclina, eritromicina e tetraciclina, e susceptibilidade para ampicilina, penicilina, ceftiofur e cefalexina. Dados similares foram descritos por Hernandez-Garcia et al. (2017), com estirpes britânicas de *S. suis* isoladas entre os anos de 2009 a 2014 apresentando resistência à doxiciclina, tetraciclina, marbofloxacina, tilmicosina e tilosina, porém sensíveis aos β -lactâmicos.

No Brasil, Soares et al. (2014) identificaram o perfil de susceptibilidade de estirpes brasileiras de *S. suis* isoladas de suínos saudáveis, e detectaram aproximadamente 60% das estirpes com resistência combinada para sulfametoxazol-trimetoprima, tetraciclina, clindamicina, norfloxacina e ciprofloxacina. Apesar de todas as estirpes serem caracterizadas como multirresistentes, foram identificadas altas taxas de susceptibilidade aos β -lactâmicos.

O perfil de multirresistência de *S. suis* também mudou ao longo do tempo. Estirpes isoladas entre os anos de 1987 a 1996 apresentavam 20% de multirresistência (KATAOKA et al., 2000), enquanto os estudos recentes descrevem maiores proporções chegando em até 80% de multirresistência (ZHANG et al., 2008; HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017).

O aumento da resistência aos antimicrobianos das estirpes recentes de *S. suis* demanda atenção e demonstram a importância da escolha pelo tratamento mais adequado. Descrições recentes sugerem que os melhores antimicrobianos em relação

à susceptibilidade de *S. suis* são os β -lactâmicos e o florfenicol (OH et al., 2017; YONGKIETTRAKUL et al., 2019).

2.11. Análise Genômica

Desde que as primeiras sequências de genomas bacterianos completos foram descritas em 1995, o sequenciamento de nova geração se tornou uma ferramenta eficaz que permite obter uma grande quantidade de informação genética de um mesmo microrganismo, facilitando o entendimento do comportamento de diferentes agentes (LAND et al., 2015). No caso de *S. suis*, a partir dos anos 2000 houve um aumento no número de trabalhos que utilizaram o sequenciamento de nova geração para descrever e analisar este agente.

Um dos primeiros relatos de sequenciamento de genoma de *S. suis* realizou a comparação de duas estirpes diferentes isoladas de dois suínos apresentando o mesmo quadro clínico. No entanto, foi observado que uma dessas estirpes não apresentava alguns genes de virulência e o tamanho do genoma era um pouco menor comparado com o outro, o que sugere a existência de variação genética entre estirpes que ocasionam o mesmo quadro clínico no hospedeiro (WEI et al., 2006).

Já em 2007, na China, foram realizadas comparações genômicas de estirpes de *S. suis* do sorotipo 2 altamente virulentas que causaram surtos zoonóticos; a partir dessas foi identificada uma ilha de patogenicidade, denominada 89K, presente em outras espécies bacterianas e caracterizada por conter muitos genes de virulência. A partir desses dados, verificou-se que *S. suis* também possuem material genético proveniente de outras bactérias, adquirido provavelmente por transferência horizontal, o que poderia

ser um fator importante para aumentar o potencial patogênico deste agente (CHEN et al., 2007).

Posteriormente, foram descritas análises genômicas de estirpes de *S. suis* dos sorotipos 3 e 14 isoladas de suínos doentes. No sorotipo 3 não foi identificada a ilha de patogenicidade 89k, descrita anteriormente, mas foram identificados vários genes associados à esta, como *pgdA*, *fbps* e *srtA*; no entanto, genes de virulência tradicionais como o fator extracelular e a suilisina estavam ausentes nesta estirpe. Já no sorotipo 14 foram identificadas características interessantes, como a semelhança do *locus cps* com o de estirpes do sorotipo 1, o que explica o porquê de os métodos moleculares não diferenciarem o sorotipo 1 do 14 (HU et al., 2011a; 2011b).

Já nas análises genômicas focadas na resistência aos antimicrobianos, Holden et al. (2009) compararam três genomas de *S. suis*, sendo dois isolados de humanos doentes na Ásia e um de um suíno doente da Europa. Os resultados mais relevantes mostraram que as estirpes de humanos apresentavam uma região de aproximadamente 90 kb associada à vários genes de resistência e que não estava presente na estirpe de suíno.

Tradicionalmente o “resistoma” de *S. suis* foi relacionado à genes de resistência a tetraciclinas, macrolídeos e aminoglicosídeos. A resistência às tetraciclinas está relacionada principalmente aos genes *tet* de proteção ribossômica e de efluxo, enquanto que a resistência aos macrolídeos é devida à modificação de alvo mediada por metilase – codificada pelos genes *erm* – e por bombas de efluxo – codificadas pelos genes *mef*. Em relação aos aminoglicosídeos, recentemente os genes que codificam resistência a canamicina (*aphA*) e estreptomicina (*aadE*) foram detectados em estirpes multirresistentes de *S. suis*. Destaca-se que vários desses marcadores de resistência

de *S. suis* estão inseridos no cromossomo a partir de elementos genéticos móveis, como *transposons*, profagos, ilhas genômicas (IGs), elementos quiméricos e elementos integrativos e conjugativos (ICEs) (PALMIERI et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar fenotípica e genotipicamente estirpes de *Streptococcus suis* isoladas entre os anos de 2001 e 2016, de suínos provenientes de diferentes Estados do Brasil.

3.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar as estirpes de *S. suis* em relação ao sorotipo por PCR;
2. Identificar o perfil de virulência das estirpes estudadas por PCR;
3. Caracterizar o perfil de resistência aos antimicrobianos das estirpes de *S. suis*;
4. Avaliar a variabilidade genética das estirpes pelo polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP);
5. Avaliar a variabilidade genética das estirpes pela eletroforese em campo pulsado (PFGE);
6. Selecionar, a partir dos dados obtidos, um grupo de estirpes para sequenciamento do genoma;
7. Analisar nos genomas sequenciados as diferentes STs (MLST), a presença de genes de resistência e comparar com outros genomas previamente descritos;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Estirpes bacterianas

Foram avaliadas 215 estirpes de *Streptococcus suis* isolados na rotina de diagnóstico do Laboratório de Sanidade Suína (FMVZ-USP) e incorporados à coleção de culturas deste. As estirpes foram isoladas de suínos provenientes dos Estados de São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Rio Grande do Sul. Os animais apresentavam quadro clínico de encefalite, septicemia, artrite ou pneumonia. Os isolamentos ocorreram no período de 2001 a 2016. As estirpes, identificadas como *S. suis* pelas técnicas de PCR e espectrometria de massa MALDI-TOF, foram reativadas e avaliadas quanto à pureza pelo repique em ágar sangue, sendo em seguida cultivadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - Difco) para extração de DNA e estoque em -80°C com 30% de glicerol.

4.2. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Boom et al. (1990), com tratamento enzimático prévio com lisozima (100 mg) e proteinase K (20mg) (USBiological) a 37°C por 60 minutos. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até o momento das análises.

4.3. Sorotipagem molecular

A partir do DNA extraído foi realizada a sorotipagem molecular utilizando o protocolo de reação em cadeia pela polimerase (PCR) *multiplex* descrito por Okura et al. (2014).

Para tanto foi necessária a adaptação e padronização da reação *multiplex* para reações de PCR simples e *duplex* de forma a se evitar a identificação incorreta de fragmentos de pesos semelhantes.

4.4. Caracterização do perfil de virulência

As estirpes foram submetidas à pesquisa de quatro genes de virulência de *S. suis*: *sly* - suilisina, *arcA* - arginina deiminase, *epf* - fator extracelular, e *mrp* - proteína liberada pela muramidase. Para a amplificação parcial e a identificação dos genes, foi padronizada a PCR *multiplex* utilizando os iniciadores descritos por Silva et al. (2006) para os genes *sly*, *epf* e *mrp*. Para o gene *arcA* foram utilizados os iniciadores descritos por Maneerat et al. (2013), que amplificam um fragmento de 403 pares de base (pb), para facilitar sua inclusão e visualização na *multiplex* proposta com os quatro genes (Quadro 1). Para a identificação de sequências variantes dos genes *mrp* e *epf* foram padronizadas duas reações de PCR, com tempos de extensão distintos, de forma a possibilitar a amplificação dos fragmentos de banda de diferentes tamanhos.

Os seguintes programas foram utilizados para a detecção dos genes de virulência:

1) Multiplex de detecção dos quatro genes de virulência - um ciclo a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 45 segundos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos;

2) PCR simples para identificação de *mrp* variante - um ciclo a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto, 72°C por 1,5 minutos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos;

3) PCR simples para identificação de *epf* variante - um ciclo a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 2,5 minutos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

Quadro 1. Iniciadores e respectivos tamanhos dos produtos de amplificação para a identificação dos genes de virulência de *S. suis*.

Gene	Sequência 5' – 3'	Produto (pb)	Referência
<i>epf</i> ^v	CGCAGACAACGAAAGATTGA AAGAATGTCTTTGGCGATGG	744	Silva et al. (2006)
<i>sly</i>	GCTTGACTTACGAGCCACAA CCGCGCAATACTGATAAGC	248	Silva et al. (2006)
<i>mrp</i>	ATTGCTCCACAAGAGGATGG TGAGCTTTACCTGAAGCGGT	188	Silva et al. (2006)
<i>mrp</i> variante	GACAGATGGTGAGGAAAATGG TGAGCTTTACCTGAAGCGGT	747*, 1148*, 1556*	Silva et al. (2006)
<i>arcA</i>	GATGCCTTTGCTCAAGCTCT TTTCACGGTTCGGTGTCT	403	Maneerat et al. (2013)

* Diferentes tamanhos de produtos de amplificação referentes à detecção de sequências variantes do gene *mrp*.^v Para identificação de sequências variantes do gene *epf* foram utilizados os mesmos iniciadores que no multiplex, apenas com um programa de amplificação diferente (descrito no texto).

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando-se tampão TBE 0,5X (Tris-base 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM, pH 8) e voltagem de 110V durante 1 hora. Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR* (Bio Rad), sendo estes corados com BlueGreen™ (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador *100 pb DNA Ladder™* (New EnglandBioLabs Inc).

4.5. Genotipagem

4.5.1. Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)

A técnica de AFLP foi realizada com uma única enzima de restrição - *HindIII* (New England Biolabs), seguindo o protocolo de McLauchlin et al. (2000). Os fragmentos de DNA foram corados com *BlueGreen*® (LGC Biotecnologia) e detectados por meio de eletroforese a 90V durante 3 horas em gel de agarose 2%. As imagens foram capturadas sob iluminação UV pelo sistema *Gel Doc XR* (Bio-Rad). Os fragmentos amplificados foram identificados com base no marcador de peso molecular *100 pb DNA Ladder* (New England BioLabs).

4.5.2 Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Os blocos de agarose contendo o DNA genômico foram preparados com cultivo bacteriano na concentração 1×10^9 UFC/mL em caldo BHI (Difco) enriquecido com 5 % de soro fetal bovino. Uma alíquota de 1,4 mL de cada estirpe foi adicionada a um microtubo e o mesmo foi centrifugado a 8000 rpm por 3 minutos. O pélete obtido foi lavado com 500 μ L de tampão PIV (0,01 M Tris-HCl [pH 7.6], 1 M NaCl, 0,5 Sarcosyl) a 4°C. Após a lavagem foi adicionado ao pélete 500 μ L de tampão PIV a 4°C, e esta suspensão bacteriana foi misturada a 500 μ L de agarose a 2% para confecção dos blocos.

Os blocos contendo as culturas foram incubados em uma solução Triton-EDTA (1% Triton, 0,05 M EDTA) por 2 horas a 38°C. Em seguida, esta solução foi substituída por EDTA (0.5 M) por 2 horas a 38°C. Posteriormente, a solução foi substituída por solução de lise 1 (0,01 M Tris-HCl, 1M NaCl, 0,5% Sarcosyl, 1 mg de Lisozima) mantendo os

blocos a 37°C por 18 a 20 horas. Após este período foi adicionado 2,5 ml de tampão de lise 2 (0,5 M EDTA pH 8,0 + Sarcosyl) por 2 horas a 38°C. Posteriormente, foi adicionado 15 µL de proteinase K e os blocos foram mantidos a 38°C por 18 horas. No dia seguinte foi renovada a solução com proteinase K sendo os blocos incubados novamente a 38°C por 18 horas. No dia seguinte foram feitas três lavagens com TE por 60 minutos a 4°C e os blocos foram mantidos a 4°C em microtubos com 500 µL de EDTA 0.5 M até a análise. A restrição enzimática foi realizada com a enzima *SmaI* (New England BioLabs) e as amostras foram incubadas a 25°C por 20 horas.

A eletroforese foi realizada por 18 horas a 6 V/cm, ângulo fixo de 120°, com pulso inicial de 0,5 segundos e final de 40 segundos em tampão TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA 50 mM Tris, 45 mM Borato, 0,5 mM EDTA [pH 8.4]) mantido a 14°C. Após a corrida o gel foi corado em uma solução de *SYBR™ Safe* (Thermo Fisher Scientific) por 30 minutos. O gel foi então fotografado pelo sistema *Gel Doc XR* (Bio Rad). Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcador de alto peso molecular *CHEF DNA size Standard-lambda ladder* (Bio-Rad).

4.6. Caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos

Para a identificação dos perfis de resistência aos antimicrobianos foi realizada a microdiluição em caldo conforme os padrões definidos no documento M31-A3 do CLSI (2008) para determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM). Para tanto foi montado um painel em microplaca composto pelos seguintes antimicrobianos: ampicilina, ceftiofur, penicilina, doxiciclina, oxitetraciclina, marbofloxacina, enrofloxacin, florfenicol, espectinomicina, gentamicina, neomicina, sulfadimetoxina, trimetoprima/sulfametoxazol, clindamicina, tilosina, tilmicosina, tulatromicina, tiamulina. A Figura 1

ilustra a disposição e as concentrações dos respectivos antimicrobianos testados na microplaca.

A turbidez do cultivo foi ajustada com solução salina estéril (0,9%) de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland e confirmada em espectrofotômetro ($\sim 0,150$ em OD 600 nm). Esta suspensão bacteriana ajustada possui aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL. Uma vez ajustada, a suspensão bacteriana foi diluída na ordem de 1:1000 em caldo Mueller Hinton II (Difco), suplementado com 5% de soro fetal bovino, de maneira a obter uma concentração final de, aproximadamente, 5×10^5 UFC/mL. A partir desta suspensão, 50 μ L foram então distribuídos em cada poço da microplaca. Após a distribuição do inóculo na placa, esta foi selada com adesivo e incubada a 37°C por 24 horas.

As concentrações inibitórias mínimas foram aferidas visualmente como as menores concentrações dos antimicrobianos nos poços sem crescimento bacteriano (sem a formação de botão). Foi utilizada como controle interno de qualidade a estirpe de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, conforme preconizado pelo documento M31-A3 (CLSI, 2008). Para a determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos, foram utilizados os pontos de corte descritos nos documentos VET08 (CLSI, 2018) e M100 (CLSI, 2018) A determinação da CIM50, CIM90 e multirresistência foi realizada conforme descrito por Schwarz et al. (2010).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TIO 8	TIA 32	DOX 8	OXI 8	MAR 4	AMP 16	PEN 1	SPE 128	TYL 4	TUL 4	SXT 2/38	SUL 256
B	TIO 4	TIA 16	DOX 4	OXI 4	MAR 2	AMP 8	PEN 0,5	SPE 64	TYL 2	TUL 2	CLIN 8	ENO 4
C	TIO 2	TIA 8	DOX 2	OXI 2	MAR 1	AMP 4	PEN 0,25	SPE 32	TYL 1	TUL 1	CLIN 4	ENO 2
D	TIO 1	TIA 4	DOX 1	OXI 1	MAR 0,5	AMP 2	PEN 0,12	SPE 16	TYL 0,5	TIL 64	CLIN 2	ENO 1
E	TIO 0,5	TIA 2	DOX 0,5	OXI 0,5	MAR 0,25	AMP 1	NEO 32	SPE 8	TUL 64	TIL 32	CLIN 1	ENO 0,5
F	TIO 0,25	TIA 1	TIA 0,5	GEN 1	MAR 0,12	AMP 0,5	NEO 16	TYL 32	TUL 32	TIL 16	CLIN 0,5	ENO 0,25
G	GEN 16	GEN 8	GEN 4	GEN 2	MAR 0,06	AMP 0,25	NEO 8	TYL 16	TUL 16	TIL 8	CLIN 0,25	ENO 0,12
H	FLOR 8	FLOR 4	FLOR 2	FLOR 1	FLOR 0,5	FLOR 0,25	NEO 4	TYL 8	TUL 8	TIL 4	POS	POS

Figura 1: Esquema de distribuição dos antimicrobianos no painel utilizado para a realização da microdiluição em caldo. Concentração de antimicrobianos em $\mu\text{g/mL}$. AMP - Ampicilina, TIO - Ceftiofur, PEN - Penicilina, DOX - Doxíciclina, OXI - Oxitetraciclina, MAR - Marbofloxacina, ENO - Enrofloxacina, FLOR - Florfenicol, SPE - Espectinomomicina, GEN - Gentamicina, NEO - Neomicina, SUL - Sulfadimetoxina, SXT – Trimetoprima / sulfametoxazol, CLIN - Clindamicina, TYL - Tilosina, TIL - Tilmicosina, TUL - Tulatromicina, TIA – Tiamulina, POS - positivo (apenas crescimento bacteriano).

4.7. Análise estatística

Para a análise de agrupamento dos perfis de fragmentos amplificados (AFLP), dos perfis de macrorestrição (PFGE), perfis de resistência e de virulência, foi utilizado o programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths).

Os dendrogramas de AFLP e PFGE foram construídos utilizando o coeficiente de Dice e o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Para análise do AFLP, o ponto de corte de 90% de similaridade genética foi utilizado para determinação dos agrupamentos obtidos. Para a distinção dos pulsotipos foi

utilizado o ponto de corte de quatro bandas de diferença entre as estirpes (VAN BELKUM et al., 2007).

Para a análise dos resultados de resistência e de presença de genes de virulência os resultados obtidos foram transformados em dados binários, e para a análise de agrupamento dos perfis resultantes foi construído um dendrograma utilizando o coeficiente de “*different values*” e o método de Ward.

A distribuição das frequências dos perfis de resistência e de virulência das estirpes estudadas segundo origem e sorotipo foi realizada com o programa SPSS 16.0 (SPSS Inc). Os perfis e resultados de resistência e de presença de genes de virulência foram trabalhados como variáveis categóricas e as diferenças analisadas pelo teste de Fisher-Freeman-Halton com a probabilidade bilateral estimada pelo método de Monte Carlo e nível de significância de 5 %.

4.8. Sequenciamento de genomas

A partir dos resultados fenotípicos e genotípicos obtidos, foram selecionadas 24 estirpes para sequenciamento de genoma. O DNA genômico foi extraído com o kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN) conforme instruções do fabricante. O DNA foi avaliado no *NanoDrop*[™] (Thermo Scientific) em relação à concentração e qualidade de extração; foram determinados como requisitos mínimos para sequenciamento concentração de ácidos nucleicos > 100,0 ng/μl e frações 260/280 e 230/260 com valores entre 1,8 a 2,0. O DNA extraído também foi avaliado em relação a degradação por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %. O DNA foi enviado para o Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP), no Instituto de Ciências Biomédicas da

Universidade de São Paulo, para preparo de biblioteca com *Nextera™ DNA Sample Prep Kit* (Illumina®) e sequenciamento *paired-end* com fragmentos de 300 pares de bases pela plataforma Illumina® MiSeq.

4.9. Análise genômica

Para análise inicial do sequenciamento foi utilizado o programa FastQC 0.10.0 (Babraham Bioinformatics). Foi utilizado o critério de seleção de sequências maiores que 100 pb e qualidade acima de 15 (valor de qualidade *Phred*) para a continuidade da análise e montagem dos genomas. Também foi realizada a remoção dos adaptadores da biblioteca *Nextera™* das *reads*. A avaliação conjunta da qualidade das amostras antes e após a trimagem foi realizada com o programa MultiQC (EWELS et al., 2016). Para a estimativa de cobertura dos genomas foi utilizado o número de *reads* obtidas para cada estirpe após a trimagem, o tamanho médio destas e o tamanho esperado do genoma de *S. suis* de aproximadamente 2,1 Mb, segundo os dados disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI).

A predição dos alelos e sequências tipo (ST) da Tipagem por Sequenciamento de *Multilocus* (MLST), para a espécie *S. suis*, foi realizada pela ferramenta MLST 2.0 *server* (LARSEN et al., 2012) utilizando as *reads* trimadas. Esta possibilitou a busca dos genes *aroA*, *cpn60*, *dpr*, *gki*, *mutS*, *recA* e *thrA* (KING et al., 2002) cujas sequências foram comparadas às disponíveis no site PubMLST (*Public databases for molecular typing and microbial genome diversity* - <https://pubmlst.org/ssuis/>) para determinação dos respectivos alelos e STs.

Para a confirmação das novas sequências de alelos identificadas, foi realizado o mapeamento das respectivas *reads* com a sequência do alelo mais próximo. Especificamente para o gene *mutS*, foi realizada a amplificação parcial utilizando os iniciadores propostos por Estrada et al. (2019) e sequenciamento Sanger. Para tanto os produtos de amplificação 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 (CEGH - IB - USP). 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 PubMLST.

A predição *in silico* dos genes de resistência aos antimicrobianos e marcadores de plasmídeos foi realizada a partir das ferramentas ResFinder 3.2 (ZANKARI et al., 2012) e PlasmidFinder (CARATTOLI et al., 2014) disponibilizadas na plataforma *Center for Genomic Epidemiology* (CGE server - <http://www.genomicepidemiology.org/>). Foram utilizados como critérios de busca identidade de sequência > 90% e cobertura gênica > 80%.

Para a avaliação *in silico* da sorotipagem foi utilizado o protocolo proposto por Athey et al. (2016). Como o *pipeline* disponibilizado (https://github.com/streplab/Ssuis_Serotyping_pipeline) apresenta erros na execução direta, foi utilizado apenas o banco de sequências proposto pelos autores como marcadores dos sorotipos e a comparação com os genomas brasileiros foi feita manualmente. A mesma abordagem foi utilizada com as sequências do complexo de genes capsulares disponibilizadas por Okura et al. (2013), e esses resultados foram comparados entre si.

A princípio, foi proposta a montagem dos genomas por algoritmo *ab initio* a partir do programa Unicycler (WICK et al., 2017) utilizando os seguintes parâmetros: uso apenas das *reads* curtas *Illumina*®, com parâmetros padrões para *k-mers* (de 0,2 a 0,95 do comprimento das *reads*) e a opção *--no_pilon*. A avaliação das respectivas montagens foi realizada pelo programa QUAST (GUREVICH et al., 2013).

Posteriormente, foi realizada a abordagem de mapeamento das *reads* com o programa Geneious (Biomatters) para as estirpes dos sorotipos 2 e 3 que representam mais da metade das estirpes estudadas. Para tanto foram utilizados como referências os genomas dos respectivos sorotipos de *S. suis* - CS100322 (NZ_CP024050.1) do sorotipo 2 e YB51 (NC_022516.1) do sorotipo 3. No caso das estirpes para as quais restaram mais de 10.000 *reads* após o mapeamento (*reads* “não mapeadas”), foi realizada a montagem *ab initio* deste material. Os *contigs* obtidos maiores que 1000 pb foram comparados com o banco de sequências não redundantes do GenBank pela ferramenta BLASTn.

O programa BRIG - BLAST *Ring Image Generator* (ALIKHAN et al., 2011) foi utilizado para gerar as imagens de comparação circular dos genomas a partir das sequências consensus obtidas com os respectivos mapeamentos, e dos elementos genéticos móveis identificados a partir das montagens das *reads* “não mapeadas”.

A análise de *whole genome single-nucleotide polymorphism* (wgSNP) foi realizada a partir do programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths) apenas para as estirpes dos sorotipos 2 e 3. Inicialmente foi realizado o mapeamento das *reads* das respectivas estirpes com os genomas de referência: CS100322 (NZ_CP024050.1) do sorotipo 2, e YB51 (NC_022516.1) do sorotipo 3. Para tanto foram utilizados os parâmetros padrões do algoritmo de mapeamento do programa. Para a identificação e seleção dos SNPs

foram estabelecidos os seguintes filtros: distância mínima *inter-SNP* de 12 pb, cobertura mínima de 5 (mínimo de 1 Fw e 1 Rv), remoção de posições com pelo menos uma base ambígua ou não confiável, e remoção de posições com pelo menos um gap. A partir dos SNPs selecionados foi montada uma matriz de SNPs que foi utilizada para a construção de um dendrograma. Para tanto, os SNPs foram considerados como dados categóricos e um coeficiente de similaridade “multi-estado” (*categorical - differences*) foi utilizado para a construção do dendrograma

5. RESULTADOS

5.1. Estirpes bacterianas

As estirpes foram reativadas e reavaliadas quanto à pureza pela replicação em ágar sangue; estas foram previamente identificadas como *S. suis* pelas técnicas de PCR e espectrometria de massa MALDI-TOF. As estirpes foram cultivadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - Difco) para extração de DNA e estoque em -80°C com 30% de glicerol.

A distribuição das estirpes de acordo com a origem, Estado e sítio de isolamento, é descrita nas Tabelas 1 e 2. As estirpes foram agrupadas de acordo com o sítio de isolamento do agente como provenientes de: sistema respiratório, sistema nervoso central (SNC), sistema geniturinário, articulações, e outros sítios incluindo amostras provenientes de baço, coração, fígado, pericárdio, peritônio e sangue.

Dentre o intervalo de 15 anos de isolamento, destaca-se maior concentração de isolamentos de *Streptococcus suis* nos anos de 2002 (25,6%), 2003 (20,0%), 2001 (15,3%) e 2016 (9,3%) (Tabela 3).

Tabela 1: Frequência das estirpes estudadas segundo o sítio de isolamento.

Sítio de isolamento	Nº estirpes	Porcentagem (%)
SNC	106	49,3
Respiratório	72	33,5
Articulação	20	9,3
Outros	13	6,0
Geniturinário	4	1,9
Total	215	100

SNC: Sistema nervoso central, Outros: estão incluídas amostras de baço, coração, fígado, pericárdio, peritônio e sangue.

Tabela 2: Frequência das estirpes estudadas segundo o Estado de origem.

Estado	Nº estirpes	Porcentagem (%)
SP	84	39,1
SC	51	23,7
MG	28	13,0
PR	21	9,8
MT	7	3,3
RS	9	4,2
DF	4	1,9
GO	5	2,3
MS	3	1,4
BA	2	0,9
PE	1	0,5
Total	215	100

SP – São Paulo, SC – Santa Catarina, MG – Minas Gerais, PR – Paraná, MT – Mato Grosso, RS – Rio Grande do Sul, DF – Distrito Federal, GO – Goiás, MS – Mato Grosso do Sul, BA – Bahia, PE – Pernambuco.

Tabela 3: Frequência das estirpes estudadas segundo o ano de isolamento.

Ano	Nº estirpes	Porcentagem (%)
2001	33	15,3
2002	55	25,6
2003	42	19,5
2009	12	5,6
2010	20	9,3
2011	11	5,1
2012	7	3,3
2013	14	6,5
2015	3	1,4
2016	18	8,4
Total	215	100,0

5.2. Sorotipagem molecular

A sorotipagem molecular das estirpes demonstrou a presença dos seguintes sorotipos: 2 / ½, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 18, 27, 28, 1 / 14, e seis estirpes para as quais não foi possível identificar o sorotipo (NT) pelo protocolo utilizado. O sorotipo mais frequente foi o 2 / ½, com 82,8% (178 / 215) de estirpes; este foi identificado em todos os sítios de isolamento estudados, com maior predomínio no sistema nervoso central (SNC), seguido pelo sistema respiratório. Os demais sorotipos foram isolados, principalmente, do sistema respiratório. Os sorotipos 6, 8, 9, 18 e 28 foram identificados apenas em estirpes isoladas do sistema respiratório, e o sorotipo 27 foi isolado apenas a partir do SNC.

Em relação aos sítios de isolamentos, observa-se que as estirpes originárias de sistema respiratório e sistema nervoso central apresentam maior diversidade de sorotipos enquanto nos demais locais de isolamento de *S. suis* há predomínio do sorotipo 2 / ½ (Tabela 4).

Considerando os Estados de origem das estirpes estudadas, a maior variedade de sorotipos foi detectada no Estado de São Paulo, no qual foram identificados sete sorotipos distintos.

Tabela 4: Distribuição das estirpes estudadas segundo o sítio de isolamento e sorotipo – N (%).

Sorotipo	Sítio de Isolamento					Total
	SNC	Respiratório	Articulação	Outros	Geniturinário	
2 / ½	93 (87,7)	51 (70,8)	19 (95,0)	11 (84,6)	4 (100)	178 (82,8)
3	5 (4,7)	5 (6,9)	0	0	0	10 (4,7)
1 / 14	5 (4,7)	0	1 (5,0)	0	0	6 (2,8)
NT	1 (0,9)	5 (6,9)	0	0	0	6 (2,8)
7	1 (0,9)	3 (4,2)	0	1 (7,7)	0	5 (2,3)
18	0	3 (4,2)	0	0	0	3 (1,4)
8	0	2 (2,8)	0	0	0	2 (0,9)
9	0	1 (1,4)	0	0	0	1 (0,5)
4	0	0	0	1 (7,7)	0	1 (0,5)
6	0	1 (1,4)	0	0	0	1 (0,5)
27	1 (0,9)	0	0	0	0	1 (0,5)
28	0	1 (1,4)	0	0	0	1 (0,5)
Total	106 (100)	72 (100)	20 (100)	13 (100)	4 (100)	215 (100)

SNC: Sistema nervoso central, Outros: estão incluídas amostras de baço, coração, fígado, pericárdio, peritônio e sangue.

5.3. Perfil de virulência

Para caracterização do perfil de virulência foram avaliados os genes *sly*, *arcA*, *epf*, *mrp* (Figura 2). Dentre as 215 estirpes de *S. suis*, 78,1% foram positivas para o gene *sly*, 50,2 % foram positivas para *epf* e 84,2% foram positivas para *mrp*. O gene de maior frequência foi o codificador da arginina deiminase (*arcA*) que foi detectado em 98,1% das estirpes. Apenas quatro estirpes foram negativas para a detecção dos genes de virulência estudados.

Para as estirpes positivas para a detecção dos genes *epf* e *mrp*, foram realizadas reações simples de PCR para identificação de sequências variantes conforme descrito previamente por Silva et al. (2006). No entanto, não foram identificadas variantes para o gene *epf* – todas as estirpes apresentaram amplificação de um único fragmento de ~744 pb. Para o gene *mrp*, foram identificadas três variantes de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados, sendo estas compatíveis com a descrição prévia de Silva et al. (2006) (*mrpV1*: 747 pb, *mrpV2*: 1148 pb, *mrpV3*: 1556 pb) (Figura 3).

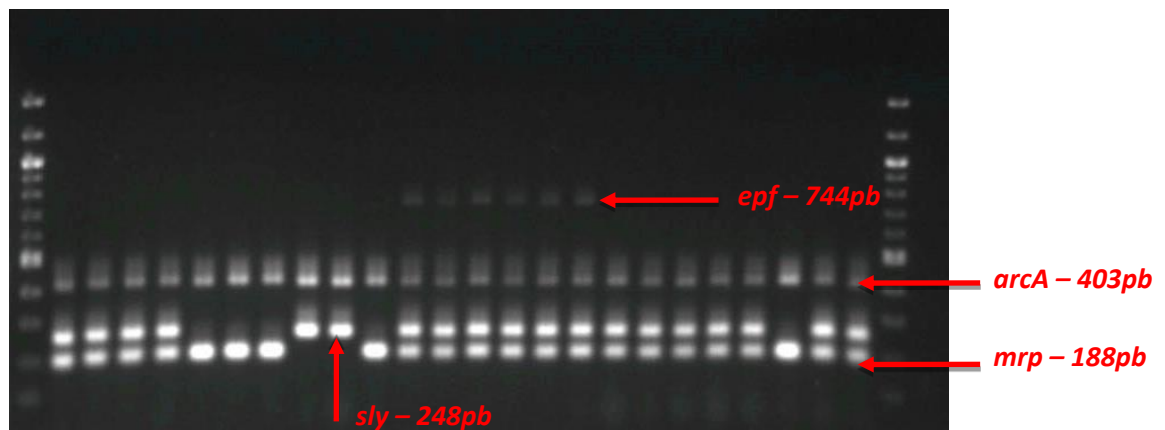


Figura 2: Gel de eletroforese de reação de PCR multiplex para detecção dos genes dos genes de virulência de *S. suis* (*sly*, *arcA*, *epf*, *mrp*).

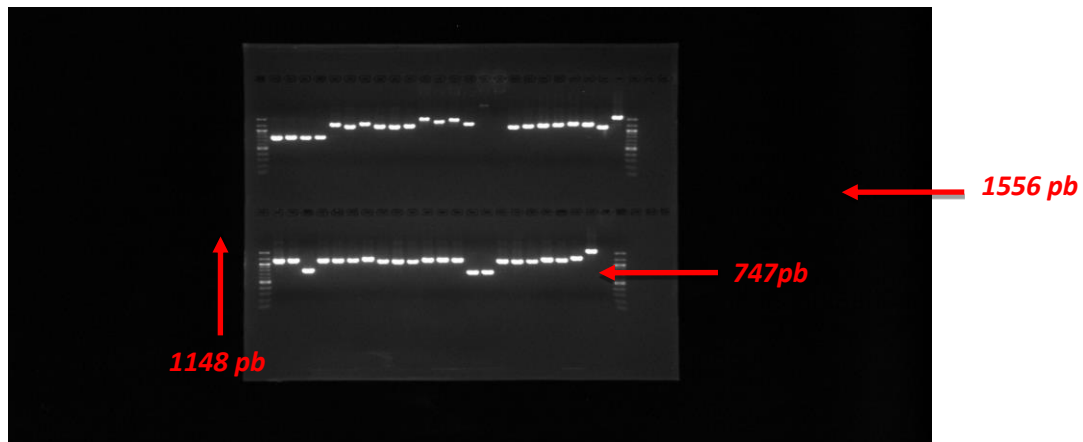


Figura 3: Gel de eletroforese da reação de PCR para identificação das variantes do gene *mrp*. As variantes foram identificadas de acordo com os diferentes tamanhos dos fragmentos amplificados - *mrpV1*: 747 pb, *mrpV2*: 1148 pb, *mrpV3*: 1556pb.

Dentre as estirpes positivas para o gene *mrp* (181/215), a variante de maior frequência foi a *mrpV2* (137/181 - 75,7%), seguida por *mrpV1* com 17,1 % e *mrpV3* com apenas 7,2 %. Houve diferença estatística significativa entre as proporções de variantes de *mrp* e os sítios de isolamento, 34 estirpes nas quais não foi detectado o gene *mrp*, a maior parte destas (61,8%) foi isolada do sistema respiratório, enquanto a maioria das *mrp+*, independente de qual variante, é originária do sistema nervoso central.

A partir dos resultados de detecção dos quatro genes de virulência estudados e das variantes de *mrp*, foram identificados 11 perfis diferentes de virulência nas estirpes de *S. suis* (Tabela 5). Destaca-se que o perfil V2 (*sly+* / *arcA+* / *epf+* / *mrpV2*) foi detectado em 40,0% das estirpes estudadas, seguido pelo perfil V5 (*sly+* / *arcA+* / *epf-* / *mrpV2*) presente em 17,7 %, e o V6 (*sly-* / *arcA+* / *epf-* / *mrpV1*) detectado em 10,2 % das estirpes de *S. suis*.

A avaliação da distribuição dos perfis de virulência em relação aos sítios de isolamento (Tabela 6) resultou em diferença estatística significativa. Pode-se observar

que, apesar do maior número de estirpes originárias do sistema respiratório, os perfis V1, V2, V5 e V6 apresentam maior proporção em estirpes originárias do sistema nervoso central. Já os perfis V4, V8, V9 e V10 parecem ser mais frequentes nas estirpes isoladas do sistema respiratório (Tabela 7).

Tabela 5. Perfis de virulência identificados nas estirpes de *S. suis* estudadas, considerando as variações do gene *mrp*.

Perfil	Genes de virulência	Frequência N (%)
V1	<i>sly+</i> / <i>arcA+</i> / <i>epf+</i> / <i>mrpV1</i>	4 (1,9)
V2	<i>sly+</i> / <i>arcA+</i> / <i>epf+</i> / <i>mrpV2</i>	86 (40,0)
V3	<i>sly+</i> / <i>arcA+</i> / <i>epf+</i> / <i>mrpV3</i>	13 (6,0)
V4	<i>sly+</i> / <i>arcA+</i> / <i>epf-</i> / <i>mrpV1</i>	5 (2,3)
V5	<i>sly+</i> / <i>arcA+</i> / <i>epf-</i> / <i>mrpV2</i>	38 (17,7)
V6	<i>sly-</i> / <i>arcA+</i> / <i>epf-</i> / <i>mrpV1</i>	22 (10,2)
V7	<i>sly-</i> / <i>arcA+</i> / <i>epf-</i> / <i>mrpV2</i>	13 (6,0)
V8	<i>sly+</i> / <i>arcA+</i> / <i>epf+</i> / <i>mrp-</i>	5 (2,3)
V9	<i>sly+</i> / <i>arcA+</i> / <i>epf-</i> / <i>mrp-</i>	17 (7,9)
V10	<i>sly-</i> / <i>arcA+</i> / <i>epf-</i> / <i>mrp-</i>	8 (3,7)
V11	<i>sly-</i> / <i>arcA-</i> / <i>epf-</i> / <i>mrp-</i>	4 (1,9)

Tabela 6. Distribuição dos perfis de virulência de *S. suis* de acordo com o sítio de isolamento - N (%).

Perfil	Sítio de isolamento					Total
	Articulação	Gênito urinário	Outros	Respiratório	SNC	
V1	0	0	0	0	4 (100)	4 (100)
V2	11 (12,8)	0	6 (7,0)	16 (18,6)	53 (61,6)	86 (100)
V3	0 (0)	0	0	7 (53,8)	6 (46,2)	13 (100)
V4	0	1 (20,0)	0	4 (80,0)	0	5 (100,0)
V5	5 (13,2)	1 (2,6)	1 (2,6)	11 (28,9)	20 (52,6)	38 (100)
V6	3 (13,6)	0	1 (4,5)	6 (27,3)	12 (54,5)	22 (100)
V7	0	0	3 (23,1)	7 (53,8)	3 (23,1)	13 (100)
V8	0	0	0	5 (100)	0	5 (100)
V9	0	2 (11,8)	2 (11,8)	8 (47,1)	5 (29,4)	17 (100)
V10	0	0	0	7 (87,5)	1 (12,5)	8 (100)
V11	1 (25,0)	0	0	1 (25,0)	2 (50,0)	4 (100)

SNC: sistema nervoso central. Probabilidade estimada pelo teste de Fisher-Freeman-Halton $p < 0,001$.

Já em relação à distribuição dos perfis de virulência dentre os sorotipos identificados no presente estudo, existe o viés do grande número de estirpes do sorotipo 2 / ½. No entanto, pode-se observar que os perfis V6, V9 e V10 apresentam maior ocorrência nos demais sorotipos, como nos sorotipos 3, 4, 6, 7, 8, 9, 18, 27, 28 e 1 / 14, quando comparados aos outros perfis de virulência (Tabela 7). O perfil de maior ocorrência (V2), por sua vez, se apresenta em maior proporção nas estirpes de *S. suis* sorotipo 2.

Tabela 7. Distribuição dos perfis de virulência de *S. suis* de acordo com o sorotipo das estirpes estudadas - N (%).

Perfil	Sorotipo												Total
	2 / ½	3	1 / 14	NT	7	18	8	4	6	9	27	28	
V01	4 (100)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4 (100)
V02	82 (95,3)	1 (1,2)	2 (2,3)	0	1 (1,2)	0	0	0	0	0	0	0	86 (100)
V03	11 (84,6)	0	2 (15,4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13 (100)
V04	4 (80,0)	0	0	1 (20,0)	0	0	0	0	0	0	0	0	5 (100)
V05	33 (86,8)	2 (5,3)	0	1 (2,6)	0	2 (5,3)	0	0	0	0	0	0	38 (100)
V06	13 (59,1)	6 (27,3)	1 (4,5)	0	0	1 (4,5)	0	0	0	0	1 (4,5)	0	22 (100)
V07	12 (92,3)	0	0	0	1 (7,7)	0	0	0	0	0	0	0	13 (100)
V08	4 (80,0)	0	0	0	0	0	1 (20,0)	0	0	0	0	0	5 (100)
V09	10 (58,8)	1 (5,9)	0	1 (5,9)	1 (5,9)	0	1 (5,9)	1 (5,9)	1 (5,9)	1 (5,9)	0	0	17 (100)
V10	1 (12,5)	0	1 (12,5)	3 (37,5)	2 (25,0)	0	0	0	0	0	0	1 (12,5)	8 (100)
V11	4 (100)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4 (100)
Total	178 (82,8)	10 (4,7)	6 (2,8)	6 (2,8)	5 (2,3)	3 (1,4)	2 (0,9)	1 (0,5)	1 (0,5)	1 (0,5)	1 (0,5)	1 (0,5)	215 (100)

NT: não tipável. Probabilidade estimada pelo teste de Fisher-Freeman-Halton $p < 0,001$.

5.4. Perfil de resistência aos antimicrobianos

Os resultados de CIM50, CIM90 e taxa de resistência aos respectivos antimicrobianos estão descritos na Tabela 8. Na Tabela 9 são discriminadas as distribuições dos valores de CIM observados para os diferentes antimicrobianos.

Tabela 8. Valores de amplitude, CIM50, CIM90, taxa de resistência e pontos de corte empregados para os antimicrobianos estudados.

Antimicrobiano	Amplitude ¹ (µg/mL)	CIM50 (µg/mL)	CIM90 (µg/mL)	Resistencia N (%)	Pontos de corte		
					Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	0,25 - 16	≤ 0,25	≤ 0,25	1 (0,5)	≤ 0,25	0,5	≥ 1,0
Ceftiofur	0,25 – 8	≤ 0,25	≤ 0,25	0	≤ 2,0	4,0	≥ 8,0
Penicilina	0,12 – 1	≤ 0,12	≤ 0,12	3 (1,4)	≤ 0,5	0,25	≥ 1,0
Doxiciclina	0,5 - 8	4,0	> 8,0	159 (74,0)	≤ 0,5	1,0	≥ 2,0
Oxitetraciclina	0,5 - 8	8,0	> 8,0	168 (78,1)	≤ 0,5	1,0	≥ 2,0
Marbofloxacina	0,06 - 4	1,0	1,0	9 (4,2)	≤ 1,0	2,0	≥ 4,0
Enrofloxacina	0,12 - 4	0,5	1,0	12 (5,6)	≤ 0,5	1,0	≥ 2,0
Florfenicol	0,25 - 8	2,0	4,0	7 (3,3)	≤ 2,0	4,0	≥ 8,0
Espectinomicina	8 - 128	16,0	32,0	17 (7,9)	≤ 32,0	64,0	≥ 128
Gentamicina	1 - 16	4,0	8,0	65 (30,2)	≤ 2,0	4,0	≥ 8,0
Neomicina	4 - 32	8,0	32,0	106 (49,3)	≤ 8,0	-	-
Sulfadimetoxina	256	> 256	> 256	156 (72,6)	≤ 256	-	≥ 512
Trimetoprima / sulfametoxazol	2/38	≤ 2/38	> 2/38	34 (15,8)	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Clindamicina	0,25 - 8	8,0	> 8,0	120 (55,8)	≤ 0,5	1,0 - 2,0	≥ 4,0
Tilosina	0,5 - 32	32,0	> 32,0	126 (58,6)	≤ 1,0	2,0	≥ 4,0
Tilmicosina	4 - 64	> 64,0	> 64,0	143 (66,5)	≤ 8,0	16,0	≥ 32,0
Tulatromicina	1 - 64	> 64,0	> 64,0	120 (55,8)	≤ 16,0	32,0	≥ 64,0
Tiamulina	0,5 - 32	≤ 0,5	4,0	4 (1,9)	≤ 16,0	-	≥ 32,0

1 – Amplitude das concentrações de antimicrobianos no painel utilizado.

Tabela 9. Distribuição dos valores de CIM obtidos dentre as estirpes estudadas. As amplitudes dos antimicrobianos estão contidas na área branca; os pontos de corte de resistência são indicados com linhas pretas verticais.

Antimicrobiano	Nº de estirpes/ CIM ($\mu\text{g/mL}$)												
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Ampicilina	0	0	214	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Ceftiofur	0	0	212	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
Penicilina	0	209	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Doxiciclina	0	0	0	49	7	20	45	69	25	0	0	0	0
Oxitetraciclina	0	0	0	42	5	7	22	30	109	0	0	0	0
Marbofloxacina	3	5	13	79	93	13	1	8	0	0	0	0	0
Enrofloxacina	0	17	72	91	24	3	0	8	0	0	0	0	0
Florfenicol	0	0	3	8	64	99	34	5	2	0	0	0	0
Espectinomicina	0	0	0	0	0	0	0	73	88	28	9	3	14
Gentamicina	0	0	0	0	31	39	80	52	12	1	0	0	0
Neomicina	0	0	0	0	0	0	68	41	47	37	22	0	0
Clindamicina	0	0	88	2	1	4	2	7	111	0	0	0	0
Tilosina	0	0	0	73	11	4	0	4	7	6	110	0	0
Tilmicosina	0	0	0	0	0	0	41	21	10	13	11	119	0
Tulatromicina	0	0	0	0	57	9	8	6	5	9	7	113	0
Tiamulina	0	0	0	122	33	31	11	8	6	3	1	0	0

Pode-se observar as altas taxas de resistência às tetraciclina, macrolídeos, clindamicina e sulfadimetoxina, enquanto os antimicrobianos mais eficazes foram os β -lactâmicos, fluoroquinolonas, tiamulina e florfenicol. Os aminoglicosídeos também se destacam, pois mais de 30% das estirpes de *S. suis* foram resistentes à gentamicina e neomicina, sendo que 92,1% são susceptíveis à espectinomicina.

Considerando o critério de multirresistência descrito por Schwarz et al. (2010) (resistência a três ou mais classes de antimicrobianos), 72,1% (155/215) das estirpes avaliadas foram caracterizadas como multirresistentes (Tabela 10). Existe diferença estatística significativa de forma que as estirpes mais susceptíveis (não multirresistentes) apresentam maior proporção entre os anos de 2001 a 2003, enquanto as estirpes mais resistentes (resistência a mais de seis classes de antimicrobianos) apresentam maiores proporções nos anos a partir de 2009. Destaca-se também a alta frequência de estirpes com resistência a três até cinco classes de antimicrobianos entre os anos de 2001 a 2003, indicando que apesar do período de isolamento as estirpes de *S. suis* já apresentavam pressão de seleção de multirresistência.

Em relação à distribuição da multirresistência dentre os sorotipos identificados no presente estudo (Tabela 11), não foi detectada diferença estatística possivelmente devido ao viés do grande número de estirpes do sorotipo 2 / ½; no entanto, pode-se observar que a maioria das estirpes dos outros sorotipos apresenta resistência a três até cinco classes de antimicrobianos.

Tabela 10. Distribuição das estirpes estudadas conforme ano de isolamento e número de classes de antimicrobianos resistentes – N (%).

Número de classes	Ano			Total
	2001 – 2003	2009 – 2012	2013 – 2016	
≤ 2	48 (80,0)	11 (18,3)	1 (1,7)	60 (100)
3 - 5	79 (55,6)	36 (25,4)	27 (19)	142 (100)
6 - 8	3 (23,1)	3 (23,1)	7 (53,8)	13 (100)
Total	130 (60,5)	50 (23,30)	35 (16,3)	215 (100)

Probabilidade estimada pelo teste de Fisher-Freeman-Halton $p < 0,001$.

Tabela 11. Distribuição das estirpes estudadas conforme sorotipo e número de classes de antimicrobianos resistentes – N (%).

Sorotipo	Número de classes resistentes			Total
	0 - 2	3 - 5	6 - 8	
2 / ½	56 (31,5)	112 (62,9)	10 (5,6)	178 (100)
3	2 (20,0)	7 (70,0)	1 (10,0)	10 (100)
1 / 14	1 (16,7)	5 (83,3)	0	6 (100)
NT	0	6 (100)	0	6 (100)
7	0	3 (60,0)	2 (40,0)	5 (100)
18	0	3 (100)	0	3 (100)
8	0	2 (100)	0	2 (100)
4	0	1 (100)	0	1 (100)
6	0	1 (100)	0	1 (100)
9	0	1 (100)	0	1 (100)
27	1 (100)	0	0	1 (100)
28	0	1 (100)	0	1 (100)
Total	60 (27,9)	142 (66,0)	13 (6,0)	215 (100)

Probabilidade estimada pelo teste de Fisher-Freeman-Halton $p = 0,380$.

A partir dos resultados de CIM foram identificados os perfis de resistência e construído o dendrograma (Figura 4) que possibilita a distinção das estirpes estudadas em nove grupos principais, denominados R1 a R9.

Os agrupamentos R1 e R2 são compostos por 24 estirpes isoladas nos anos de 2001 e 2002, quase na sua totalidade, sendo estas as estirpes de menor resistência aos antimicrobianos testados. Pode-se observar também uma maior proporção do perfil de virulência V5 (18/24 – 75,0%) nestas estirpes menos resistentes. No grupo R3 foram reunidas 33 estirpes isoladas entre anos de 2001 a 2010. No entanto, ainda não se observa um aumento importante da resistência, sendo detectadas apenas cinco

estirpes multirresistentes neste agrupamento. O perfil de virulência V2 apresenta maior frequência nestas estirpes (21/33 – 63,6%).

Já o grupo R4, é composto por 16 estirpes sendo todas multirresistentes e caracterizadas por apresentarem resistência às tetraciclínas, aminoglicosídeos e sulfonamidas. Este mesmo padrão de resistência se mantém no grupo R5 que apresenta ainda resistência aos macrolídeos. De forma semelhante, o agrupamento é composto por 17 estirpes sendo todas multirresistentes e isoladas, em sua maioria (15/17 – 88,2%), entre os anos de 2002 e 2003.

As estirpes que compõem os grupos R6 a R9 são caracterizadas como multirresistentes sendo todas resistentes aos macrolídeos e lincosamidas. O grupo R7 é composto por 39 estirpes resistentes às tetraciclínas, sulfonamidas, macrolídeos e lincosamidas.

Os agrupamentos R8 e R9 são compostos pelas estirpes de maior resistência, com destaque para R9 que contém as estirpes resistentes de seis a oito classes de antimicrobianos. Esses grupos são caracterizados por resistência a tetraciclínas, aminoglicosídeos, sulfonamidas, macrolídeos e lincosamidas. Apesar de não se observar uma relação direta entre os perfis de resistência e as origens e sorotipos das respectivas estirpes, destaca-se que 72,0% (18/25) das respectivas isoladas entre os anos 2015 e 2016 fazem parte dos grupos R7, R8 e R9.

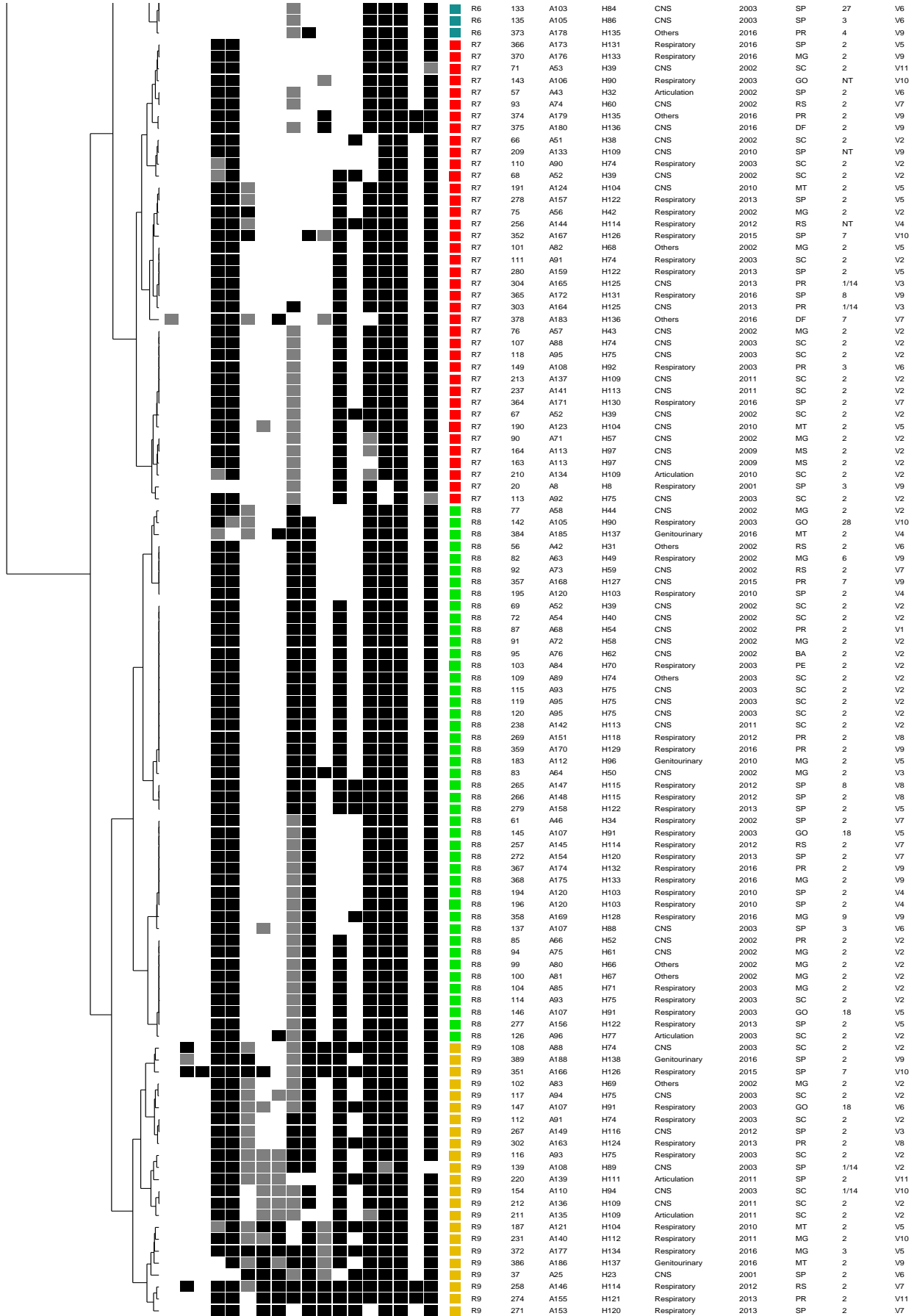


Figura 4: Análise de agrupamento dos perfis de resistência. Escala de cinza corresponde aos resultados de resistência observados (susceptível - em branco, intermediário - cinza, resistente - preto).

5.5. Análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)

Na caracterização pelo AFLP foram identificados 30 perfis (A1 – A30). A análise de agrupamento resultou no dendrograma apresentado na Figura 5. Não foi identificado agrupamentos com relação a sítio de isolamento, animal, granja e perfil de resistência antimicrobiana. Com respeito ao estado também não foi possível identificar agrupamentos com exceção dos perfis A5 e A13 sendo compostos em sua totalidade por estirpes de São Paulo. Dentre os perfis identificados, destacam-se os dois maiores que são o agrupamento A3 que é composto por 13% (28/215) das estirpes estudadas, sendo que 67,8% (19/28) destas são do sorotipo 2, 3,5% (1/28) do sorotipo 1 / 14, 3,5% (1/28) sorotipo 18, 3,5% (1/28) sorotipo 27, e 21,5% (6/28) do sorotipo 3; e o agrupamento A4 é composto por 47,4% (102/215) das estirpes estudadas, sendo que 94,0% (96/102) destas são do sorotipo 2, 0,98% (1/102) do sorotipo 7, a mesma porcentagem 0,98% (1/102) do sorotipo 8 e 3,9% (4/102) do sorotipo 1 / 14.

Dentre os 30 perfis, 12 são compostos apenas por estirpes do sorotipo 2. Os sorotipos 4 e 27 encontram-se distribuídos em perfis distintos A16 e A3 respectivamente, e em conjunto com estirpes do sorotipo 2 com exceção do perfil A25 que é formado por uma única estirpe do sorotipo 6 e o A26 que é formado por duas estirpes uma do sorotipo 28 e outra não tipável. Os demais sorotipos, 3, 7, 9, 18, 1 / 14 e as estirpes não tipáveis, ficaram distribuídos em mais de um perfil.

Pode-se observar uma tendência de agrupamento das estirpes por ano de isolamento, os perfis A5, A6, A11, A13, A18, A25, e A26 são compostos em sua maioria por estirpes isoladas de anos anteriores a 2009; já os perfis A1, A2, A10, A12, A14, A15, A16, A17, A19, A20, A22, A23, A24, A27, A28, A29 e A30 compostos por estirpes

isoladas a partir de 2010. Em relação ao perfil A3, observa-se maior variabilidade da origem das estirpes que o compõe sendo que 71,4% (20/28) destas foram isoladas entre os anos 2001 e 2009, e 28,6% (8/28) a partir de 2010. E com relação ao perfil A4, observa-se maior variabilidade da origem das estirpes que o compõe sendo que 75,5% (77/102) destas foram isoladas entre os anos 2001 e 2009, e 24,5% (25/102) a partir de 2010.

Em relação à comparação entre os pulsotipos identificados no AFLP e PFGE não foi observado um agrupamento marcante. Entre os grupos mais homogêneos em relação aos pulsotipos, estão A5 formado só por estirpes dos pulsotipos P27 e P28 e os perfis A26 e A27 agrupando estirpes dos pulsotipos P1 e P58 respectivamente.

Com respeito a agrupações, os perfis de virulência identificados somente se agruparam com alguns perfis de virulência, os perfis A1, A5 e A21 são formados por estirpes com perfil de virulência V5; e o A16 e A28 com estirpes de virulência V9 e os perfis A26 e A27 unicamente com estirpes do perfil V10.

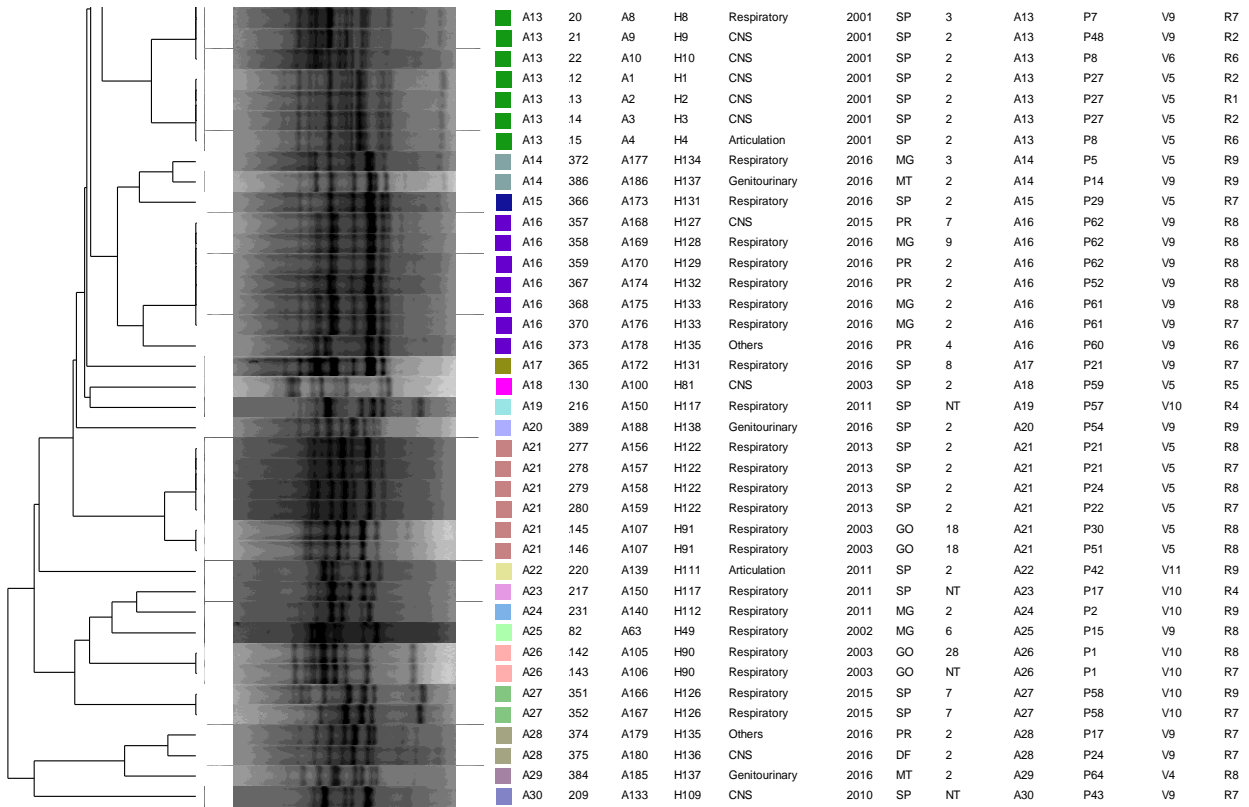


Figura 5: Dendrograma ilustrando as relações entre os perfis de restrição de *S. suis* pela técnica AFLP.

5.6. Análise da eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Na análise de agrupamento dos perfis de restrição do PFGE foram identificados 64 pulsotipos (P1 – P64). No respectivo dendrograma (Figura 6), pode-se observar a distinção de dois agrupamentos principais. O primeiro grupo compreende 20 pulsotipos (P1 – P20), sendo que estes apresentam maior heterogeneidade entre os perfis de restrição quando comparado com o segundo grupo.

O segundo grupo é composto por 161 estirpes; estas estão agrupadas em 42 pulsotipos (P23 – P64) que apresentam maior homogeneidade entre os perfis de restrição. Destaca-se que dentre estas estirpes 60,2% (97/161) foram classificadas como perfil A4 no AFLP e a maioria delas (87,6%, 85/97), foi isolada entre os anos 2001 e 2009. Dentro deste grupo estão incluídos os pulsotipos de maior abrangência (P27, P35, P37 e P39) que compreendem 34,0% das estirpes estudadas, e que apresentam uma tendência de agrupamento segundo o ano de isolamento sendo que apenas 4,2% (9/215) estirpes isoladas em anos posteriores a 2010.

Dentre os 64 pulsotipos, pode-se observar uma tendência de agrupamento das estirpes por ano de isolamento; no entanto, não foi detectada associação entre os pulsotipos e as características de origem, sítio de isolamento, estado e perfil de resistência aos antimicrobianos das estirpes estudadas. Destaca-se que 36 pulsotipos, entre eles os maiores (P28, P35, P37 e P39), são compostos por estirpes do sorotipo 2. Também se identificou 13 pulsotipos formados unicamente por outros sorotipos e que não apresentam estirpes do sorotipo 2.

Em relação à associação entre genótipos de macrorestrição e os perfis de virulência, pode-se observar que os pulsotipos P3, P4, P6 e P20 são compostos inteiramente por

estirpes caracterizadas como V6, o segundo maior perfil de virulência identificado. De forma semelhante, as estirpes que compõem o maior perfil de virulência (V2) estão distribuídas em grande proporção entre os maiores genótipos de PFGE - P27 (25/42), P34 (5/6), P35 (7/8), P39 (14 / 15) e P40 (5/6).

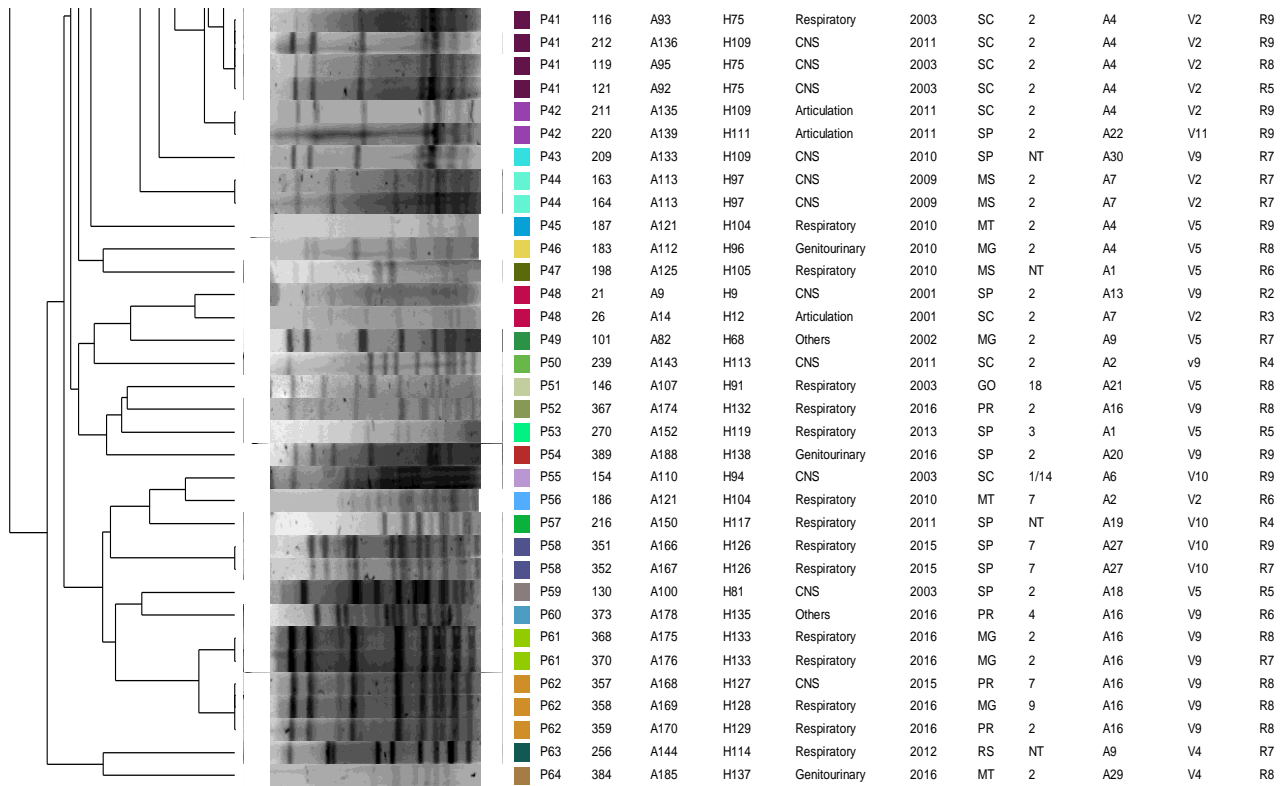


Figura 6: Dendrograma ilustrando as relações entre os perfis de restrição de *S. suis* pela técnica PFGE.

5.7. Análise genômica

Os resultados obtidos nas avaliações *in silico* de sorotipagem, pesquisa de marcadores de resistência e MLST são apresentados no Quadro 2. Não foram detectados marcadores de plasmídeos e apenas três genes de resistência foram identificados nos genomas brasileiros; destaca-se o gene *ermB*, que codifica resistência à macrolídeos e lincosamidas, que foi detectado em 79,2% das estirpes estudadas.

Em relação à MLST, foram identificadas: oito novas sequências de alelos para os genes *cpn60*, *dpr* e *gki*, e uma nova combinação de alelos de tal forma que foram identificadas seis novas STs dentre os 24 genomas analisados. Essas sequências novas, e seus respectivos polimorfismos, foram confirmados por mapeamento manual. Estas serão encaminhadas para o banco de dados do PubMLST para a atribuição das respectivas numerações de alelos e STs.

Para a estirpe 24, foram identificadas duas possibilidades de alelos para os genes *aroA*, *dpr*, *recA* e *thrA*, com 100% de identidade nucleotídica. Esta situação é indicativa de que mais de uma estirpe de STs diferentes foram sequenciadas conjuntamente. Esta situação foi confirmada pela análise *in silico* da sorotipagem, tanto pelo protocolo de Athey et al. (2016) quanto pelo de Okura et al. (2013), na qual foram detectados marcadores com 100% de identidade nucleotídica para os sorotipos 1 e 3 (Quadro 2).

Para a avaliação *in silico* da sorotipagem foi realizada primeiramente a busca dos marcadores propostos Athey et al. (2016). Estes correspondem a fragmentos internos dos genes capsulares variando de 147 a 1.273 pb. Dentre os genomas estudados, foram identificados com 100% de identidade os marcadores relacionados aos sorotipos 1, 2, 3, 4, 7, 8, 17 e 18, sendo que 2 e 3 apresentaram maior frequência (37,5 e 20,8 %

respectivamente). Destacam-se as duas estirpes classificadas anteriormente pela sorotipagem molecular como NT (198 e 256) que a partir da análise genômica foram caracterizadas como sorotipos 17 e 9, respectivamente. Apenas nas estirpes 256 e 358 foi observada variação na identidade nucleotídica na detecção do marcador do sorotipo 9 (96,7%).

A diferenciação dos sorotipos 1/14 e 2/1/2 foi realizada pela comparação da sequência codificadora de CpsK, especificamente na posição 161, que apresenta um resíduo de triptofano para os sorotipos 2 e 14, enquanto uma cisteína é observada nesta posição para os sorotipos 1/2 e 1 (ATHEY et al., 2016).

Para a confirmação foi realizado também o mapeamento com as sequências dos genes capsulares dos respectivos sorotipos publicadas por Okura et al. (2013), que variam de 15.401 a 46.639 pb. Os resultados obtidos corroboram os observados com os marcadores de Athey et al. (2016), incluindo a variação de identidade para as estirpes 256 e 358 com os marcadores do sorotipo 9 (aproximadamente 97,2% de identidade nucleotídica). Destacou-se também a estirpe 198 para a qual foi observada maior variação de identidade em relação à sequência de *loci* capsular (82,5% de identidade) do que aos marcadores internos propostos por Athey et al. (2016).

Quadro 2. Informações de origem e resultados obtidos para as estirpes de *S. suis* selecionadas para sequenciamento de genoma.

Genoma	Estirpe	Granja	Ano	Sitio de isolamento	Sorotipagem		MLST								Genes de resistência		
					<i>cps_A</i> ¹	<i>cps_O</i> ²	<i>aroA</i>	<i>cpn60</i>	<i>dpr</i>	<i>gki</i>	<i>mutS</i>	<i>recA</i>	<i>thrA</i>	ST	<i>ant(6')-la</i>	<i>ermB</i>	<i>tetO</i>
Ss1	24	H11	2001	Respiratório	1 / 3	1 / 3	1 / 31	1	1 / 5	1	31	1 / 4	1 / 25		+	+	-
Ss7	152	H93	2003	Articulação	1	1	1	NA	1	1	1	1	1	N_ST	-	-	-
Ss3	45	H27	2001	SNC	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-
Ss4	47	H27	2002	SNC	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-
Ss5	88	H55	2002	SNC	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-
Ss6	121	H75	2003	SNC	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	-	+	+
Ss11	77	H44	2002	SNC	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	-	+	+
Ss13	189	H104	2010	SNC	2	2	1	1	1	4	1	1	1	161	+	+	-
Ss18	108	H74	2003	SNC	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	-	+	+
Ss19	116	H75	2003	Respiratório	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	-	+	+
Ss20	267	H116	2012	SNC	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	-	+	-
Ss2	34	H20	2001	SNC	3	3	31	30	5	34	31	4	25	35	-	+	-
Ss8	372	H134	2016	Respiratório	3	3	31	21	5	45	44	22	23	969	-	+	+
Ss12	136	H87	2003	SNC	3	3	31	30	5	34	31	4	25	35	-	+	-
Ss10	20	H8	2001	Respiratório	3	3	31	30	5	34	31	4	25	35	-	+	-
Ss21	270	H119	2013	Respiratório	3	3	31	21	5	45	44	22	4	N_ST	-	-	-
Ss17	373	H135	2016	Outros	4	4	8	NA	NA	20	28	7	4	N_ST	-	+	-
Ss9	378	H136	2016	Outros	7	7	8	30	5	34	30	3	25	29	-	+	-
Ss16	365	H131	2016	Respiratório	8	8	18	1	5	12	1	10	1	14	-	+	+
Ss24	265	H115	2012	Respiratório	8	8	18	1	5	NA	1	10	1	N_ST	-	+	+
Ss15	256	H114	2012	Respiratório	9*	9*	5	17	5	12	1	10	4	16	-	+	+
Ss22	358	H128	2016	Respiratório	9*	9*	5	1	5	12	1	10	1	147	-	+	+
Ss14	198	H105	2010	Respiratório	17	17**	8	NA	NA	24	21	22	12	N_ST	-	+	-
Ss23	147	H91	2003	Respiratório	18	18	8	NA	NA	24	21	22	12	N_ST	-	+	-

1 – Comparação com banco de marcadores capsulares descrito por Athey et al. (2016); 2 - Comparação com banco de marcadores capsulares descrito por Okura et al. (2013); 9* - alinhamento com marcador capsular do sorotipo 9 com 96,7% a 97,2% de identidade; 17** - alinhamento com marcador capsular do sorotipo 17 com 82,5% de identidade; NA – Novo alelo; N_ST - nova ST.

Apesar de não haver uma correlação direta entre STs e sorotipos de *S. suis*, foi confirmado a partir do banco de dados do PubMLST que as STs aqui identificadas foram descritas nos mesmos sorotipos detectados nos genomas estudados.

Apesar de ser observada uma variação em relação a cobertura dos sequenciamentos, 95,8% dos genomas estudados apresentaram mais de 97X de cobertura. Destacou-se apenas o genoma Ss19 (estirpe 116) para a qual foi obtida cobertura de 52X. A variação de cobertura é um dos fatores que interfere na qualidade da montagem dos genomas e nos resultados de análise comparativa, incluindo até mesmo falhas de mapeamento. Os valores de cobertura obtidos são apresentados no Quadro 3.

Em relação à montagem *ab initio*, as métricas das respectivas montagens são apresentadas no Quadro 3. O alto número de *scaffolds* e conseqüentemente o menor tamanho de N50 são indicativos de montagem problemática, assim como a variação no tamanho obtido para os genomas com valores abaixo do esperado para a espécie (entre 1,8 a 2,1 Mb). Os resultados apresentados foram obtidos a partir do programa Unicycler; foram testados também os programas Velvet (ZERBINO & BIRNEY, 2008), com variação de *k-mers*, e A5_MiSeq (COIL et al., 2015) (dados não apresentados) sendo que as métricas dessas montagens apenas pioraram.

Considerando a qualidade das montagens obtidas e que estas não representam a completude dos genomas estudados, optou-se em continuar as análises com uma abordagem de mapeamento utilizando referências dos sorotipos de interesse disponibilizadas no GenBank. Além da comparação dos *consensus* obtidos foi realizada também a análise wgSNP a partir desses mapeamentos. Estas análises focaram nos genomas dos sorotipos 2 e 3 que se apresentavam em maior número.

Quadro 3: Métricas das montagens dos genomas de *S. suis* estudados (N50 e tamanhos dos genomas em pares de bases - pb).

Genoma	Estirpe	Scaffolds	N50	Tamanho	CG%	Cobertura
Ss1	24	909	4.619	3.178.727	39,9	170
Ss2	34	316	7.438	1.675.368	40,1	174
Ss3	45	281	8.010	1.572.982	40,2	134
Ss4	47	305	7.885	1.529.131	39,9	165
Ss5	88	309	7.595	1.600.041	39,7	165
Ss6	121	389	4.781	1.432.571	39,1	98
Ss7	152	313	7.306	1.552.548	39,7	143
Ss8	372	322	6.891	1.641.068	39,8	145
Ss9	378	282	8.244	1.687.840	40,3	199
Ss10	20	308	8.227	1.650.238	40	148
Ss11	77	254	10.410	1.731.849	40,1	196
Ss12	136	351	6.699	1.591.190	39,8	188
Ss13	189	198	13.617	1.835.348	40,6	242
Ss14	198	452	5.515	1.759.876	39,6	152
Ss15	256	373	7.787	1.918.711	39,6	204
Ss16	365	272	11.009	1.837.222	40,1	164
Ss17	373	331	7.252	1.661.856	39,6	191
Ss18	108	290	8.765	1.680.215	40,1	189
Ss19	116	408	4.149	1.337.147	38,9	52
Ss20	267	332	6.163	1.527.962	39,7	137
Ss21	270	347	7.094	1.729.096	39,9	179
Ss22	358	352	6.731	1.670.730	39,5	162
Ss23	147	459	5.156	1.742.775	39,3	201
Ss24	265	360	6.239	1.630.262	39,4	147

Em relação as estirpes do sorotipo 2, foi observado mais de 94% de mapeamento das *reads* com a referência CS100322 (NZ_CP024050.1). Pode-se observar que a principal região de diferença entre os genomas brasileiros e a referência (de origem chinesa), destacada com o asterisco vermelho na Figura 7, trata-se de um elemento genético móvel denominado CMGETZ080501 (número de acesso KX077897.1). Esta região é ausente nas estirpes 45 e 47 (genomas Ss3 e Ss4), enquanto os demais genomas brasileiros apresentam determinada região deste elemento genético móvel (Figuras 7 e 8).

Nas estirpes 88, 77 e 267 (genomas 5, 11 e 20), foi observado que restaram mais de 10.000 *reads* após o mapeamento (*reads* “não mapeadas”), e foi realizada a montagem *ab initio* deste material. Os *contigs* obtidos maiores que 1000 pb foram comparados com o banco de sequências não redundantes do *GenBank*, pela ferramenta BLASTn, e apresentaram alta similaridade com regiões de sequências de prófagos e elementos integrativos e conjugativos (ICEs) descritos em *S. suis* e *S. dysgalactiae*.

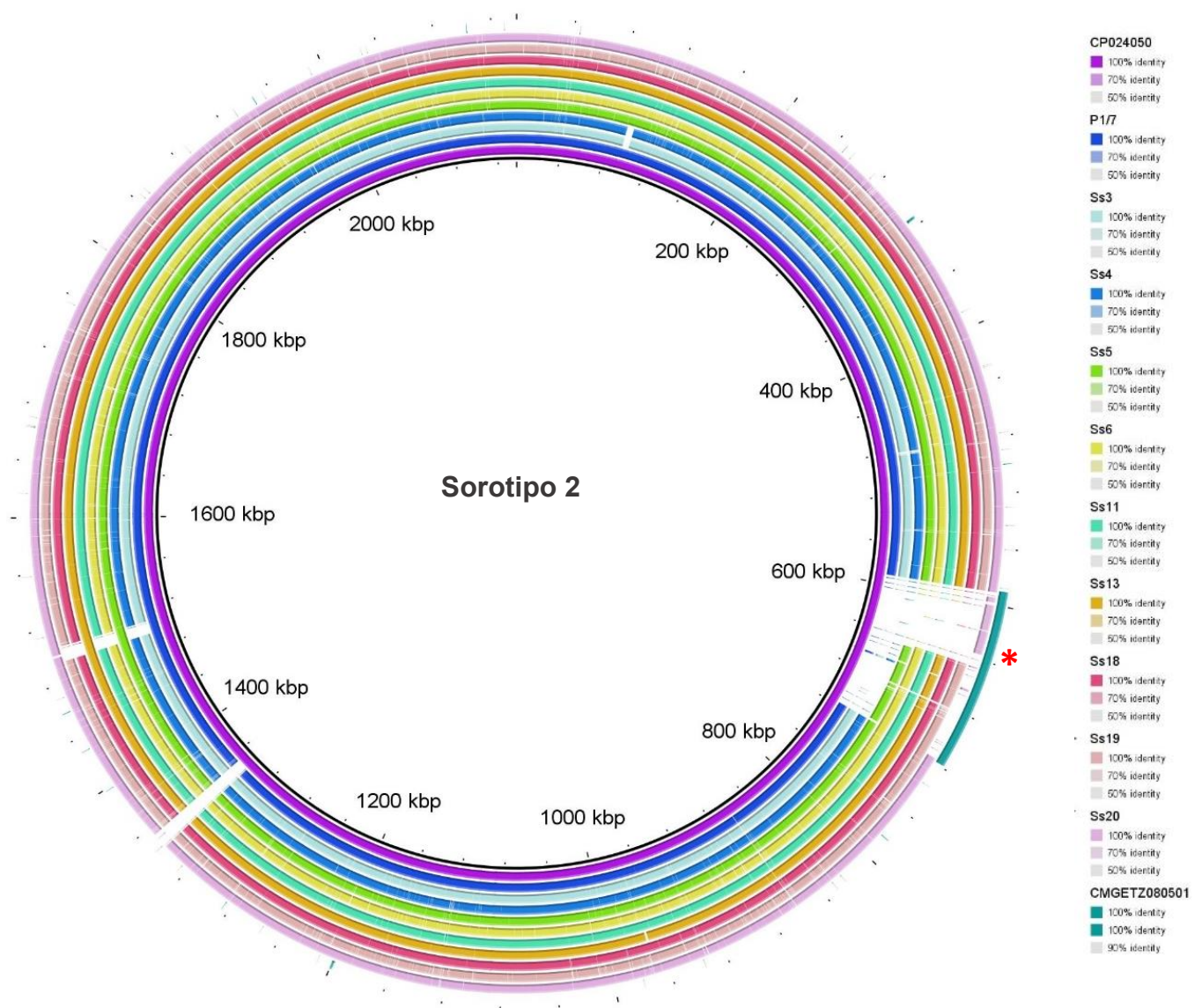


Figura 7: Comparação circular dos *consensus* de mapeamento dos genomas estudados de *S. suis* sorotipo 2 utilizando como referência *S. suis* estirpe CS100322.

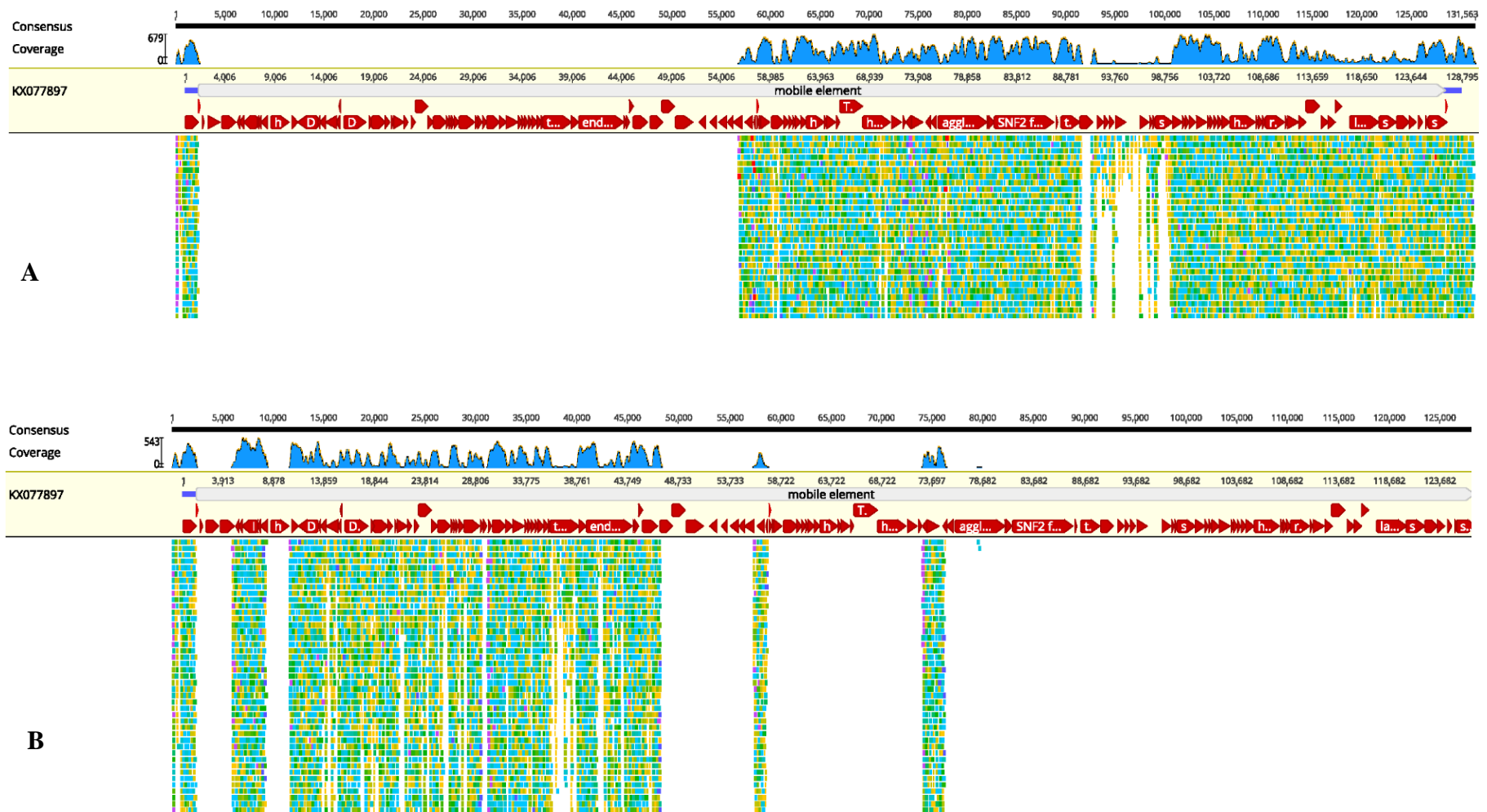


Figura 8: Detalhes do mapeamento dos genomas de *S. suis* sorotipo 2 – Ss18 (A) e Ss20 (B) – com o elemento genético móvel CMGETZ080501. O genoma Ss20 se destaca por ser o único a apresentar a região inicial de ~52 kb e não apresentar os ~72 kb restantes do elemento genético móvel que estão presentes nos demais genomas brasileiros do sorotipo 2 com exceção de Ss3 e Ss4.

A partir da análise de wgSNP (Figura 9) também pode se observar a distinção das estirpes 45 e 47 (genomas Ss3 e Ss4) que apresentam 417 e 440 SNPs comparadas à referência. Nesta análise a estirpe 189 (genoma Ss13) também se distancia dos demais com 388 SNPs. O agrupamento das estirpes brasileiras de maior similaridade à referência apresenta uma variação de 36 a 44 SNPs, sendo que a estirpe 267 (genoma Ss20) se diferencia um pouco das demais deste grupo conforme observado anteriormente na Figura 7.

Em relação às estirpes do sorotipo 3, para as estirpes 34, 20 e 136 (genomas Ss2, Ss10 e Ss12) foi observado mais de 91% de mapeamento das *reads* com a referência YB51 (NC_022516.1). No entanto, as estirpes 372 e 270 (genomas Ss8 e Ss21) apresentaram maior similaridade à estirpe *S. suis* SH1510 (NZ_CP030124.1) do sorotipo 4. Na Figura 10 pode-se observar esta distinção entre as estirpes brasileiras do sorotipo 3 e os genomas utilizados como referência dos sorotipos 3 e 4.

Neste caso, a análise de wgSNP foi realizada com as referências dos dois sorotipos (Figuras 11 e 12). A maior similaridade das estirpes 34, 20 e 136 (genomas Ss2, Ss10 e Ss12) com a referência YB51 (NC_022516.1) foi confirmada com a detecção de apenas um SNP de diferença entre estas, enquanto que as estirpes 372 e 270 (genomas Ss8 e Ss21) se separam deste agrupamento do sorotipo 3 com mais de 4.495 SNPs de diferença (Figura 11). Na análise de wgSNP com a referência SH1510 (NZ_CP030124.1) do sorotipo 4, observa-se maior similaridade das estirpes 372 e 270 (genomas Ss8 e Ss21), principalmente da estirpe 270 que apresenta apenas 182 SNPs de diferença comparada a estirpe 372 com 1.212 SNPs (Figura 12). Nesta análise foi adicionada também a estirpe 373 (genoma Ss17) identificada como sorotipo 4; porém esta não apresenta alta similaridade com a

referência SH1510 (NZ_CP030124.1), mas sim com a referência *S. suis* 6407 (NZ_CP008921) também do sorotipo 4 (Figura 13).

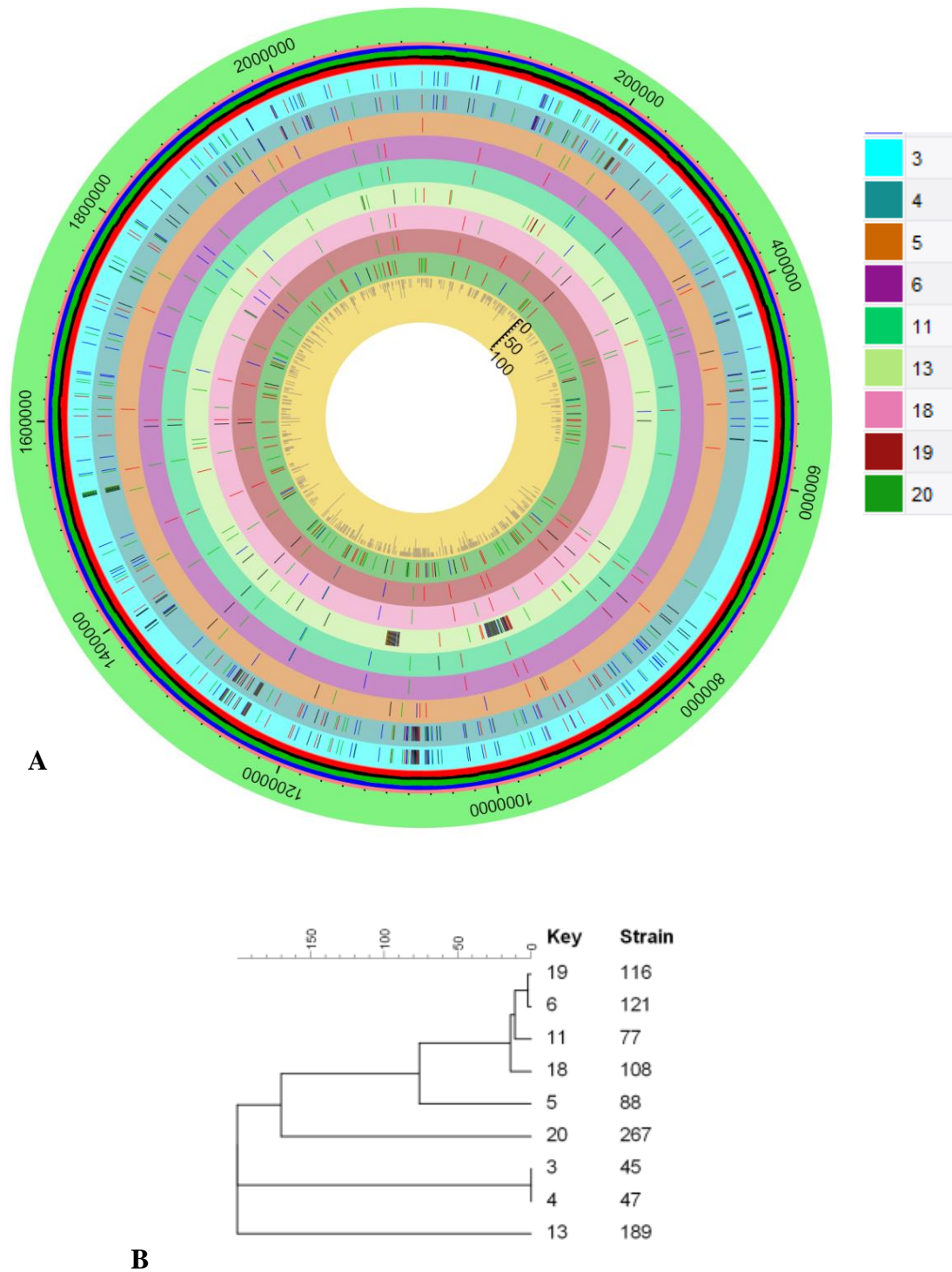


Figura 9: Representação esquemática da análise de wgSNP das estirpes de *S. suis* sorotipo 2. Representação dos SNPs identificados (A) e respectiva análise de agrupamento (B) segundo a referência utilizada.

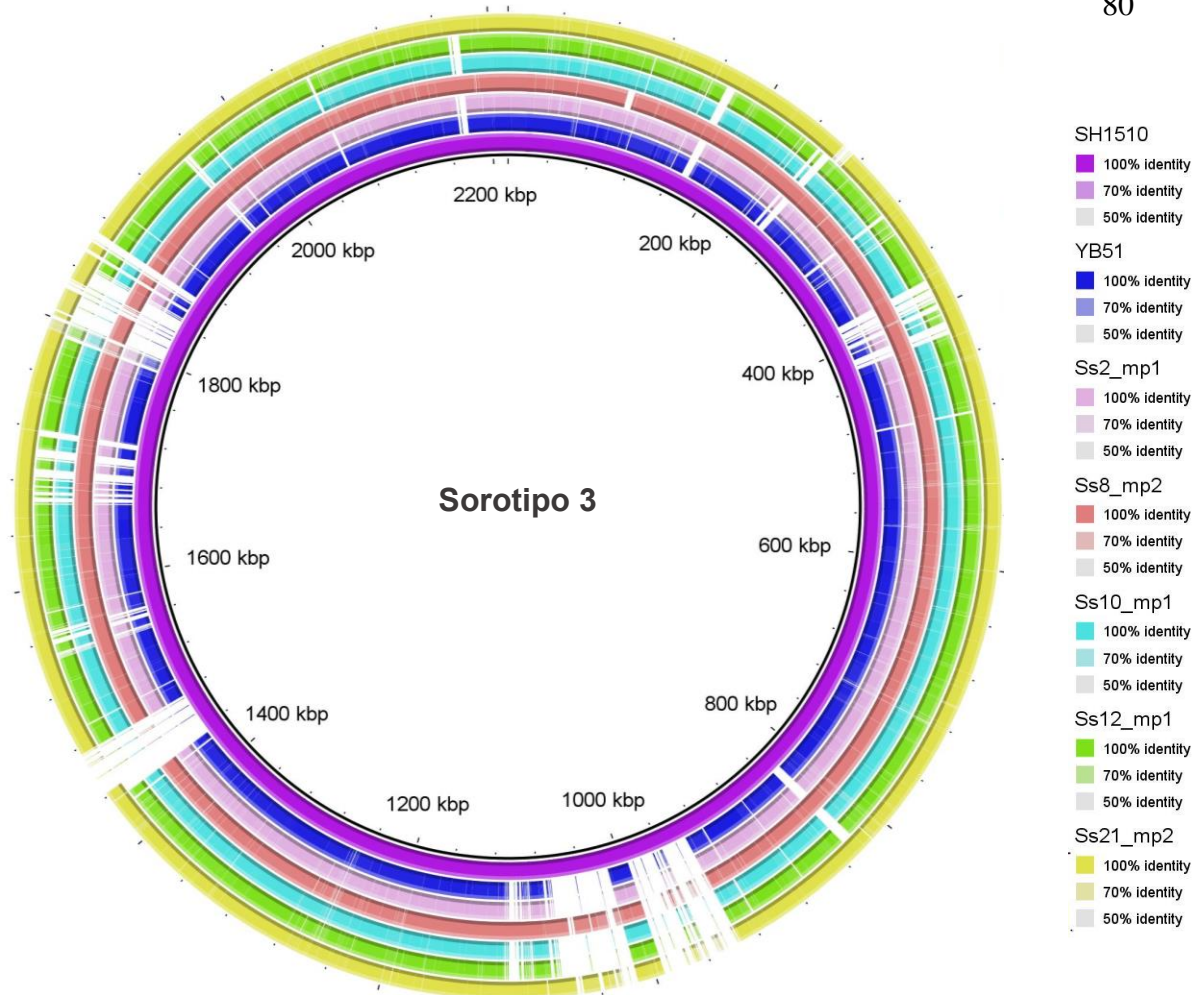


Figura 10: Comparação circular dos *consensus* de mapeamento dos genomas estudados de *S. suis* sorotipo 3 utilizando como referência *S. suis* estirpe SH1510.

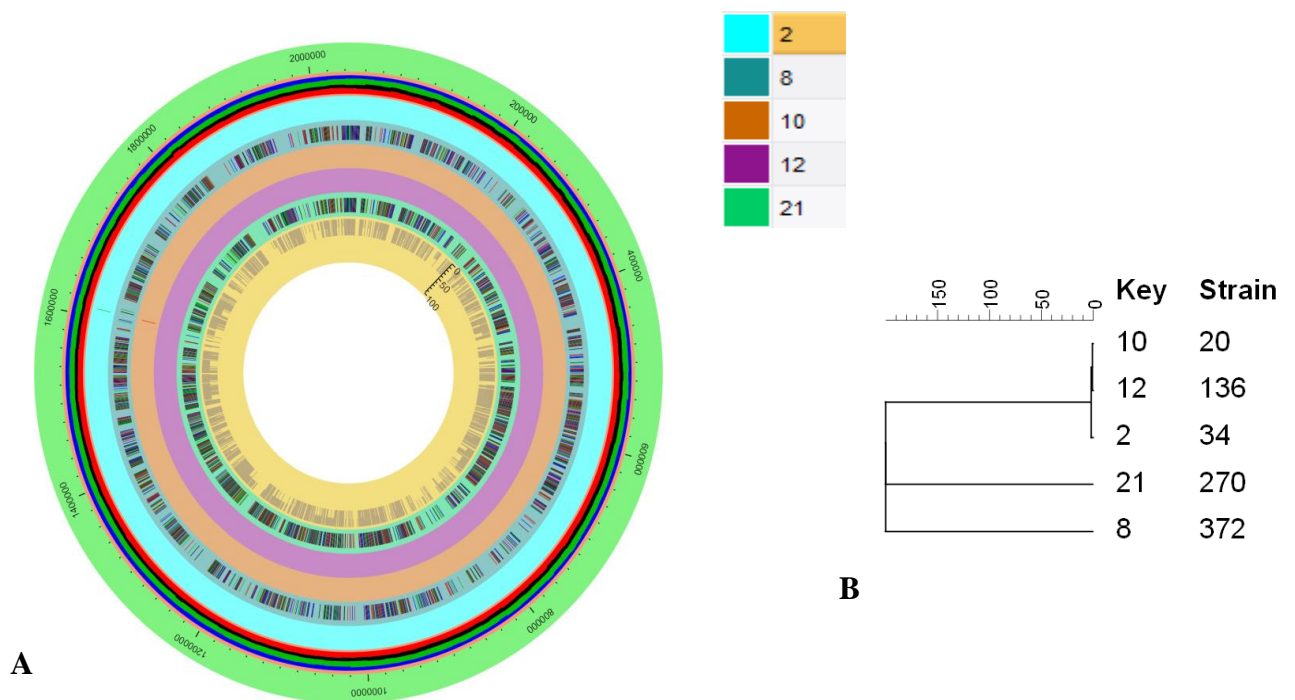


Figura 11: Representação esquemática da análise de wgSNP das estirpes de *S. suis* sorotipo 3. Representação dos SNPs identificados e respectiva análise de agrupamento segundo a referência utilizada.

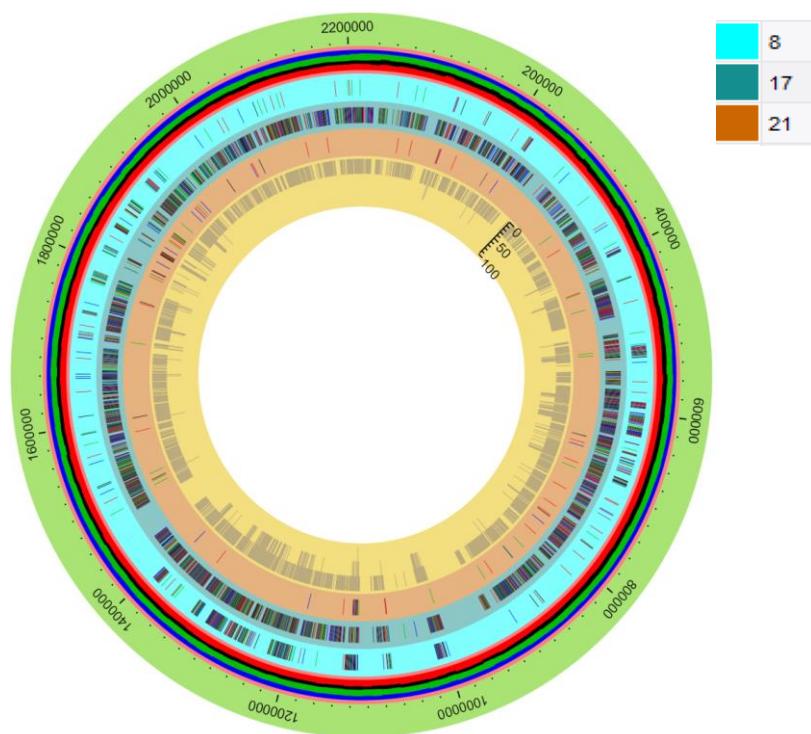


Figura 12: Representação esquemática dos SNPs identificados na análise de wgSNP com os genomas Ss8, Ss21 e Ss17 dos sorotipos 3 e 4, utilizando como referência a estirpe *S. suis* SH1510 (NZ_CP030124.1) do sorotipo 4.

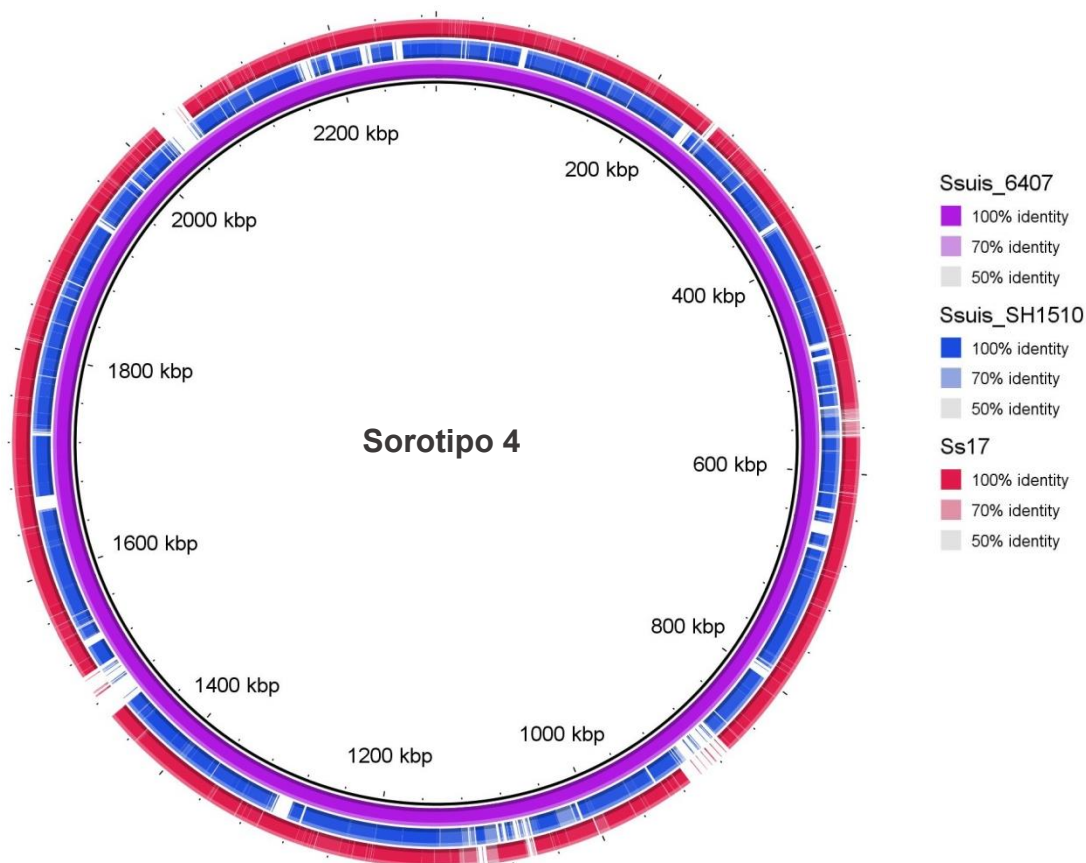


Figura 13: Comparação circular do *consensus* de mapeamento do genoma de *S. suis* sorotipo 4 utilizando como referência *S. suis* estirpe 6407.

6. DISCUSSÃO

Streptococcus suis é um dos agentes patogênicos de maior impacto na suinocultura (FITTIPALDI et al., 2012). Além disso, também apresenta potencial zoonótico para quem trabalha direta ou indiretamente na produção de suínos (FENG et al., 2014). Dessa forma, a completa caracterização fenotípica e genética do agente é de extrema importância para o entendimento de sua epidemiologia e controle.

No Brasil, o sorotipo 2 é descrito como o de maior prevalência seguido, de forma decrescente, pelos sorotipos 1/2, 14, 7 e 9 (MARTINEZ et al., 2003; COSTA et al., 2005; ROCHA et al., 2012; CALDERARO et al., 2016). Os resultados da sorotipagem molecular, do presente projeto, corroboram a literatura com predomínio do sorotipo 2, que foi identificado em 82,8% das estirpes de todos os sítios e anos de isolamento. Além do sorotipo 2, foram detectados mais 11 sorotipos distintos (3, 4, 6, 7, 8, 9, 17, 18, 27, 28, 1/14), sendo este o primeiro relato do sorotipo 27 no país.

Destaca-se que apenas 2.7% das estirpes estudadas foram caracterizadas como não tipáveis pela sorotipagem molecular. Okura et al. (2014) já descreveram mais de 15% das estirpes de *S. suis* como não tipáveis tanto pela sorotipagem convencional (coaglutinação) quanto pela molecular. Os autores sugeriram que essas estirpes poderiam apresentar alterações de composição de cápsula com deleção dos genes *cps* detectados no protocolo de sorotipagem molecular.

De acordo com o sistema de categorização de patótipos publicado anteriormente (ESTRADA et al., 2019; WEINERT et al., 2015), a partir das informações clínicas e do sítio de isolamento as estirpes de *S. suis* podem ser classificadas em: “patogênicas” quando isoladas do SNC, articulações, coração ou fígado e relatadas

como a principal causa de meningite, artrite, pericardite ou septicemia; "possivelmente oportunistas" quando isoladas de pulmão de suínos apenas com pneumonia; e "comensais" quando isoladas do trato respiratório superior de animais assintomáticos ou sem histórico de infecção por *S. suis*. Considerando esta classificação, as estirpes brasileiras de *S. suis* avaliadas neste estudo podem ser consideradas como "possivelmente oportunistas" (72/215) ou como "patogênicas" (143/215), sendo que 74,1% destas foram isoladas do SNC.

Para a caracterização genotípica dos perfis de virulência, foram avaliados quatro genes (*sly*, *arcA*, *epf* e *mrp*). De acordo com a combinação da detecção e caracterização destes genes foram identificados 11 perfis de virulência no presente estudo. Trabalhos anteriores na Europa e Ásia relataram que a presença de três desses genes (*sly*, *epf*, *mrp*) está associada às estirpes mais virulentas para os sorotipos mais prevalentes em cada região geográfica (WISSELINK et al., 2000; GOTTSCHALK; SEGURA; XU, 2007; KIM et al., 2010). No presente estudo, os perfis de virulência de maior frequência (V1, V2 e V3) são positivos para estes mesmos genes sendo que 94,1% (97/103) dessas estirpes ainda são caracterizadas como sorotipo 2, corroborando com a literatura de que este é o sorotipo mais prevalente no Brasil (MARTINEZ et al., 2003; COSTA et al., 2005; ROCHA et al., 2012).

Apesar do alto número de estirpes que seriam consideradas "possivelmente oportunistas" no presente estudo, também foi observada uma associação positiva entre alguns perfis de virulência e sítios de isolamento, sendo estirpes invasivas isoladas do SNC caracterizadas como os perfis de maior potencial patogênico (V1, V2, V5 e V6).

Apenas 12 estirpes foram caracterizadas como negativas para os genes *sly*, *epf* e *mrp*, das quais oito são positivas para o gene *arcA*. Dentre estas estirpes, 75,0%

(9/12) são originárias do trato respiratório corroborando com a literatura de que perfis menos virulentos estão relacionados a infecções não invasivas (VECHT et al., 1991a). No entanto, três dessas estirpes de perfil aparentemente menos virulento foram caracterizadas como “patogênicas”, sendo isoladas do SNC e articulação. Estudos anteriores já relatavam a ocorrência de perfis de baixa virulência (poucos ou nenhum marcador de virulência) em estirpes consideradas invasivas. Gottschalk et al. (1998) descreveram 77,0% de estirpes invasivas com um perfil de virulência MRP- / EF-, enquanto Zheng et al. (2017) detectaram 78,5% das estirpes estudadas com perfil *mrp-* / *sly-* / *epf-* sendo que não foi identificada aparente relação com os respectivos sorotipos e origem.

O gene *arcA* foi detectado em 98,6% (212/215) das estirpes estudadas. A arginina deiminase, codificada pelo gene *arcA*, é descrita como fator facilitador para a sobrevivência de *S. suis* em condições ácidas (MANEERAT et al., 2017). Estudos anteriores também identificaram uma alta frequência deste gene em estirpes invasivas e respiratórias de *S. suis* isoladas de suínos e humanos (MANEERAT et al., 2013; UNTERWEGER et al., 2018), o que sugere que não se trata de um bom marcador de virulência.

No presente estudo não foram identificadas estirpes com sequência variante do gene *epf* utilizando os iniciadores descritos por Silva et al. (2006). Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (CALDERARO et al., 2016; DOTO et al., 2016), foi detectada baixa frequência de *epf* variante, entre 9,8% e 15,5%, nas estirpes isoladas no período de 2001 e 2003 utilizando os iniciadores descritos por (Wisselink et al. (2002). Estudos anteriores já relatavam baixa frequência das variantes de *epf* (WONGSAWAN et al., 2015) assim como sua ausência (GOTTSCHALK et al., 1998; SÁNCHEZ DEL REY et al., 2016; OH et al., 2017;

ZHENG et al., 2017) utilizando tanto os iniciadores descritos por Wisselink et al. (2002) quanto os de Silva et al. (2006).

As sequências variantes do gene *epf* parecem ser mais prevalentes em estirpes de *S. suis* originárias de javalis e humanos na Europa (BAUMS et al., 2007; EISENBERG et al., 2015); nestes estudos os autores ainda observaram maior proximidade entre as estirpes de origem humana e animal e até sugeriram maior potencial zoonótico dessas estirpes.

Dessa forma, apesar da clássica associação dos genes *sly*, *epf* e *mrp* com o fenótipo de virulência de *S. suis*, ainda não há um completo entendimento desta relação. Auger et al. (2017) e Segura et al. (2017) reiteraram que *S. suis* é uma espécie muito heterogênea o que dificulta a caracterização dos fatores de virulência. No entanto, os autores também afirmam que existe falta de reprodutibilidade entre os estudos decorrente de variações e discrepâncias no desenho experimental, incluindo os ensaios *in vitro*, as linhagens celulares, os modelos animais e os iniciadores utilizados. Dessa forma, a comparação de resultados é comprometida e os mecanismos de virulência de *S. suis* continuam sem completa elucidação.

Na análise de agrupamento do AFLP não foi detectada diferenciação dos genótipos em relação ao sítio de isolamento, perfil de virulência e outros dados epidemiológicos. Com respeito a sorotipagem, não foi observada distinção completa dos sorotipos dentre os perfis identificados. Para o sorotipo 2 foi observada grande heterogeneidade genética principalmente para as estirpes mais recentes, isoladas entre os anos de 2015 e 2016. Rehm et al. (2007) também não observaram clara distinção entre os perfis de AFLP e os sorotipos estudados, mas sim associação entre os perfis e a relevância clínica das estirpes (diferenciação de estirpes invasivas de não invasivas).

Os resultados da PFGE mostraram uma maior heterogeneidade entre os perfis de restrição; relatos anteriores mostraram descrições similares. Na década de 1990, já se relatava que as estirpes de *Streptococcus* pertencentes aos grupos A e B de Lancefield apresentavam uma variabilidade de 10 a 20 bandas a partir da macrorestrição (GORDILLO et al., 1993; TENOVER et al., 1995). Para *S. suis*, especificamente, já foi descrita variabilidade de cinco a 13 bandas nos perfis de restrição com a enzima *Sma*I (ALLGAIER et al., 2001; BERTHELOT-HÉRAULT et al., 2002; VELA et al., 2003).

Sekizaki et al. (2001) descreveram a presença e variação do sistema de modificação de restrição (R-M) em diferentes sorotipos de *S. suis*. Trata-se de um mecanismo no qual algumas bactérias expressam genes que estimulam a ação de endonuclease de restrição que cliva o DNA em uma sequência de reconhecimento específica e o metila no mesmo local de forma a evitar a clivagem pela enzima de restrição. Dessa forma, o sistema R-M determina a modificação dos sítios de restrição. Os autores propõem este como um mecanismo de defesa, protegendo o hospedeiro da invasão por DNA estranho. Dessa forma, a distribuição e variação do sistema de modificação de restrição dentre os sorotipos de *S. suis* poderia explicar a variabilidade observada entre os perfis de restrição da PFGE para a espécie e até mesmo o gênero *Streptococcus*.

No presente estudo foi observada uma tendência de agrupamento das estirpes apenas por ano de isolamento; estes resultados corroboram com a literatura. Thi Hoang Mai et al. (2008) também descreveram o agrupamento de *S. suis* isolados de humanos em perfis com maior proximidade dos anos de isolamento. Já Tharavichitkul et al. (2014) observaram apenas a associação dos pulsotipos com os genótipos de virulência das estirpes de origem humana. Chang et al. (2006) e Thi

Hoang Mai et al. (2008), por sua vez, relataram a associação dos agrupamentos de macrorestrição com perfis de resistência a alguns antimicrobianos, como tetraciclina e minociclina.

Neste estudo não foi observada uma correlação entre os perfis de resistência e os pulsotipos. No entanto, se identificou uma relação entre as proporções de estirpes multirresistentes e os anos de isolamento. Pode-se observar que durante o período de 2001 a 2003 foi isolada a maioria das estirpes que apresentam maior susceptibilidade aos antimicrobianos (48/60 – 80,0%); no entanto, este período também apresentou grande proporção de estirpes com resistência a três até cinco classes de antimicrobianos (79/142 - 55,6%). Já a maioria das estirpes de maior resistência (resistência a seis até oito classes) foi isolada no período de 2013 até 2016.

Além disso, foi observado que os perfis de maior resistência (R7, R8 e R9), que incluem resistência às tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos e lincosamidas, são originários de isolamento a partir do ano de 2010. Esses resultados corroboram estudos anteriores que já demonstravam a associação entre multirresistência e o período de isolamento. Destaca-se também a baixa frequência de resistência aos β -lactâmicos nas estirpes brasileiras de *S. suis* independentemente do ano de isolamento. Todas as estirpes apresentaram susceptibilidade para as cefalosporinas e apenas três estirpes foram resistentes a penicilina e uma para amoxicilina.

Yongkiettrakul et al. (2019) compararam estirpes de *S. suis* isoladas na Tailândia entre os anos de 2006 a 2007 e 2012 a 2015, e descreveram um aumento na resistência para alguns antimicrobianos, como clindamicina, doxiciclina, eritromicina e tetraciclina. No entanto, os autores relataram que os β -lactâmicos,

como ampicilina, penicilina, ceftiofur e cefalexina, demonstraram menor resistência nas estirpes isoladas no período do 2012 a 2015.

Hernandez-Garcia et al. (2017) também compararam estirpes inglesas isoladas de suínos sadios e de doentes em dois períodos, de 2009 a 2011 e 2013 a 2014, e descreveram resultados similares. Foi observada maior resistência para alguns antimicrobianos, como doxiciclina, tetraciclina, marbofloxacina, tilmicosina e tilosina, no período 2013 a 2014, enquanto para os β -lactâmicos foi identificada resistência em menor proporção neste período (5% de resistência à penicilina e menos de 1% para cefalosporinas).

Resultados semelhantes foram descritos por Zhang et al. (2015) que identificaram um total de 96 estirpes chinesas de *S. suis* sorotipo 2 das quais apenas duas apresentaram resistência para penicilina, três para ceftiofur e todas foram sensíveis à ampicilina. Considerando esses resultados, pode-se sugerir que os β -lactâmicos assim como o florfenicol, que ainda não apresenta uma resistência significativa em *S. suis*, são os antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções por *S. suis* (OH et al., 2017; YONGKIETTRAKUL et al., 2019) corroborando o observado no presente estudo.

As altas taxas de resistência às tetraciclinas, macrolídeos, clindamicina e sulfadimetoxina detectadas no presente estudo também parecem ser características de *S. suis*, pois se repetem em altas proporções em trabalhos anteriores desenvolvidos em distintas áreas geográficas (TIAN et al., 2004; ZHANG et al., 2015; HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017; OH et al., 2017; HUANG et al., 2019a; YONGKIETTRAKUL et al., 2019).

A alta proporção de multirresistência (> 70%), observada no presente estudo, se destaca também como característica de *S. suis*. Hernandez-Garcia et al. (2017)

relataram 79% de multirresistência nas estirpes avaliadas de *S. suis* enquanto Zhang et al. (2008) detectaram 80,1% das estirpes estudadas como multirresistentes. Esses mesmos autores também descreveram estirpes de elevada multirresistência, apresentando resistência a seis até oito classes de antimicrobianos variando de 6% até 32% de frequência, incluindo isolados de animais doentes e sadios.

No presente estudo foram identificadas 13 estirpes (13/215 - 6%) resistentes a seis até oito classes de antimicrobianos sendo estas originárias tanto de infecção respiratória quanto de quadro clínico invasivo. Os resultados obtidos de multirresistência demandam atenção para a necessidade de maiores estudos e melhor compreensão dos mecanismos de resistência desta espécie bacteriana, que além de ser um aparente reservatório de genes de resistência, também apresenta grande importância para saúde pública por ser um agente zoonótico.

A partir da análise genômica apenas três genes de resistência foram identificados nos genomas brasileiros - *ant(6')-Ia*, *ermB* e *tetO*. Dentre estes destaca-se o gene *ermB*, que codifica resistência à macrolídeos e lincosamidas, que foi detectado em 79,2% das 24 estirpes estudadas. A resistência a tetraciclina e macrolídeos foi relatada em estirpes de *S. suis* isoladas de suínos em todo o mundo (WISSELINK et al., 2006; PALMIERI et al., 2011). O gene *tetO* é um dos principais determinantes de resistência à tetraciclina em *S. suis* e está relacionado a proteção ribossômica. Recentemente o gene *tetW*, que é considerado um determinante emergente da resistência à tetraciclina, também foi detectado em estirpes de *S. suis* originárias de suínos e humanos assim como derivados mosaicos de *tetO* e *tetW* (HU et al., 2011b; PALMIERI et al., 2011).

De forma semelhante, o gene *ermB* é um determinante bem estabelecido de resistência a macrolídeos no gênero *Streptococcus*, sendo detectado em mais de 90% das estirpes isoladas de suínos. Este gene geralmente está associado ao alto nível de resistência e ainda pode ser expresso de forma constitutiva ou mesmo induzível (PALMIERI et al., 2011). Já o gene *ant(6')-Ia*, detectado em apenas dois genomas brasileiros estudados, codifica uma adeniltransferase relacionada a resistência à estreptomicina. Este gene também denominado de *aadE* já foi detectado em estirpes multirresistentes de *S. suis* (HU et al., 2011c; PALMIERI et al., 2011).

Estudos recentes demonstraram que elementos genéticos móveis (MGEs) desempenham um papel fundamental na transferência horizontal de determinantes de resistência interespecies e que estão relacionados com o papel de reservatório de resistência de *S. suis* (HUANG et al., 2016; PALMIERI et al., 2011). Em *S. suis* foram identificados dois sítios principais de inserção denominados *rpIL* e *rum* sendo que 86% dos MGEs de *S. suis* estão inseridos nestes sítios. Estes também foram associados com outras espécies patogênicas do gênero *Streptococcus* como *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*. Esses dados evidenciam que *S. suis* pode ser um reservatório de MGEs para outras espécies de *Streptococcus* e que existe compartilhamento de regiões gênicas entre essas (HUANG et al., 2016).

A partir do mapeamento das nove estirpes do sorotipo 2 foi identificado um elemento genético móvel CMGETZ080501 em sete destas; as duas estirpes brasileiras do sorotipo 2 que se diferenciaram das demais (45 e 47), e que não apresentam o CMGETZ080501, são as mais sensíveis. Este MGE já foi identificado em uma linhagem de estirpes epidêmicas chinesas de *S. suis* do sorotipo 2, mas caracterizadas como ST7. Este elemento é composto por múltiplos genes de

resistência aos antimicrobianos incluindo *ant(6')-Ia*, *ermB* e *tetO* (HUANG et al., 2016).

No presente estudo foram identificadas seis novas STs dentre os 24 genomas analisados, demonstrando a heterogeneidade genética da espécie. Apesar de não ter sido evidenciada uma associação direta entre a diversidade das estirpes analisadas com os dados de origem, sorotipos e virulência, a heterogeneidade de *S. suis* ainda é continuamente estudada.

Weinert et al. (2015) analisaram genomas de *S. suis* isolados tanto de suínos quanto de humanos, e relataram que as estirpes originárias de indivíduos doentes possuíam maior capacidade para codificar fatores de virulência do que as originárias de não doentes. Outros estudos genômicos também demonstraram que estirpes altamente virulentas estão associadas a casos zoonóticos (FILLO et al., 2018). Em relação às estirpes zoonóticas, também foi relatada alta similaridade entre os genomas de 565 estirpes isoladas de humanos doentes e caracterizadas como altamente virulentas (HUANG et al., 2019b). Recentemente foi realizada análise comparativa das estirpes que provocaram um surto zoonótico em 2005, na China, na qual identificaram características associadas à fatores geográficos, sendo possível classificá-las em oito grupos distintos que apresentavam correlação com o local de isolamento (DU et al., 2017).

Além disso, a heterogeneidade entre estirpes originárias de um mesmo hospedeiro também já foi comprovada. Willemse et al. (2019) demonstraram que diferentes estirpes são capazes de infectar um mesmo hospedeiro em diferentes períodos de tempo a partir do estudo dos genomas de *S. suis* recuperados de um paciente com reinfecção; apesar de observarem que as estirpes eram altamente semelhantes, estas não estavam relacionadas geneticamente entre si. De forma

semelhante, Stevens et al. (2019) descreveram que estirpes de *S. suis* patogênicas isoladas do mesmo hospedeiro podiam ser geneticamente diferentes, destacando a elevada diversidade do agente.

7. CONCLUSÕES

- Foram identificados no país os sorotipos 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 1 / 14, 17, 18, 27 e 28; dentre eles o sorotipo 2 / 1/2 foi o mais frequente representando 82,8%, seguido do sorotipo 3, 7 e 1 / 14;
- Foram identificados 11 perfis de virulência a partir da detecção dos genes *sly*, *arcA*, *epf*, e as variantes do gene *mrp*;
- Foram observadas altas taxas de resistência às tetraciclinas, macrolídeos, clindamicina e sulfadimetoxina, sendo que 72,1% das estirpes avaliadas foram caracterizadas como multirresistentes;
- Os antimicrobianos mais eficazes para as estirpes brasileiras de *S. suis* foram os β -lactâmicos, fluoroquinolonas, tiamulina e florfenicol;
- A genotipagem pela técnica do AFLP resultou em 30 perfis, observando uma tendência de agrupamento das estirpes por ano de isolamento;
- Na análise de agrupamento dos perfis de restrição de PFGE foram identificados 64 pulsotipos que apresentam uma tendência de agrupamento segundo o ano de isolamento, e a associação com alguns perfis de virulência;
- A partir da análise genômica não foram detectados marcadores de plasmídeos e foram identificados três genes associados à resistência antimicrobiana dos quais se destaca o gene *ermB*, relacionado à macrolídeos e lincosamidas, que foi detectado em 79,2% dos 24 genomas estudados;
- Foram identificadas seis novas sequências tipo (STs) dentre os 24 genomas analisados;
- No mapeamento das estirpes do sorotipo 2 foi identificado o elemento genético móvel CMGETZ080501, relacionado à resistência à antimicrobianos, em sete destes genomas.

- Foi observado no mapeamento das estirpes do sorotipo 3, que algumas destas se distanciam das demais e apresentam maior similaridade ao genoma da referência do sorotipo 4;
- As análises de wgSNP e da MLST demonstraram que a caracterização capsular de *S. suis* não deve ser utilizada como um indicativo de similaridade genética.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIKHAN, N. F. et al. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 402, 2011.

ALLGAIER, A. et al. Relatedness of *Streptococcus suis* isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 445-453, 2001.

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

ATHEY, T. B. T. et al. Determining *Streptococcus suis* serotype from short-read whole-genome sequencing data. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 162, 2016.

AUGER, J. P. et al. The bias of experimental design, including strain background, in the determination of critical *Streptococcus suis* serotype 2 virulence factors. **PLoS ONE**, v. 12, n.7, p. 1-19, 2017.

BARCELLOS, D. E. S. N.; OLIVEIRA, S. J.; BOROWSKI, S. M. Infecção de suínos por *Streptococcus suis* tipo II em Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 6, n. 4, p. 128-129, 1984.

BAUMS, C. G. et al. Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 711- 717, 2007.

BERTHELOT-HÉRAULT, F. et al. Genetic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and humans as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 615-619, 2002.

BONIFAIT, L. et al. Detection of *Streptococcus suis* in bioaerosols of swine confinement buildings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 11, p. 3296-3304, 2014.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

CALDERARO, F. F. et al. Characterization of *Streptococcus suis* through serotyping, SE-AFLP and virulence profile. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 701-704, 2016.

CARATTOLI, A. et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 7, p. 3895-3903, 2014.

CHANG, B. et al. Characteristics of *Streptococcus suis* isolated from patients in Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Japão v. 59, n. 6, p. 397-399, 2006.

CHEN, C. et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. **PLoS ONE**, v.2, n. 3, p. 315, 2007.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards For Antimicrobial Disk And Dilution Susceptibility Tests For Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard-Third Edition. M31-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2008.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility tests for Bacteria Isolated from Animals. 4th ed. CLSI supplement VET08. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2018.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2018.

COSTA, A. T. R. et al. Serotyping and evaluation of the virulence in mice of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 2, p. 113-115, 2005.

DE JONG, A. et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: The VetPath study. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 1-2, p. 202-215, 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, p. 272-280, 1963.

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. et al. Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 1, p. 31-37, 1994.

DEVRIESE, L. A. et al. *Streptococcus suis* meningitis in a horse. **The Veterinary record**, v. 127, n. 3, p. 68, 1990.

DOTO, D. S. et al. Genetic diversity of *Streptococcus suis* serotype 2 isolated from pigs in Brazil. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 2, p. 106-111, 2016.

DU TOIT, M. et al. The genus *Streptococcus*. In: DU TOIT, M. et al. **Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy**, 2014, cap. 28, p. 1-49.

DU, P. et al. Detection of multiple parallel transmission outbreak of *Streptococcus suis* human infection by use of genome epidemiology, China, 2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 204-211, 2017.

EISENBERG, T. et al. Characterization of five zoonotic *Streptococcus suis* strains from Germany, including one isolate from a recent fatal case of streptococcal toxic shock-like syndrome in a hunter. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 3912-3915, 2015.

ELLIOTT, S. D. Streptococcal infection in young pigs I. An immunochemical study of the causative agent (PM *Streptococcus*). **Journal of Hygiene**, v. 64, n. 2, p. 205-212, 1966.

ESTOEPANGESTIE, S.; LÄMMLER, C. Distribution of capsular types 1 to 28 and further characteristics of *Streptococcus suis* isolates from various European countries. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, v. 279, n. 3, p. 394-403, 1993.

ESTRADA, A. A. et al. Serotype and Genotype (Multilocus Sequence Type) of *Streptococcus suis* Isolates from the United States Serve as Predictors of Pathotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 1-19, 2019.

EWELS, P. et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, v. 32, n. 19, p. 3047-3048, 2016.

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

FARINHA, F. B. N. Et al. Meningite em suínos causada por *Streptococcus suis* tipo R. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 48, n. 1-4, p. 91-95, 1981.

FEDER, I. et al. Partial characterization of *Streptococcus suis* type 2 hemolysin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 1256–1260.

FENG, Y. et al. *Streptococcus suis* infection: An emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases? **Virulence**, v. 5, n. 4, p. 477–497, 2014.

FERNÁNDEZ-AGUILAR, X. et al. Urban wild boars and risk for zoonotic *Streptococcus suis*, Spain. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 1083–1086, 2018.

FILLO, S. et al. Draft genome sequence of *Streptococcus suis* strain SsRC-1, a human isolate from a fatal case of toxic shock syndrome. **Genome Announcements**, v. 6, n. 20, p. e00447-18, 2018.

FITTIPALDI, N. et al. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. **Future Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 259-279, 2012.

GALINA, L. et al. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muraminidase-released protein and extracellular factor. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 1, p. 72-74, 1996.

GORDILLO, M. E. et al. Typing of group B streptococci: Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 1430-1434, 1993.

GOTTSCHALK, M. et al. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 11, p. 2590-2594, 1991.

GOTTSCHALK, M. et al. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 12, p. 2633-2636, 1989.

GOTTSCHALK, M. et al. Production of Virulence-Related Proteins by Canadian Strains of *Streptococcus suis* Capsular Type 2. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 1, p. 75-79, 1998.

GOTTSCHALK, M. G.; LACOUTURE, S.; DUBREUIL, J. D. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. **Microbiology**, v. 141, n. 1, p. 189-195, 1995.

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.; 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. et al. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. **Emerging Microbes and Infections**, v. 3, n. 6, p. 45, 2014.

GUREVICH, A. et al. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072-1075, 2013.

HAAS, B.; GRENIER, D. Understanding the virulence of *Streptococcus suis*: A veterinary, medical, and economic challenge. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 48, n. 3, p. 159-166, 2018.

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.

HERNANDEZ-GARCIA, J. et al. Patterns of antimicrobial resistance in *Streptococcus suis* isolates from pigs with or without streptococcal disease in England between 2009 and 2014. **Veterinary Microbiology**, v. 207, p. 117–124, 2017.

HIGGINS, R. et al. Description of Six New Capsular Types (29-34) of *Streptococcus suis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 3, p. 405-406, 1995.

HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M. An update on *Streptococcus suis* identification. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, n. 3, p. 249-52, 1990.

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.

HILL, J. E. et al. 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.

HOLDEN, M. T. G. et al. Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6072, 2009.

HOMMEZ, J. et al. Identification and characterization of *Streptococcus suis*. **Veterinary Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 349-355, 1986.

HOUDE, M. et al. *Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition. **Infection and Immunity**, v. 80, n.2, p. 506-517, 2012.

HU, P. et al. Complete genome sequence of *Streptococcus suis* serotype 3 strain ST3 **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 13, p. 3428-9, 2011a.

HU, P. et al. Comparative genomics study of multi-drug-resistance mechanisms in the antibiotic-resistant *Streptococcus suis* R61 strain. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24988, 2011b.

HU, P. et al. Complete genome sequence of *Streptococcus suis* serotype 14 strain JS14. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 9, p. 2375-2376, 2011c.

HUANG, J. et al. Evolution and diversity of the antimicrobial resistance associated mobilome in *Streptococcus suis*: A probable mobile genetic elements reservoir for other streptococci. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 118, 2016.

HUANG, J. et al. Genetic diversity of *Streptococcus suis* isolated from three pig farms of China obtained by acquiring antibiotic resistance genes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 7, p. 1454-1460, 2015.

HUANG, J. et al. Identification of six novel capsular polysaccharide loci (NCL) from *Streptococcus suis* multidrug resistant non-typeable strains and the pathogenic characteristic of strains carrying new NCLs. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 2, p. 995-1003, 2019a.

HUANG, W. et al. Genomic epidemiological investigation of a *Streptococcus suis* outbreak in Guangxi, China, 2016. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 68, p. 249-252, 2019b.

ISHIDA, S. et al. Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 66-70, 2014.

- JACOBS, A. A. C. et al. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1742-1748, 1994.
- KATAOKA, Y.; YOSHIDA, T.; SAWADA, T. A 10-Year Survey of Antimicrobial Susceptibility of *Streptococcus suis* Isolates from Swine in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 10, p. 1053-1057, 2000.
- KAY, R.; CHENG, A. F.; TSE, C. Y. *Streptococcus suis* infection in Hong Kong. **QJM**, v. 88, n. 1, p. 39-47, 1995.
- KERDSIN, A. et al. Clonal dissemination of human isolates of *Streptococcus suis* serotype 14 in Thailand. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 1508-1513, 2009.
- KERDSIN, A. et al. Genotypic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from humans in Thailand. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 58, n. 11, p.1508-1513, 2018.
- KERDSIN, A. et al. *Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 824-830, 2014.
- KEYMER, I. F.; HEATH, S. E.; WOOD, J. G. *Streptococcus suis* type II infection in a raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) family Canidae. **Veterinary Record**, v. 113, n. 26-27, p. 624, 1983.
- 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.
- KIM, D. et al. Distribution of capsular serotypes and virulence markers of *Streptococcus suis* isolated from pigs with polyserositis in Korea. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 4, p. 314-316, 2010.
- KING, S. J. et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: Identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3671-3680, 2002.
- LAND, M. et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. **Functional and Integrative Genomics**, v. 15, n. 2, p. 141-161, 2015.
- LARSEN, M. V. et al, Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1355-1361, 2012.

LUQUE, I. et al. Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates recovered from diseased and healthy carrier pigs at different stages of production on a pig farm. **Veterinary Journal**, v. 186, n. 3, p. 396-398, 2010.

MANEERAT, K. et al. Expression and Characterization of Serotype 2 *Streptococcus suis* Arginine Deiminase. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 133-146, 2017.

MANEERAT, K. et al. Virulence Genes and Genetic Diversity of *Streptococcus suis* Serotype 2 Isolates from Thailand. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, p. 69-79, 2013.

MARTINEZ, G. et al. Clonal distribution of an atypical MRP+, EF* and suilysin+ phenotype of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains in Brazil. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 1, p. 52-55, 2003.

MATAJIRA, C. E. C. et al. Evaluation of protein spectra cluster analysis for *Streptococcus* spp. identification from various swine clinical samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 2, p. 245-249, 2017.

MCLAUCHLIN, J. et al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 21-28, 2000.

O'SULLIVAN, T. et al. 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.

OH, S. I. et al. Capsular serotypes, virulence-associated genes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from pigs in Korea. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 4, p. 780-787, 2017.

OH, Y. et al. Sepsis caused by *Streptococcus suis* serotype 2 in a eurasian river otter (*Lutra lutra*) in the republic of Korea. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 54, n. 4, p. 866-869, 2018.

OKURA, M. et al. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1714-1719, 2014.

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 Microbiology Letters**, v. 218, n. 1, p. 79-84, 2003.

PALMIERI C, VARALDO PE, FACINELLI B. *Streptococcus suis*, an Emerging Drug-Resistant Animal and Human Pathogen. **Frontiers Microbiology**, v. 2, p. 235, 2011.

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.

PÉREZ-SANCHO, M. et al. Usefulness of MALDI-TOF MS as a diagnostic tool for the identification of *Streptococcus* species recovered from clinical specimens of pigs. **PLoS ONE**, n. 26, p. 1-10, 2017.

QUESSY, S. et al. Increase of capsular material thickness following in vivo growth of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 115, n. 1, p. 19-26., 1994.

REHM, T. et al. Amplified fragment length polymorphism of *Streptococcus suis* strains correlates with their profile of virulence-associated genes and clinical background. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 102-109, 2007.

REIS, R. et al. Meningoencefalite estreptocócica em leitões desmamados. **Arquivos da Escola de Veterinária UFMG**, Belo Horizonte, v.32 p. 375-381, 1980.

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

ROCHA, D. L. et al. Sorotipos de *Streptococcus suis* identificados em suínos com meningite no estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 488-490, 2012.

ROELS, S. et al. Isolation of *Streptococcus suis* from a cat with meningoencephalitis. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 206-207, 2009.

ROSENBAACH, F. J. Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen: eiter und abscessbildung. 1ed Göttingen: Von J. F. Bergmann Cap; 2, p. 06-25, 1884.

ROY, D. et al. Recruitment of factor H to the *Streptococcus suis* cell surface is multifactorial. **Pathogens**, v. 5, n. 3, p. E47, 2016.

SALASIA, S. I. O.; LÄMMLER, C.; DEVRIESE, L. A. Serotypes and putative virulence markers of *Streptococcus suis* isolates from cats and dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 57, n. 2, p. 259-261, 1994.

SÁNCHEZ DEL REY, V. et al. Screening of virulence-associated genes as a molecular typing method for characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered from wild boars and pigs. **Veterinary Journal**, v. 209, p. 108-112, 2016.

SCHWARZ, S. et al. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 601-604, 2010.

SEGURA, M. et al. Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical? **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 7, p. 585-599, 2017.

SEKIZAKI, T. et al. Evidence for horizontal transfer of SsuDAT1I restriction-modification genes to the *Streptococcus suis* genome. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 2, p. 500-511, 2001.

SILVA, L. M. G. et al. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n.1-3, p. 117-127, 2006.

SMITH, H. E. et al. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-kilodalton surface protein (muramidase-released protein) of *Streptococcus suis* type 2. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 6, p. 2361-2367, 1992.

SMITH, H. E. et al. Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* type 2 are absent in pathogenic strains. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 8, p. 3318-3326, 1993.

SOARES, T. C. et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from clinically healthy swine in Brazil. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 78, n. 2, p. 145-149, 2014.

SOARES, T. C. S. et al. *Streptococcus suis* in employees and the environment of swine slaughterhouses in São Paulo, Brazil: Occurrence, risk factors, serotype distribution, and antimicrobial susceptibility. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 79, n. 4, p. 279-284, 2015.

STAATS, J. J. et al. *Streptococcus suis*: past and present. **Veterinary Research Communications**, v. 21, n. 6, p. 381-407, 1997.

STANOJKOVIC, A. et al. Biochemical characteristics of *Streptococcus suis* strains isolated from healthy and deceased pigs. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 30, n. 4, p. 699-704, 2014.

- STEVENS, M. J. A. et al. Massive Diversity in Whole-Genome Sequences of *Streptococcus suis* Strains from Infected Pigs in Switzerland. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 5, p. e01656-18, 2019.
- TAKEUCHI, D. et al. Impact of a food safety campaign on *Streptococcus suis* infection in humans in Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 6, p. 1370-1377, 2017.
- TANG, F. et al. Isolation and characterization of a *Streptococcus suis* serotype 9 from a wild cat. **Wei sheng wu xue bao**, v. 56, n. 2, p. 275-282, 2016.
- TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.
- THARAVICHITKUL, P. et al. Correlation between PFGE Groups and *mrp/epf/sly* Genotypes of Human *Streptococcus suis* Serotype 2 in Northern Thailand. **Journal of Pathogens**, v. 2014, p. 4, 2014.
- THI HOANG MAI, N. et al. *Streptococcus suis* Meningitis in Adults in Vietnam. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 5, p. 659-667, 2008.
- 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, n. 22, p. 4673-4680., 1994.
- TIAN, Y.; AARESTRUP, F. M.; LU, C. P. Characterization of *Streptococcus suis* serotype 7 isolates from diseased pigs in Denmark. **Veterinary Microbiology**, v. 103, n. 1-2, p. 55-62, 2004.
- TIEN, L. H. T. et al. 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.
- TOUIL, F.; HIGGINS, R.; NADEAU, M. Isolation of *Streptococcus suis* from diseased pigs in Canada. **Veterinary Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 171-177, 1988.
- UNTERWEGER, C. et al. Effect of early-life treatment of piglets with long-acting ceftiofur on colonization of *Streptococcus suis* serotype 7 and elicitation of specific humoral immunity in a farm dealing with streptococcal diseases. **Pathogens**, v. 7, n. 2, p. E34, 2018.

VAN BELKUM, A. et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 3, p. 1-46, 2007.

VECHT, U. et al. Discrimination between virulent and nonvirulent *Streptococcus suis* type 2 strains by enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 71-82, 1993.

VECHT, U. et al. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 9, p. 3156-3162, 1991a.

VECHT, U. et al. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 2, p. 550-556, 1991b.

VECHT, U.; VAN LEENGOED, L. A.; VERHEIJEN, E. R. *Streptococcus suis* infections in pigs in the Netherlands (Part I). **The Veterinary quarterly**, v. 7, n. 4, p. 315-321, 1985.

VELA, A. I. et al. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2498-5502, 2003.

WEI, W. et al. Comparative analysis of whole-genome sequences of *Streptococcus suis*. **Chinese Science Bulletin**, v. 51, n. 1, p. 21-26, 2006.

WEINERT, L. A. et al. Genomic signatures of human and animal disease in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. **Nature Communications**, v. 6, p. 6740, 2015.

WICK, R. R. et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLOS Computational Biology**, v. 13, n. 6, p. e1005595, 2017.

WILLEMSE, N.; VAN DER ENDE, A.; SCHULTSZ, C. Reinfection with *Streptococcus suis* analysed by whole genome sequencing. **Zoonoses and Public Health**, v. 66, n. 1, p. 179-183, 2019.

WINDSOR, R. S.; ELLIOTT, S. D. Streptococcal infection in young pigs: IV. An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs. **Journal of Hygiene**, v. 75, n. 1, p. 69-78, 1975.

WISSELINK, H. J. et al. 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.

WISSELINK, H. J. et al. Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licensed in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 73-82, 2006.

WISSELINK, H. J.; JOOSTEN, J. J.; SMITH, H. E. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2922-2929, 2002.

WONGSAWAN, K.; GOTTSCHALK, M.; THARAVICHITKUL, P. Serotype- and Virulence-Associated gene profile of *Streptococcus suis* isolates from pig carcasses in Chiang Mai province, Northern Thailand. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 2, p. 233-236, 2015.

YANASE, T. et al. The first report of human meningitis and pyogenic ventriculitis caused by *Streptococcus suis*: A case report. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 24, n. 8, p. 669-673, 2018.

YONGKIETTRAKUL, S. et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs, asymptomatic pigs, and human patients in Thailand. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 5, 2019.

ZANKARI, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2640-2644., 2012.

ZHANG, A. et al. Comparative genomic analysis of *Streptococcus suis* reveals significant genomic diversity among different serotypes. **BMC Genomics**, v. 12, 523, 2011.

ZHANG, C. et al. Antimicrobial Resistance Profile and Genotypic Characteristics of *Streptococcus suis* Capsular Type 2 Isolated from Clinical Carrier Sows and Diseased Pigs in China. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 284303, 2015.

ZHANG, C. et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from clinically healthy sows in China. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 3-4, p. 386-392, 2008.

ZHENG, H. et al. Genotyping and investigating capsular polysaccharide synthesis gene loci of non-serotypeable *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Canada. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 10, 2017.

ZHOU, Y. et al. Predominance of *Streptococcus suis* ST1 and ST7 in human cases in China, and detection of a novel sequence type, st658, **Virulence**, v. 8, n. 6, p. 1031-1035, 2017.