

DETECÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DAS PROTEÍNAS EF,
MRP E SUILISINA EM AMOSTRAS DE *STREPTOCOCCUS SUIIS*
SOROTIPO 2 ISOLADAS EM SUÍNOS NO BRASIL

F.F. Calderaro¹, D.S. Doto², M.R. Baccaro³, R. Paixão², C.R. Gomes², A.F.P. de Castro⁴, A.M. Moreno²

¹Universidade Paulista - UNIP, Rua Luiz Góes, 2211, CEP 04043-200, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: morenoam@uol.com.br

RESUMO

Streptococcus suis é um dos mais importantes patógenos que afetam suínos de todo o mundo. Relatos sobre a caracterização deste agente na América do Sul são escassos. O presente estudo teve por objetivo analisar 133 amostras de *S. suis* isoladas de animais doentes de diferentes regiões do país. Os isolados foram classificados como sorotipo 2 e submetidos pesquisa dos genes codificadores de EF, MRP e suilisina. Os resultados obtidos mostraram a ocorrência de oito genótipos, representados pelas diferentes combinações destes fatores de virulência. O genótipo EF+, MRP+ e suilisina+ foi o mais freqüente, seguido por (EF*, MRP+, suilisina+), (EF+, MRP+, suilisina-), (EF+, MRP-, suilisina-) e outros. Amostras de *S. suis* dos Estados de Santa Catarina e São Paulo apresentaram a presença de sete e seis genótipos diferentes, respectivamente, o que sugere uma grande diversidade genética entre os isolados destas regiões. Não foi possível estabelecer uma correlação direta entre as combinações dos genes e os tecidos examinados, no entanto, os isolados de sistema nervoso central apresentaram sete genótipos diferentes, seguido pelo pulmão que apresentou cinco combinações. Ao contrário do que foi descrito anteriormente, isolados de *S. suis* brasileiros apresentam diferentes perfis quanto a produção de EF, MRP e suilisina, o que pode representar grandes variações na eficácia de programas de vacinação contra o agente.

PALAVRAS-CHAVE: Suíno, fatores de virulência, streptococose, PCR, genes.

ABSTRACT

DETECTION OF THE CODIFYING GENES OF THE PROTEIN EF, MRP AND SUILYSIN IN SAMPLES OF *STREPTOCOCCUS SUIIS* SEROTYPE 2 IN SWINE IN BRAZIL. *Streptococcus suis* is one of the most important bacterial pathogens of swine all over the world. Studies on the characterization of this agent in South America are scarce. The present study analyzed 133 isolates of *S. suis* recovered from affected pigs from different regions of Brazil. These isolates were classified as serotype 2 and further studied for the presence of genes codifying EF, MRP and suilysin. Results obtained showed the occurrence of eight genotypes, represented by different combinations of these virulence factors. The genotype EF+, MRP+ and suilysin+ was the most frequent, followed by (EF*, MRP+, suilysin+), (EF+, MRP+, suilysin-), (EF+, MRP-, suilysin-) and others. *S. suis* from the states of Santa Catarina and São Paulo showed the presence of seven and six different genotypes, respectively, which suggests the genetic diversity of Brazilian isolates in these regions. Direct correlation between gene combinations and tissues examined was not possible to be drawn, but isolates from the central nervous system showed seven different genotypes, followed by lung isolates, which showed five genotypes. Differently from what have been previously described, Brazilian isolates of *S. suis* present different EF, MRP and suilysin distribution patterns, which can have negative effects on the efficacy of vaccination programs against this agent.

KEY WORDS: Swine, virulence factor, streptococosis, PCR, genes.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

⁴Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

O *Streptococcus suis* é reconhecido em todo mundo como um dos principais microorganismos patogênicos que infectam os suínos. O agente está associado ao desenvolvimento de meningites, septicemias, poliserosites, artrites, endocardites, pneumonia e morte súbita causando graves prejuízos à indústria suinícola. (HIGGINS *et al.*, 1992; BERTHELOT-HÉRAULT *et al.*, 2000). O ambiente natural do *Streptococcus suis* é o trato respiratório, genital e digestório de animais sadios. Seu isolamento tem sido bastante amplo, estando presente em diversas espécies de mamíferos e aves, o que sugere a avaliação de novos aspectos epidemiológicos da infecção (HIGGINS & GOTTSCHALK, 1999). Atualmente são descritos 35 sorotipos capsulares conhecidos de *S. suis* (1 ao 34 e 1/2). Em animais doentes, o tipo capsular 2 é o mais prevalente na maior parte dos países, no entanto, outros sorotipos como 1, 7, 9 e 14 também têm sido descritos (HIGGINS & GOTTSCHALK, 1999).

A patogenia das infecções pelo *S. suis* ainda não é clara e o conhecimento sobre os fatores de virulência envolvidos é limitado, no entanto, alguns fortes candidatos a este papel são polissacarídeos capsulares (CPS), proteínas relacionadas a virulência como a "muraminidase released-protein" de 136 kDA (MRP) e o fator protéico extracelular de 110 kDA (EF), a hemolisina (suilisina) e adesinas. (VECHT *et al.*, 1992; GOTTSCHALK & SEGURA, 2000).

Em relação às proteínas associadas à virulência são descritas amostras de *S. suis* apresentando 3 diferentes fenótipos: MRP+EF+, MRP+EF-, MRP-EF-. Algumas proteínas variantes para EF (EF*) com peso molecular superior a 110 kDA e para MRP com peso molecular superior (MRP*) e inferior (MRP^s) a 136 kDA foram descritas por Vecht *et al.* (1996). A suilisina é uma toxina tiol-ativada, a qual tem sido descrita como potente fator de virulência, entretanto, o seu modo de ação ainda não está bem determinado (GOTTSCHALK & SEGURA, 2000). A associação destas proteínas e da suilisina com a virulência das amostras de *S. suis* parece variar de acordo com a origem dos isolados (BERTHELOT-HÉRAULT *et al.*, 2000). No Brasil, em estudo conduzido na região sudeste do país, foi descrito o isolamento de amostras sorotipo 2 com fenótipo EF*MRP+Suilisina+ predominante (MARTINEZ *et al.*, 2003).

O presente estudo teve por objetivo caracterizar o sorotipo capsular de amostras de *S. suis* isoladas de suínos doentes de diferentes regiões do Brasil, assim como caracterizar as amostras quanto a presença de genes codificadores de EF, MRP e suilisina através da reação em cadeia da polimerase.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas 133 amostras de *Streptococcus suis* isoladas no período de julho de 1999 a outubro de 2003 e caracterizadas através de provas bioquímicas segundo descrito por TARRADAS *et al.*, 1994. As amostras foram isoladas de 100 animais provenientes de 88 granjas de suínos localizadas nos Estados de São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Rio Grande do Sul. Os animais apresentavam encefalite, septicemia, artrite ou pneumonia. Após o isolamento e caracterização bioquímica, as amostras foram mantidas a -86° C até o momento do processamento.

Serotipagem

Todas as amostras foram submetidas a sorotipagem através do método de co-aglutinação usando soro de coelho hiperimune contra amostras de referência dos sorotipos 1 a 8 e 1/2 11 segundo descrito por GOTTSCHALK *et al.* (1993).

Tipagem capsular

Os resultados da sorotipagem foram confirmados através da PCR para caracterização capsular dos sorotipos 1 (e 14), 2 (e 1/2), 7 e 9 recentemente descrita por WISSELINK *et al.* (2002). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para esse fim estão relacionados no Quadro 1.

Presença do gene codificador da proteína EF (epf), MRP (mrp) e suilisina (sly)

Os genes que codificam as proteínas EF e MRP foram detectados através da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores descritos por WISSELINK *et al.* (2002). O gene codificador da suilisina foi detectado conforme descrito por KING *et al.* (2001). Os oligonucleotídeos iniciadores, as temperaturas de hibridização e o tamanho dos fragmentos amplificados para os diferentes genes são apresentados no Quadro 1.

Extração de DNA

Para extração do DNA genômico as amostras foram cultivadas em infusão cérebro coração (BHI, Difco), à 37° C por 18h. Uma alíquota de 600 mL da cultura foi submetida à extração de DNA através do método baseado na utilização de isotiocianato de guanidina (PITCHER *et al.*, 1989).

Quadro 1 - Sequência dos primers e temperatura de hibridização utilizadas e tamanho dos fragmentos amplificados.

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores (5'-3')	Temperatura hibridização	Amplicom
<i>efp</i>	GCTACGACGGCCTCAGAAATC TGGATCAACCACTGGTGTTAC	60° C	626pb*
<i>mrp</i>	TGCTTCATCAGAACCAAC GAGAATTTCAATGCTCCAG	55° C	978 pb
<i>sly</i>	CAGCTCGTTGCCTTGTAATA ACTCTATCACCTCATCCGC	50° C	1.818 pb
<i>cps2</i>	CAAACGCAAGGAATTACGGTATC CATTTCTAAGTCTCGCACC	63° C	236 pb

* Amostras EF. *Variantes produzem fragmento de 1278, 1505, 2313, 2537 e 2993 pb.

Tabela 1 - Frequência dos genes codificadores das proteínas EF, MRP e suilisina.

Genes	Positivos	Negativos	% positivos
<i>Efp</i>	96	37	72,2
<i>efp*</i>	27	106	20,3
<i>Mrp</i>	107	26	80,5
<i>Sly</i>	90	43	67,7

Detecção dos produtos amplificados

A detecção dos produtos amplificados foi realizada através da eletroforese em gel de Agarose 1,5 %, corado com Brometo de Etídio (5µg/ mL), observado e registrado através do Sistema "Image Master" (Amershan-Pharmacia Biothec). Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen).

RESULTADOS

Dentre as 133 amostras de *Streptococcus suis* analisadas todas foram caracterizadas como sorotipo 2 através da sorotipagem tradicional e da PCR.

A frequência dos genes codificadores de EF, MRP e suilisina dentre as 133 amostras é apresentada na Tabela 1. O gene mais frequente foi o codificador de MRP (80,5%), seguido pelo de EF(72,2%), suilisina (67,7%) e EF*(20,3%). As combinações dos resultados obtidos através da pesquisa dos genes codificadores das proteínas EF, MRP e suilisina permitiram a classificação das amostras em 8 genótipos apresentados na Tabela 2. O genótipo EF+MRP+suilisina+ foi o mais frequente ocorrendo em 40,6% das amostras, seguido pelo EF*MRP+suilisina+ (20,3%), EF+MRP+suilisina- (16,5%), EF+MRP-suilisina- (10,5%), EF+MRP-suilisina+ e EF-MRP-suilisina- (4,5%), EF-MRP+suilisina+ (2,3%) e EF-MRP+suilisina- (0,8%).

Tabela 2 - Frequência dos genótipos observados dentre as 133 amostras de *S. suis* sorotipo 2.

Genótipo		Nº de amostras	Frequência (%)
EF+	MRP+ Suilisina+	54	40,6
EF +	MRP - Suilisina -	14	10,5
EF +	MRP - Suilisina +	6	4,5
EF +	MRP + Suilisina -	22	16,5
EF -	MRP - Suilisina -	6	4,5
EF -	MRP + Suilisina -	1	0,8
EF -	MRP + Suilisina +	3	2,3
EF *	MRP + Suilisina +	27	20,3

*Proteína EF variante

O número de amostras de acordo com o estado de origem e o número de amostras de acordo com o sítio de isolamento (SNC, trato respiratório e outros) são apresentados nas Figuras 1 e 2.

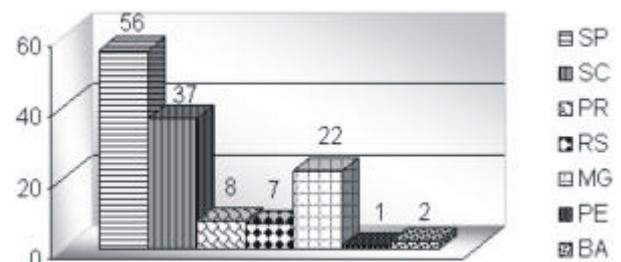


Fig. 1 - Número de amostras de *S. suis* analisadas nos diferentes estados do Brasil.

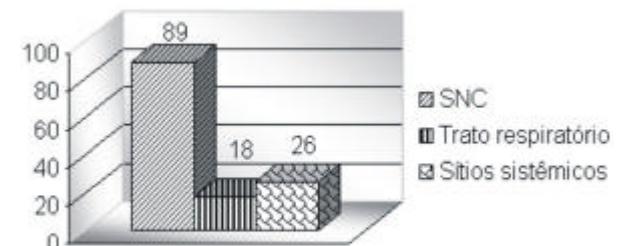


Fig. 2 - Número de amostras de *S. suis* isoladas a partir dos diferentes tecidos examinados.

Tabela 3 - Frequência dos genótipos observados dentre as 133 amostras de *S. suis* sorotipo 2 de acordo com os estados de origem das amostras.

Genótipos	Estados						
	SP	SC	MG	PR	RS	PE	BA
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
EF+MRP+Suil+	12(21,4)	9(24,4)	18(86,5)	8(100)	4(57,1)	0	2(100)
EF+MRP-Suil-	1(1,8)	11(29,7)	0	0	1(14,3)	1(100)	0
EF+MRP-Suil+	3(5,4)	3(8,1)	0	0	0	0	0
EF+MRP+Suil-	11(19,6)	8(21,6)	1(4,5)	0	2(28,6)	0	0
EF-MRP-Suil-	0	4(10,8)	2(9)	0	0	0	0
EF-MRP+Suil-	0	1(2,7)	0	0	0	0	0
EF-MRP+Suil+	2(3,6)	1(2,7)	0	0	0	0	0
EF*MRP+Suil+	27(48,2)	0	0	0	0	0	0

Suil- suilisina.

Tabela 4 - Frequência dos genótipos observados dentre as 133 amostras de *S. suis* sorotipo 2 de acordo com o sítio de isolamento do agente.

Genótipos	Sítios de isolamento		
	SNC ¹	Trato respiratório ²	Outros ³
	N(%)	N(%)	N(%)
EF+MRP+Suil+	38(42,7)	8(44,5)	8(30,8)
EF+MRP- Suil-	10(11,2)	3(16,7)	1(3,8)
EF+MRP- Suil+	5(5,6)	0	1(3,8)
EF+MRP+Suil-	8(9)	5(27,8)	9(34,7)
EF-MRP- Suil-	4(4,5)	1(5,5)	1(3,8)
EF-MRP+Suil-	0	1(5,5)	0
EF-MRP+Suil+	2(2,3)	0	1(3,8)
EF*MRP+Suil+	22(24,7)	0	5(19,3)

1-Cérebro, meninge e liquor; 2- Pulmão (16 amostras) e corneto (2 amostras); 3- Articulação, sangue, cavidade torácica, peritônio e pericárdio. Suil- suilisina.

Os diferentes genótipos foram correlacionados com os estados de origem dos isolados sendo que Santa Catarina apresentou a maior diversidade de genótipos, com 7 combinações diferentes entre os genes pesquisados, seguida por São Paulo com 6. A frequência dos genótipos de acordo com os estados pode ser observada na Tabela 3.

A frequência dos genótipos de acordo como sítio de isolamento é apresentada na Tabela 4 e revela uma grande variedade de combinações ocorrendo em amostras isoladas nos diferentes sítios. No SNC e trato respiratório o genótipo EF+MRP+suilisina+ foi o mais frequente com 42,7% e 44,5% das amostras respectivamente, nos focos de infecção sistêmica (articulação, cavidade torácica, sangue, pericárdio e peritônio). A combinação EF+MRP+suilisina- ocorreu em 34,7% dos isolados, seguida por EF+MRP+ suilisina+ em 30,8%.

DISCUSSÃO

Considerando o grande número de estudos conduzidos na tentativa de elucidar a patogenia da infecção por *S. suis*, pouco se avançou sobre este tema nos últimos anos. As proteínas EF e MRP têm sido exaustivamente pesquisadas assim como a suilisina, visando caracterizar o papel destes fatores na infecção pelo agente ou sua utilização como marcadores de virulência (GOTTSCHALK & SEGURA, 2000). Estudos utilizando mutantes isogênicos de *S. suis* em infecção experimental demonstraram que a virulência do agente não é alterada pela ausência dos genes codificadores de EF e MRP. A hemolisina denominada suilisina, apesar de ter um grande potencial imunogênico, tem sido descrita com baixa frequência entre os isolados patogênicos (GOTTSCHALK *et al.*, 1998).

A aparente ausência de correlação direta entre estas proteínas e a virulência não diminui a importância da caracterização de amostras de *S. suis* brasileiras quanto a presença de seus genes codificadores. Uma vez que amostras isoladas de diferentes países apresentam uma marcante variação na frequência destas proteínas, o perfil das amostras nacionais pode revelar um pouco da diversidade genética ou fenotípica deste agente nos sistemas de produção de suínos.

No presente estudo, a frequência dos genes codificadores de EF (72,2%) e MRP (80,5%) isoladamente é comparável a observada em países europeus, Estados Unidos e Austrália. WISSELINK *et al.* (2000) descreve 71% das amostras de *S. suis* sorotipo 2 positivas para EF em 129 amostras isoladas de diferentes países da Europa. A frequência da associação EF+MRP+ observada no Brasil foi de 57% das amostras, inferior aos 84% descritos na Espanha por LUQUE *et al.* (1998). O perfil mais frequente no Canadá, EF-MRP-, foi observado em apenas 4,5% das amostras estudadas.

A grande variedade de combinações entre os três genes pesquisados, observadas nas amostras brasileiras (oito genótipos), pode ser melhor comparada ao descrito na França por BERTHELOT-HÉRAULT *et al.* (2000). Analisando 54 amostras de *S. suis* sorotipo 2 provenientes de animais doentes, estes autores descrevem sete genótipos diferentes, no entanto, a frequência das combinações diferem das aqui descritas. Enquanto, o presente estudo apresenta maior frequência do genótipo EF+MRP+suilisina+ (40,6%), seguido por EF*MRP+suilisina+ (20,3%) e EF+MRP+suilisina- (16,5%), os referidos autores observaram maior frequência de EF+MRP-suilisina- (46,3%), seguido por EF+MRP+suilisina+ (27,7%) e EF-MRP-suilisina- (9,2%). Na França, BERTHELOT-HÉRAULT *et al.*, (2000) relatam frequência inferior de amostras positivas para suilisina (37%) em comparação a frequência observada no Brasil (67,7%). A associação entre a presença de EF* e suilisina e a ausência de amostras MRP variantes também foram observadas nas amostras brasileiras.

Os dados obtidos em relação à presença dos diferentes genótipos nos Estados amostrados revelam uma grande diversidade entre as amostras isoladas, principalmente nos casos em que há um maior número de cepas como em São Paulo e Santa Catarina. Estes dados diferem dos resultados descritos por MARTINEZ *et al.* (2003) analisando amostras provenientes de São Paulo, Paraná e Minas Gerais. Estes autores descrevem dentre 30 cepas de *S. suis* sorotipo 2 a presença apenas de amostras EF*MRP+suilisina+.

A correlação entre a presença dos diferentes genes e o sítio de isolamento revela novamente uma grande diversidade entre as amostras analisadas. Apesar de haver uma maior frequência de amostras EF+MRP+suilisina+ em SNC (42,7%) e trato respiratório (44,5%) não é possível estabelecer uma associação significativa desse perfil com os sítios de isolamento.

Os resultados obtidos na análise das amostras brasileiras sugerem que a diversidade de material genético introduzido no país através da importação de animais de diferentes países (Canadá, Estados Unidos e União Européia) influenciou de modo marcante a disseminação de amostras de *S. suis* com diferentes perfis relativos a produção de EF, MRP e suilisina. A grande variedade de amostras observada pode influenciar de modo significativo o sucesso de programas de vacinação baseados na utilização de bacterinas autógenas ou até mesmo na eficácia de vacinas comerciais produzidas em outros países com diferentes perfis de *S. suis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTHELOT-HÉRAULT, F.; MORVAN, H.; KÉRIBIN, A.M.; GOTTSCHALK, M.; KOBISCH, M. Production of muramidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suilysin by field isolates of *Streptococcus*

- suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Vet. Res.*, v.31, n.5, p.473-479, 2000.
- GOTTSCHALK, M.; HIGGINS, R.; BOUDREAU, M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* v.31, n.8, p.2192-2194, 1993.
- GOTTSCHALK, M.; LEBRUN, A.; WISSELINK, H.; DUBREUIL, J.D.; SMITH, H.; VECHT, U. Production of virulence-released proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can. J. Vet. Res.*, v.62, n.1, p.75-79, 1998.
- GOTTSCHALK, M.; SEGURA, M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet. Microbiol.*, v.76, n.3, p.259-272, 2000.
- HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M.; BEAUDOIN, M.; RAWLUK, S. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in Quebec and Western Canada. *Can. Vet. J.*, v.33, n.1, p.27-30, 1992.
- HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M. Streptococcal disease. In: STRAW, B.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.; TAYLOR, D. (Eds.) *Diseases of swine*. Ames: Iowa State University Press, 1999. p.63-578.
- KING, S.J.; HEATH, P.J.; LUQUE, I.; TARRADAS, C.; DOWSON, C.G.; WHATMORE, A.M. Distribution and genetic diversity of suilysin in *Streptococcus suis* isolated from different diseases of pigs and characterization of the genetic basis of suilysin absence. *Infect. Immun.*, v.69, n.12, p.7572-7582, 2001.
- LUQUE, I.; TARRADAS, C.; ASTORGA, R.; PEREA, A.; WISSELINK, H.; VECHT, U. The presence of muramidase released protein and extracellular factor protein in various serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased and healthy pigs in Spain. *Res. Vet. Sci.*, v.66, n.1, p.69-72, 1999.
- MARTINEZ, G.; CASTRO, A.F.P.; PAGNANI, K.J.R.; NAKAZATO, G.; SILVEIRA, W.D.; GOTTSCHALK, M. Clonal distribution of an atypical MRP⁺EF⁺, and suilysin⁺ phenotype of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains in Brazil. *Can. J. Vet. Res.*, v.67, n.1, p.52-55, 2003.
- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Let. Appl. Microbiol.*, v.8, n.5, p.151-156, 1989.
- TARRADAS, C.; ARENAS, A.; MALDONADO, A.; LUQUE, I.; MIRANDA, A.E.; PEREA, A. Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine: proposal for biochemical parameters. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, n.2, p.578-580, 1994.
- VECHT, U.; WISSELINK, H.J.; REEK, F.H.; STOCKHOFF-ZURWIEDEN, N.; SMITH, H.E. Diagnosis of several capsular serotypes of *Streptococcus suis* by phenotype and PCR and the relation with virulence for pigs. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 14., 1996, Bologna, Italy. *Proceedings*. Bologna: 1996. p.298.
- WISSELINK, H.J.; SMITH, H.E.; STOCKHOFF-ZURWIEDEN, N.; PEPPERKAMP, K.; VECHT, U. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet. Microbiol.*, v.74, n.3, p.237-248, 2000.
- 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. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, n.8, p.2922-2929, 2002.

Recebido em 18/12/03

Aceito em 20/5/04