

## Adenite equina: sua etiologia, diagnóstico e controle

### Strangles: etiology, diagnosis and control

Carina Martins de Moraes<sup>I</sup> Agueda Palmira Castagna de Vargas<sup>II</sup> Fábio Pereira Leivas Leite<sup>III</sup>  
Carlos Eduardo Wayne Nogueira<sup>IV</sup> Carlos Gil Turnes\*

### - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

#### RESUMO

A adenite equina, também conhecida como garrotilho, é uma enfermidade bacteriana contagiosa, causada por *Streptococcus equi*, subsp. *equi*, bactéria  $\beta$  hemolítica do grupo C de Lancefield, que afeta o trato respiratório anterior de equinos de todas as idades, com maior prevalência entre um e cinco anos de idade. Caracteriza-se por produzir secreção mucopurulenta das vias aéreas anteriores e linfadenite dos gânglios retrofaríngeos e submandibulares com formação de abscessos. Fatores de virulência de *S. equi*, subsp. *equi*, incluem cápsula de ácido hialurônico, hialuronidase, estreptolisina O, estreptoquinase, receptores para Fc de IgG, peptidoglicano e proteína M. Dentre esses fatores, a proteína M tem especial importância por ser de membrana com propriedades antifagocitárias e de aderência. A doença tem baixa letalidade e alta morbidade e seus prejuízos econômicos devem-se à perda de performance e custo do tratamento. O diagnóstico clínico e o tratamento não apresentam dificuldades, mas a profilaxia é prejudicada pela baixa eficiência das vacinas disponíveis, com índices de proteção de 50%. O garrotilho pode ocorrer em todas as épocas do ano, mas o frio e a umidade facilitam a sobrevivência do agente e sua disseminação, portanto animais que vivem nos estados mais frios e úmidos do país são mais vulneráveis à infecção. Novas vacinas utilizando antígenos purificados ou de subunidades estão sendo desenvolvidas com a finalidade de incrementar sua potência e evitar efeitos indesejáveis. A comprovação de diferenças de antigenicidade, entre estirpes, alerta sobre a importância da seleção apropriada das cepas vacinais.

**Palavras-chave:** garrotilho, vacina, *Streptococcus equi* subsp. *equi*.

#### ABSTRACT

Strangles is a contagious disease of the respiratory tract of horses produced by *Streptococcus equi* subsp. *equi*, a Lancefield's group C  $\beta$  haemolytic bacterium. It produces a mucopurulent secretion of the anterior airways, as well as lymphadenitis and abscesses. The bacteria synthesizes several pathogenicity factors such a hyaluronic acid capsule, hyaluronidase, streptolysin O, streptokinase, IgG Fc receptors, peptidoglycan and protein M. Among these factors, protein M deserves special importance due to its antifagocitic and adherence properties. The disease has high morbidity and low lethality, and produces economic losses due to low performance and treatment. Clinical diagnosis and treatment are done easily, but prophylaxis is hampered by the low potency of vaccines, that protect around 50 % of vaccinated animals. Strangles may occur during all the year, but cold and humid weather favors the survival of streptococci, making animals that live in regions with those characteristics more prone to infection. New vaccines using purified or subunit antigens have been developed aiming to increase their potency and to avoid undesirable side effects. The demonstration that bacteria strains show differences in their antigenicity, called attention on the selection of appropriate strains to use as antigens.

**Key words:** strangles, vaccine, *Streptococcus equi* subsp. *equi*.

#### INTRODUÇÃO

O Brasil possui o terceiro maior rebanho equino do mundo, com um plantel de 5,9 milhões de

<sup>I</sup>Faculdade de Veterinária e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), CP 354, 96010900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: gil@ufpel.tche.br. \*Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

<sup>III</sup>Instituto de Biologia, UFPEL, Pelotas, RS, Brasil.

<sup>IV</sup>Hospital de Clínicas Veterinária, UFPEL, Pelotas, RS, Brasil.

animais, menor apenas que o da China (8,2 milhões) e do México (6,2 milhões). A equinocultura é responsável, no país, por 1,2 milhões de postos de trabalho, ocupando diretamente mais de 500 mil pessoas, sendo uma importante atividade do agronegócio, com forte interação nos setores de lazer, cultura e turismo. A capacidade dos criadores em produzirem animais de qualidade, fundamenta a perspectiva de crescimento desse setor da pecuária, como exemplifica a exportação brasileira de equinos puros-sangues árabes, que ocupa o segundo lugar no mundo, só inferior aos Estados Unidos da América do Norte (CNA, 2003).

As doenças do aparelho respiratório ocupam o segundo lugar entre as doenças limitantes das atividades dos equinos, inferior somente as que afetam o sistema músculo esquelético, produzindo importantes perdas econômicas. O diagnóstico e prevenção das doenças infecciosas nessa espécie adquirem, portanto, especial significação. A detecção precoce de problemas respiratórios é essencial para o rápido retorno dos animais a sua atividade, bem como na prevenção de complicações secundárias que podem encerrar prematuramente a carreira do animal (AINSWORTH & BILLER, 2000).

A adenite equina é uma bacteriose de alta morbidade, sendo uma das mais frequentes doenças do trato respiratório anterior de cavalos nas regiões mais frias do país (MORAES, 2005). Métodos eficientes e rápidos de diagnóstico de certeza e produtos eficientes, para seu controle, devem ser desenvolvidos para diminuir o impacto econômico da doença.

#### A enfermidade

A adenite equina, também conhecida como garrotilho, é uma enfermidade bacteriana causada pelo *Streptococcus equi*, subsp. *equi*, bactéria  $\beta$  hemolítica, pertencente ao grupo C de Lancefield, que atinge o trato respiratório anterior de equinos, acometendo animais de todas as idades, embora com maior prevalência nos jovens (SWEENEY, 1993; TIMONEY et al., 1997). O agente foi também isolado de camelos (YIGEZU et al., 1997). O termo garrotilho (do espanhol *garrotillo*: angina grave que produz a morte por sufocação, foi incorporado ao português em 1695) (HOUAISS, 2001) refere-se a que os cavalos afetados, mas não tratados, parecem estar sendo estrangulados por garrote devido ao aumento dos linfonodos retrofaríngeos e submandibulares que obstruem a faringe. Equídeos de todas as idades podem ser acometidos por essa doença, embora ela seja mais frequente em animais com menos de cinco anos de idade e, especialmente, em potros (AINSWORTH & BILLER, 2000). Sua morbidade é alta e a letalidade baixa,

sendo seus prejuízos econômicos se devem a gastos com tratamento e suspensão das atividades dos animais. Embora infecções humanas por *S. equi*, subsp. *equi*, sejam infrequentes, há relatos de transmissão interespecífica de outras subespécies. DOWNAR et al. (2001) relataram um caso de meningite por *S. equi*, subsp. *zooepidemicus*, a partir de animais doentes em uma firma tratadora de cavalos, e NICHOLSON et al. (2000), um surto de glomerulonefrite humana, no Brasil, pelo mesmo agente a partir de queijo contaminado.

A transmissão da enfermidade se dá de forma direta por cavalos que estão incubando a doença, que apresentam sinais clínicos, mas estão se recuperando e por portadores ou de forma indireta, por meio de fômites, tais como buçais e outros utensílios, e de pastagens, aguadas e estábulos contaminados com secreções (PRESCOTT & WRIGTH, 2000). O agente permanece, na população, em equinos portadores. Estima-se que vinte por cento dos animais convalescentes ou, aparentemente recuperados, possuem o agente na secreção nasal. Durante os surtos de garrotilho, alguns animais se convertem em portadores assintomáticos, nos quais é possível isolar *S. equi*, subsp. *equi*, após o desaparecimento dos sinais clínicos, sendo fonte de infecção por muitos meses (NEWTON et al., 1997). A bactéria pode permanecer viável nas descargas purulentas por semanas ou meses, e os estábulos permanecem contaminados, se não forem cuidadosamente limpos e desinfetados com iodóforos a 0,02% (CHEMITEC) e clorexidine a 2% (FORT DODGE). Estresse, transporte, excesso de trabalho, viroses e parasitoses aumentam a suscetibilidade dos animais e podem desencadear a enfermidade em animais com infecção latente (SCHILD, 2001).

A enfermidade ocorre quando o *S. equi*, subsp. *equi*, fixa-se às células epiteliais da mucosa nasal e bucal e invade a mucosa nasofaríngea, causando faringite aguda e rinite. Caso o hospedeiro não consiga conter o processo, o agente invade a mucosa e o tecido linfático faríngeo. À medida que a doença progride, desenvolvem-se abscessos principalmente nos linfonodos retrofaríngeos e submandibulares, causando obstrução local por compressão. Sete a 14 dias após, fistulam, drenando na faringe, na bolsa gutural ou no exterior, liberam o pus que contém a bactéria, a qual contamina o ambiente por semanas (KOWALSKI, 2000; PRESCOTT & WRIGTH, 2000). Embora a patogenia da enfermidade seja conhecida, a regulação de muitos eventos-chave, tais como a aderência da bactéria, a invasão dos epitélios e a interação com fagócitos, não são ainda adequadamente conhecidos (SLATER, 2003).

As manifestações clínicas da doença iniciam, em geral, após duas semanas da exposição ao agente. Os animais mostram os sinais clínicos típicos de um processo infeccioso generalizado (depressão, inapetência, febre), assim como secreção nasal, inicialmente serosa, que passa à mucopurulenta e à purulenta em alguns dias, tosse produtiva, dor à palpação da região mandibular e aumento de volume de linfonodos, principalmente submandibulares, além da posição de pescoço estendido devido à dor na região da laringe e faringe (SWEENEY, 1993; AINSWORTH & BILLER, 2000). Em geral, após a drenagem do abscesso, o animal se recupera rapidamente (KOWALSKI, 2000). Embora a doença se apresente geralmente na forma descrita, denominada clássica, alguns cavalos, em especial, animais velhos, podem formar abscessos pequenos ou não produzi-los, como consequência de uma resposta imune gerada por uma infecção prévia por *S. equi*, subsp. *equi*, ou por cepas de baixa virulência (PRESCOTT & WRIGHT, 2000). Embora a letalidade da doença seja muito baixa, pode levar à morte por complicações tais como Garrotilho bastardo, púrpura hemorrágica, empiema da bolsa gútural e pneumonia aspirativa (SWEENEY, 1993; AINSWORTH & BILLER, 2000).

A denominação de garrotilho bastardo, termo que gera controvérsias entre os autores, foi originalmente aplicada a uma linfadenopatia não-supurativa dos linfonodos retrofaríngeos e submandibulares em cavalos velhos, não relacionada à ocorrência de metástases, caracterizada por sua baixa prevalência, mas, quando o tratamento é ineficiente, pode levar o animal à morte (PRESCOTT & WRIGHT, 2000). Caracteriza-se pela disseminação de *S. equi*, subsp. *equi*, a outros linfonodos, além dos submaxilares, submandibulares e retrofaríngeos, provocando abscessos em qualquer parte do corpo, ainda que com maior frequência nos pulmões, mesentério, fígado, baço, rins e cérebro cuja ruptura pode causar infecção generalizada, provocando a morte. Embora as causas de esta forma da doença não sejam bem conhecidas, alguns autores a associam à terapia antimicrobiana inadequada durante a fase de expectoração e fistulização dos linfonodos (KOL et al., 2003).

A púrpura hemorrágica, uma vasculite aguda imuno-mediada que ocorre, em geral, em animais convalescentes de garrotilho, deve-se à precipitação nos capilares de imunocomplexos formados por anticorpos e frações do agente, provocando edema severo dos membros, cabeça e outras partes do corpo (GALÁN & TIMONEY, 1985). Isso pode produzir-se, também, após a aplicação de vacinas. PUSTERLA et al.

(2003) relataram 53 casos de púrpura hemorrágica em equinos, sendo 17 deles expostos ou infectados com *S. equi*, subsp. *equi*, e, em cinco, foram aplicadas vacinas que continham proteína M como antígeno.

O empiema das bolsas gúturais pode ocorrer durante o curso clínico da enfermidade ou no período de convalescença do garrotilho. Os equinos possuem duas bolsas gúturais, sacos ou divertículos da tuba auditiva com capacidade de 300mL, situadas entre a base do crânio e a faringe. A infecção persistente da bolsa gútural pode levar à aspiração de pus e, em alguns casos, à formação de condróides. Esses animais são portadores e constituem a maior fonte de disseminação do agente entre animais suscetíveis (KOWALSKI, 2000).

O diagnóstico de garrotilho pode ser confirmado por isolamento do *S. equi*, subsp. *equi*, a partir de secreção nasal purulenta ou do conteúdo de abscessos, coletada com auxílio de suabe nasal e conservado sob refrigeração até o momento da análise do material. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), frequentemente utilizada na atualidade, detecta o agente vivo ou morto pela amplificação do gene da proteína SeM, permitindo, quando associada à cultura bacteriana, a detecção de até 90% dos portadores (HARRINGTON et al., 2002). AL-GHAMDI et al. (2000) comunicaram uma seqüência repetitiva detectada por PCR que pode ser útil para a tipificação da bactéria. KAWATA et al. (2004), por sua vez, desenvolveram um procedimento que consiste de duas reações de PCR, com uso de sete e oito *primers* simultaneamente em que o tamanho de cada amplicon caracteriza uma espécie diferente de *Streptococcus*.

A técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) pode ser utilizada no diagnóstico indireto da enfermidade, demonstrando a presença de anticorpos. Existe apenas um *kit* comercial em nível mundial para o diagnóstico por ELISA (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA), que utiliza como antígeno proteína M específica de *S. equi*, subsp. *equi*. No teste, não se distingue entre resposta à vacina e à infecção, mas a magnitude dos títulos de anticorpos permite essa diferenciação. Os soros são classificados como negativo (<1:200), fraco positivo (1:200–1:400), positivo moderado (1:800–1:1.600), positivo forte, em animais com quatro a doze semanas após a infecção ou vacinados (1:3.200–1:6.400); e positivo muito forte em equinos com púrpura hemorrágica ou garrotilho bastardo (=1:12.800) (IDEX). Recentemente, a proteína M, produzida no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, RS, foi utilizada como antígeno em reações de ELISA com resultados promissores (MORAES et al., 2007).

O tratamento da enfermidade é feito de acordo com o estágio da doença. Animais que não apresentam abscessos nos linfonodos devem ser tratados com penicilina G, na dosagem de 18.000 a 20.000UI kg<sup>-1</sup> ou trimetoprim, associado a sulfametaxol 20mg kg<sup>-1</sup>, via intramuscular, por 5-10 dias (PRESCOTT & WRIGHT, 2000). Quando há abscessos, aplicam-se substâncias revulsivas, tais como iodo, que facilitam sua maturação para depois serem puncionados. Curativo local deve ser feito posteriormente, através da irrigação do abscesso com solução de iodo a 2%. Animais em risco podem ser tratados preventivamente com penicilina, durante o período de exposição ao microorganismo. Segundo SWEENEY et al. (2005), as complicações devem ser tratadas com terapia de suporte como fluidoterapia, medicações expectorantes e antimicrobianos em dosagens superiores às normalmente recomendadas (Penicilina G acima de 22.000UI kg<sup>-1</sup>).

#### Etiologia e características do agente

Os *Streptococcus spp.* são bactérias Gram-positivas com forma de cocos, catalase negativas, que se dividem em apenas um plano e que, por não se separarem facilmente após a divisão, tendem a formar cadeias. Constituem a principal população de microorganismos da cavidade oral e são os agentes etiológicos de várias doenças de animais e humanos. Entre as formas de classificação desse gênero, destacam-se aquelas baseadas nas características da hemólise e dos antígenos de superfície (grupos sorológicos de Lancefield). Na tabela 1, mostram-se as características bioquímicas dos *Streptococcus β*, hemolíticos do grupo C de Lancefield (AINSWORTH & BILLER, 2000).

As espécies de estreptococos β-hemolíticos mais importantes e frequentemente isoladas de equinos são *S. equi*, subsp. *zooepidemicus*, *S. equi*, subsp. *Equi*, e *S. dysgalactiae*, subsp. *equisimilis*. Dentre esses, o *S. equi*, subsp. *zooepidemicus*, é o microorganismo mais frequentemente isolado, mas o *S. equi*, subsp. *equi*, é o economicamente mais importante devido a sua elevada patogenicidade (KOWALSKI, 2000). EUZEBY (2005) propõe denominar *S. equi*, subsp. *equi*, como *S. equi*, *S. equi*, subsp. *zooepidemicus*, como *S. zooepidemicus* e *S. dysgalactiae*, subsp. *equisimilis*, como *S. equisimilis*.

É necessário diferenciar *S. equi*, subsp. *equi* de *S. equi*, subsp. *zooepidemicus*, para iniciar o tratamento específico antes que se dissemine no rebanho (KOWALSKI, 2000). *S. equi*, subsp. *zooepidemicus*, produz colônias mucóides, com 1 a 3mm de diâmetro, após 18 a 24 horas de cultivo, em

Agar Sangue. A cápsula de ácido hialurônico é frequentemente hidrolisada pela hialuronidase produzida pelo próprio microorganismo durante o cultivo, do que resulta uma colônia achatada, transparente e opaca. *S. equi*, subsp. *equi*, produz também colônias mucóides por causa da cápsula de ácido hialurônico, mas essas apresentam uma coloração dourada em agar sangue e, embora ambas produzam hemólise, mutações no gene da estreptolisina, podem provocar diferenças nas características da hemólise e das colônias (MAY et al., 2004). A diferenciação bioquímica das subespécies baseia-se na capacidade de fermentação de lactose, sorbitol e trealose. *S. equi*, subsp. *equi*, não fermenta nenhum desses carboidratos, *S. equi*, subsp. *zooepidemicus*, fermenta lactose e sorbitol, e *S. equi*, subsp. *equisimilis*, trealose (KUWAMOTO et al., 2001; EUZEBY, 2005). Foram encontradas, porém, cepas atípicas de *S. equi*, subsp. *equi*, fermentadoras de trealose, sorbitol e/ou lactose (GRANT et al., 1993), o que dificulta a caracterização dos agentes. O sistema API 20 STREP, constituído por 20 testes bioquímicos com elevado poder discriminatório, permite diferenciar a maioria dos *Streptococcus*, *Enterococcus* e microorganismos semelhantes mais comuns (BIO MÉRIEUX, 1977).

HARRINGTON et al. (2002) classificaram os fatores de virulência do agente em aqueles que promovem aderência bacteriana, os que interferem na ação do sistema imune e os envolvidos na aquisição de nutrientes, embora seja difícil enquadrar fatores em categorias específicas, já que vários deles têm múltipla função. Fatores de virulência de *S. equi*, subsp. *equi*, incluem cápsula de ácido hialurônico, hialuronidase, estreptolisina O, estreptoquinase, receptores para a Fc de IgG, peptidoglicano e proteína M antifagocítica (TIMONEY & MUKHATAR, 1993; BOSCHWITZ & TIMONEY et al., 1994). LANNERGARD et al. (2003) descreveram uma proteína de 657 aminoácidos denominada CNE que tem a propriedade de ligar colágeno e que, por sua similitude com a proteína CNA de *Staphylococcus aureus*, poderia ser outro fator de virulência. Foram também identificadas duas proteínas extracelulares que se ligam à fibronectina, denominadas FNE (LINDMARK & GUSS et al., 1999; LINDMARK et al., 2001) e SFS (LINDMARK & GUSS et al., 1999), importantes fatores de aderência do agente às células alvo do hospedeiro.

ANZAI et al. (1999) comunicaram que cepas de *S. equi*, subsp. *equi*, da América do Norte, Japão e Irlanda apresentaram uma importante atividade mitogênica e pirogênica, e sugeriram que a diferença na virulência com *S. equi*, subsp. *zooepidemicus*, poderia ser devido a sua capacidade de produzir

Tabela 1 - Caracterização bioquímica de *Streptococcus* do grupo C de Lancefield  $\beta$  hemolíticos isolados de animais.

<i>Streptococcus</i>	<i>equi</i> subsp. <i>equi</i>	<i>equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i>	<i>equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	<i>dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	<i>phocae</i>
Grupo de Lancefield	C	C	C	C, G ou L	F ou C
Esculina	Geralmente +	-	Geralmente +	Geralmente -	-
Hidrólise do hipurato de sódio	-	+	-	-	-
ADH	+	+	+	+	-
$\beta$ -glucuronidase	+	+	+	+	-
CAMP	-	+	-	-	-
Glicogênio*	+	+	+	d	-
Lactose*	-	+	+	Geralmente +	-
Manitol*	-	-	Geralmente -	-	-
Metil $\beta$ -D-glucopiranosido*	+	-	+	d	-
Ribosa *	-	+	-	+	+
Sacarosa *	+	-	+	+	-
Sorbitol*	-	d**	+	-	-
Trealosa *	-	-	Geralmente -	+	-

EUZÉBY, 2004. \*: Acidificação; \*\*: 20 % positivas utilizando API Rapid ID 32 Strep

proteínas análogas às exotoxinas pirogênicas de *S. pyogenes*. ARTIUSHIN et al. (2002) caracterizaram dois mitógenos pirogênicos, denominados SePE-H e SePE-I, e testaram a imunogenicidade dessas proteínas, confirmando que elas conferem maior virulência ao *S. equi*, subsp. *equi*. A cápsula é também um importante fator de patogenicidade, já que cepas, com níveis diferentes de expressão de cápsula, apresentaram diferenças de patogenicidade em vivo e de resistência à fagocitose (ANZAI et al., 1999). TIMONEY et al. (2008) identificaram recentemente em cepas de *S. gwei*, subsp. *equi*, uma IgG endopeptidase, denominada IdeE, previamente descrita somente em *Streptococcus* pertencentes ao grupo A de Lancefield, que demonstrou atividade antifagocítica.

Dentre os fatores de virulência, a proteína M tem especial importância. Ela é uma proteína de membrana que possui atividade antifagocítica e de aderência e está presente em algumas cepas de *Streptococcus* (TIMONEY & MUKHTAR, 1993). Foi caracterizada pela primeira vez por GALÁN & TIMONEY (1987) que clonaram seu gene estrutural e a expressaram em *Escherichia coli*. GALÁN & TIMONEY (1988) compararam cepas de *S. quei*, subsp. *quei*, isoladas, durante um período de dez anos, nos Estados Unidos da América e na Europa e concluíram que existe somente um tipo de proteína M, denominada SeM, específica dessa subespécie. KELLY et al. (2006), porém, analisaram as sequências da região N-terminal de SeM de 60, isolados de 27 surtos de garrotilho e identificaram diferenças em 21 códons do DNA, que resultaram na substituição de 18 aminoácidos, caracterizando os isolados em 15 diferentes subtipos.

O sequenciamento do genoma de *S. equi*, subsp. *equi*, indicou que existem genes que codificam dois tipos de proteína M, uma própria deste microorganismo (SeM), e outra, designada SzPSe, homóloga à proteína M produzida por *S. equi*, subsp. *zooepidemicus* (SzP). SzP e SzPSe apresentam grande homologia (85% de identidade entre os aminoácidos que as constituem), mas SeM e SzPSe têm uma relação distante, possuindo somente um peptídeo sinal e a região de ancoragem à parede celular em comum (TIMONEY et al., 1997). Nesse trabalho, comprovaram que anticorpos provenientes de soros de camundongos, imunizados com a proteína SzPSe, não reagiram com a proteína SeM em testes de opsonização, indicando ausência de imunidade cruzada, o que tem relevância na resposta imune contra uma ou outra proteína M (HARRINGTON et al., 2002). A proteína M inibe a deposição do componente C3b do sistema complemento na superfície da bactéria e liga-se ao fibrinogênio, impedindo a fagocitose (HARRINGTON et al., 2002).

CHANTER et al. (2000) descreveram pela primeira vez em *S. equi*, subsp. *equi*, uma proteína M truncada, resultante de deleções em diferentes porções entre a sequência sinal e a região repetitiva do gene, equivalente a, aproximadamente, 20% da proteína naturalmente expressada. Mesmo com a porção do gene deletada, a virulência da proteína é mantida. Comprovaram que cerca de 80% dos animais portadores apresentaram agentes com essa alteração.

## Imunidade

Desde as primeiras descrições da doença, observou-se que animais recuperados eram resistentes à reinfecção. Posteriormente, PRESCOTT & WRIGHT (2000) comunicaram que 75% dos animais infectados desenvolveram imunidade sólida e duradoura, apesar de poderem ocorrer reinfecções tanto precocemente como seis meses após o desaparecimento da doença clínica.

A resposta imune, tanto sistêmica quanto secretória induzida pela doença espontânea, é dirigida principalmente contra SeM, sugerindo que ela deveria ser um antígeno de eleição para o desenvolvimento de vacinas eficientes. Foi comprovado, porém, que os anticorpos de mucosa contra a proteína M cuja produção requer estímulo local, desaparecem mais precocemente que os circulantes e mesmo que eles possam evitar a aderência do microorganismo à mucosa, seus baixos níveis fazem com que a resposta contra o agente seja ineficiente. SHEORAN et al. (1997) concluíram que, embora as vacinas induzam respostas sorológicas, qualitativa e quantitativamente, similares àquelas encontradas em animais convalescentes, não há indução de imunidade de mucosa adequada. O leite das éguas que se recuperam de garrotilho contêm IgG e IgA contra a proteína M, ainda que o nível de anticorpos dependa da imunocompetência da égua. TIMONEY et al. (2007), porém, avaliaram a aplicação de antígenos expostos ou secretados de *S. equi*, subsp. *equi*, em pôneis e concluíram que a produção de anticorpos séricos tem relevante importância no controle da adenite equina.

Os baixos níveis de imunidade conferidos por vacinas levaram a concluir que, já que a SeM não mostrou variações antigênicas entre cepas, as formas de administração não seriam adequadas para induzirem imunidade de mucosa (SHEORAN et al., 1997). NALLY et al. (2001) comunicaram que uma vacina intranasal de proteína M, contendo sucrose acetato isobutirato (SAIB) como veículo, aumentou a resposta imune. SHEORAN et al. (2002), por sua vez, testaram uma vacina intranasal recombinante, contendo, como antígeno, uma construção de toxina colérica unida a uma sequência de 98 aminoácidos da SeM como antígeno, comprova que, embora a construção induzisse a uma resposta humoral similar à da infecção espontânea, os animais não resistiram ao desafio com *S. equi*, subsp. *equi*.

A informação referente à SeM tem sido gerada a partir do estudo de cepas isoladas na América do Norte ou Europa. Visando a entender os baixos índices de proteção conferidos por vacinas utilizadas no Rio Grande do Sul, MORAES (2005) estimou o Índice de Reatividade Cruzada (IRC) de 10 cepas de *S. equi*,

subsp. *equi*, isoladas de 35 equinos com garrotilho da região sul do Estado, entre elas e com duas vacinas comerciais, comprovando que as cepas apresentaram IRCs indicativos de homogeneidade antigênica entre a maioria delas, mas que os baixos IRCs, com duas vacinas, poderiam explicar a baixa proteção conferida pelas vacinas em condições de campo.

## Vacinas

Os programas de vacinação contra garrotilho não permitem um controle satisfatório em condições de campo (TIMONEY & MUKHATAR, 1993), já que não mais que 50% dos animais vacinados ficam imunes. Os baixos índices de proteção conferidos pelas vacinas em uso pode dever-se, em parte, à inadequada estimulação antigênica ou à curta persistência dos anticorpos no soro, ou porque a proteção nos equinos não seja mediada por anticorpos séricos, mas por imunoglobulinas secretórias da mucosa nasofaríngea, produzidos localmente (SWEENEY, 1993). Embora a vacinação não induza resistência populacional aceitável, os animais imunizados respondem muito mais rapidamente e com níveis mais altos de anticorpos séricos do que de anticorpos secretórios (SWEENEY, 1993; KOWALSKI, 2000; PRESCOTT & WRIGHT, 2000).

Várias vacinas contra garrotilho são utilizadas em diferentes partes do mundo. Entre as diversas vacinas atualmente em uso, há bacterinas e vacinas de subunidades, contendo proteína M ou frações dela. As bacterinas utilizam, geralmente, cepas autóctones de *S. equi*, subsp. *equi*, e hidróxido de alumínio como adjuvante. Algumas vacinas de subunidade utilizam proteína M, obtida por extração com ácido quente ou por tratamento de células íntegras por mutanolisina, enzima hidrolítica da parede celular. Uma empresa australiana produz uma vacina com extrato de células de *S. equi*, subsp. *equi*, apresentada também associada ao toxóide tetânico.

Em 1998, foi lançada, no mercado mundial, a primeira vacina de aplicação intranasal contra o garrotilho contendo uma cepa replicante atenuada de *S. equi*, subsp. *equi*, que teria a vantagem de não produzir os efeitos colaterais causados pela administração de vacinas por via intramuscular ou subcutânea. Embora fosse demonstrada a eficiência dessa vacina (JACOBS et al., 2000), os fabricantes informaram que elas poderiam produzir reações indesejáveis em 5% dos vacinados. Recentemente, foi lançada a primeira vacina britânica contra Garrotilho contendo uma cepa mutante por deleção de *S. equi* subsp. *equi* aplicada na submucosa nasal que, segundo os fabricantes, protege aproximadamente 75% dos

vacinados. Independentemente da vacina, são necessárias, no mínimo, três aplicações para o desenvolvimento de imunidade.

Várias vacinas, elaboradas a partir de novos conceitos, estão sendo avaliadas por diferentes laboratórios. CHANTER et al. (1999) vacinaram camundongos com uma proteína associada ao hialuronato (HAP), presente em *S. qui*, subsp. *equi*, *S. equi*, subsp. *zooepidemicus*, e *S. equi*, subsp. *equisimilis*, e comprovaram uma redução dos sinais clínicos após desafio com *S. equi*, subsp. *equi*. WALKER & TIMONEY (2002) induziram uma mutação específica do gene da hialuronidase sintetase em uma cepa que tem sido usada como vacina intranasal (cepa Pinnacle), para inibir a síntese de cápsula e fornecer um marcador genético facilmente reconhecível por PCR em animais vacinados. FLOCK et al. (2004) avaliaram, em camundongos, os antígenos extracelulares FNZ, EAG e SFS de *S. equi*, subsp. *equi*, como componentes de vacina contra garrotilho e concluíram que esses antígenos são candidatos promissores para uma vacina eficaz. AZEVEDO et al. (2006) avaliaram antígenos de *S. equi*, subsp. *equi*, encapsulados em microesferas biodegradáveis, concluindo que as microesferas são eficientes para carrear antígenos de *S. equi*, apresentando também ação adjuvante.

Entre as vacinas contra garrotilho, disponíveis no Brasil, uma delas, que contém antígenos de *S. equi*, subsp. *equi*, *S. pyogenes*, *Micrococcus pyogenes* e *Pasteurella multocida*, aplicada por via subcutânea, é indicada como curativa e preventiva da enfermidade, de acordo com o fabricante (Laboratório Prado S/A). Outra (Hertape Calier Saúde Animal S/A), composta por uma suspensão de *S. equi*, subsp. *equi*, em soro fisiológico, inativada (ou inativado) por formol, é administrada por via intramuscular e indicada apenas na prevenção do garrotilho. A terceira (Leivas Leite S/A Indústrias Químicas e Biológicas) é uma bacterina constituída por cultivos totais de *S. equi*, subsp. *Equi*, inativados por formol e adsorvidos em gel de hidróxido de alumínio, administrada por via subcutânea e indicada para imunização ativa (ANDREI, 2002).

## CONCLUSÃO

O garrotilho é uma doença de marcada importância econômica na exploração equina brasileira que apresenta, porém, dificuldades em seu diagnóstico laboratorial pela presença de cepas atípicas de *S. equi*, subsp. *equi*, assim como em sua prevenção. O controle da enfermidade requer a detecção precoce e segura de animais portadores, para tanto, é necessário padronizar métodos e interpretações. Técnicas baseadas na

moderna biologia molecular, tais como PCR, clonagem e expressão de proteínas de interesse devem ser validadas, visando a aprimorar sua eficiência e rapidez.

O efetivo controle da doença requer o desenvolvimento de vacinas mais eficientes que as disponíveis. Embora a proteína SeM seja o principal antígeno estudado, outras proteínas estão sendo avaliadas para uso na produção de imunógenos. Subunidades de diferentes toxinas e outros adjuvantes de mucosa poderão induzir imunidade secretória protetora em condições de campo.

## REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, D.M.; BILLER, D.S. Sistema respiratório. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina interna equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.229-230.
- AL-GHAMDI, G.M. et al. Use of repetitive sequence-based polymerase chain reaction for molecular epidemiologic analysis of *Streptococcus equi* subspecies *equi*. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, n.6, p.699-705, 2000.
- ANDREI, E. **Compêndio Veterinário - Dicionário Brasileiro de Medicamentos Veterinários**. 32.ed. São Paulo: Andrei, 2002. p.699.
- ANZAI, T. et al. *In vivo* pathogenicity and resistance to phagocytosis of *Streptococcus equi* strains with different levels of capsule expression. **Veterinary Microbiology**, n.67, p. 277-286, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00051-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00051-6)>. Doi: 10.1016/S0378-1135(99)00051-6
- ARTIUSHIN, S.C. et al. Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE-H and SePE-I of *Streptococcus equi*. **Microbial Pathogenesis**, n.32, p.71-85, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/mpat.2001.0482>>. Doi: 10.1006/mpat.2001.0482.
- AZEVEDO, A.F. et al. Microencapsulation of *Streptococcus equi* antigens in biodegradable microspheres and preliminary immunisation studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.2, n.64, p.131-137, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.04.007>>. Doi: 10.1016/j.ejpb.2006.04.007.
- BIO MERIEUX. **Api 20 strep catalogue analytique**. Marcy-l'Étoile, França: Bio Mérieux, 1997. 278p.
- BOSCHWITZ, J.S.; TIMONEY, J.F. Characterization of the antiphagocytic activity of equine fibrinogen for *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **Microbial Pathogenesis**, n.17, p.121-129, 1994. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/mpat.1994.1058>>. Doi:10.1006/mpat.1994.1058.
- CHANTER, N. et al. Recombinant hialuronate associated protein as a protective immunogen against *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus* challenge in mice. **Microbial Pathogenesis**, n.27, p.133-143, 1999.
- CHANTER, N. et al. *Streptococcus equi* with truncated M-proteins isolated from outwardly healthy horses. **Microbiology**, n.146, p.1361-1369, 2000.

- CHEMITEC. Capturado em 10/12/2007. On line. Disponível em: <http://www.chemitec.com.br/produto.php?PROCODIGO=5>.
- CNA, 2003. **Confederação da agricultura e pecuária do Brasil cria comissão para o setor de agronegócio do cavalo**. Capturado em: 10/02/2005. On line. Disponível em: <http://www.cna.org.br/AgropecuariaAgora/Agora03/ag297.htm>.
- DOWNDAR, J. et al. Streptococcal meningitis resulting from contact with an infected horse. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.6, p.2338-2339, 2001. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/39/6/2358>>. Doi: 10.1128/JCM.39.6.2358-2359.2001.
- EUZÉBY, J.P. **Dictionnaire de bactériologie vétérinaire**. Capturado em 28/01/2005. On line. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/equi.html>.
- FLOCK, M. et al. Recombinant *Streptococcus equi* proteins protect mice in challenge experiments and induce immune response in horses. **Infection and Immunity**, v.72, n.6, p.3228-3236, 2004. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/72/6/3228>>. Doi: 10.1128/IAI.72.6.3228-3236.2004.
- FORT DODGE. **Fort Dodge animal health**. Capturado em 10/12/2007. On line. Disponível em: [http://www.wyeth.com/divisions/fort\\_dodge.asp](http://www.wyeth.com/divisions/fort_dodge.asp).
- GALÁN, J.E.; TIMONEY, J.F. Immune complexes in purpura hemorrhagica of the horse contain IgA and M antigen of *Streptococcus equi*. **Journal of Immunology**, v.135, n.5, p.3134-3137, 1985.
- GALÁN, J.E.; TIMONEY, J.F. Molecular analysis of the M protein of *Streptococcus equi* and cloning and expression of the M protein gene in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.55, n.12, p.3181-3187, 1987.
- GALÁN, J.E.; TIMONEY, J.F. Immunologic and genetic comparison of *Streptococcus equi* isolates from the United States and Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.6, p.1142-1146, 1988.
- GRANT, S.T. et al. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. **Veterinary Record**, v.133, p.215-216, 1993.
- HARRINGTON, D.J. et al. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. **Microbes and Infection**, n.4, p.501-510, 2002. <[http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01565-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01565-4)>. Doi:10.1016/S1286-4579(02)01565-4.
- HOUAISS, A. **Dicionário Houaiss da Língua portuguesa**. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001. 3008p.
- IDDEX. Capturado em 12/11/2008. On line. Disponível em: [http://www.idexx.com/equine/laboratory/sequi\\_elisa/sequi\\_elisarecommend.jsp](http://www.idexx.com/equine/laboratory/sequi_elisa/sequi_elisarecommend.jsp).
- JACOBS, A.A. et al. Investigations towards an efficacious and safe strangles vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated *Streptococcus equi*. **Veterinary Record**, v.20, n.147, p.563-567, 2000.
- KAWATA, K. et al. Simple and rapid PCR method for identification of streptococcal species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. **FEMS Microbiology Letters**, n.237, p.57-64, 2004.
- KELLY, C. et al. Sequence variation of the SeM gene of *Streptococcus equi* allows discrimination of the source of strangles outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.480-486, 2006. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/content/full/44/2/480>>. Doi: 10.1128/JCM.44.2.480-486.2006.
- KOL, A. et al. Complicated strangles: two case reports and a literature review. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v.58, n.4, 2003. Capturado em 04/05/2006. On line. Disponível em: [http://www.isrvma.org/article/58\\_4\\_2.htm](http://www.isrvma.org/article/58_4_2.htm).
- KOWALSKI, J.J. Mecanismo da doença infecciosa. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina interna equina**. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 2000. p.54-56.
- KUWAMOTO, Y. et al. Microplate sugar-fermentation assay distinguishes *Streptococcus equi* from other streptococci of Lancefield's group C. **Equine Veterinary Science**, v.12, n.2, p.47-49, 2001.
- LANNERGARD, J. et al. CNE, a collagen-binding protein of *Streptococcus equi*. **FEMS Microbiology Letters**, n.222, p.69-74, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00222-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00222-2)>. Doi:10.1016/S0378-1097(03)00222-2.
- LINDMARK, H.; GUSS, B. SFS, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus equi*, inhibits the binding between fibronectin and collagen. **Infection and Immunity**, v.67, n.5, p.2383-2388, 1999.
- LINDMARK, H. et al. Comparison of fibronectin-binding protein FNE from *Streptococcus equi* with FNZ from *S. equi* subspecies *zooepidemicus*, reveals a major and conserved difference. **Infection and Immunity**, v.69, n.5, p.3159-3163, 2001. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/69/5/3159>>. Doi: 10.1128/IAI.69.5.3159-3163.2001.
- MAY, J.P. et al. Development of an *in vivo* Himar 1 transposon mutagenesis system for use in *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **FEMS Microbiology Letters**, n.238, p.401-409, 2004.
- MORAES, C.M. et al. Recombinant protein M detects antibodies induced by *Streptococcus equi* strains isolated from cases of strangles. In: INTERNATIONAL VETERINARY IMMUNOLOGY SYMPOSIUM, 8., 2007, Ouro Preto, MG. **Anais do 8º Simpósio Internacional de Imunologia**. Ouro Preto: Brazilian Society for Immunology, 2007. 162p. p.74.
- MORAES, C.M. **Caracterização fenotípica de *Streptococcus equi* e estimativa da reatividade cruzada de cepas isoladas de eqüinos da região sul do Rio Grande do Sul**, 2005. 40f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária, UFPEL.
- NALLY, J.E. et al. Induction of mucosal and systemic antibody specific for SeMF3 of *Streptococcus equi* by isobutirate based delivery system. **Vaccine**, n.19, p.492-497, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00187-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00187-0)>. Doi:10.1016/S0264-410X(00)00187-0.

- NEWTON, J.R. et al. Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*. **Veterinary Record**, v.140, n.4, p.84-90, 1997.
- NICHOLSON, M, L. et al. Analysis of immunoreactivity to a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* M-like protein to confirm an outbreak of post streptococcal glomerulonephritis, and sequences of M-like proteins from isolates obtained from different host species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.11, p.4126-4130, 2000.
- PRESCOTT, J.; WRIGHT, T.B. Strangles in horses. 2000. **Ontario - Ministry of Agriculture and Food**. Acessado em 08/08/2003. On line. Disponível em: <http://www.stranglesinhorse.html>.
- PUSTERLA, N. et al. Purpura haemorrhagica in 53 horses. **Veterinary Record**, v.4, n.153, p.118-21, 2003.
- SHEORAN, A.S. et al. Serum and mucosal antibody isotype responses to M-like protein (SeM) of *Streptococcus equi* in convalescent and vaccinated horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.59, p.239-251, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00074-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00074-3)>. Doi:10.1016/S0165-2427(97)00074-3.
- SHEORAN, A.S. et al. Nasal mucosal immunogenicity for the horse of SeM peptide of *Streptococcus equi* genetically coupled to cholera toxin. **Vaccine**, n.20, p.1653-1659, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00488-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00488-1)>. Doi:10.1016/S0264-410X(01)00488-1
- SCHILD, A.L. Infecção por *Streptococcus equi*. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. p.265-269.
- SLATER, J.D. Strangles, bastard strangles, vives and glanders: archaeological relics in a genomic age. **Equine Veterinary Journal**, v.2, n.35, p.118-120, 2003.
- SWEENEY, C.R. et al. *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19, p.123-134, 2005.
- SWEENEY, C.R. *Streptococcus equi*. In: SMITH, B.P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, 1993. p.531-533.
- TIMONEY, J.F.; MUKHATAR, M.M. The protective M proteins of the equine group *C streptococci*. **Veterinary Microbiology**, n.37, p.389-395, 1993.
- TIMONEY, J.F. et al. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-like proteins SeM and SzPse. **Infection and Immunity**, n.65, p.3600-3605, 1997.
- TIMONEY, J.F.; ARTIUSHIN, S.C. Detection of *Streptococcus equi* in equine nasal swabs and washes by DNA amplification. **Veterinary Record**, n.141, p.446-447, 1997b.
- TIMONEY, J.F. et al. Vaccine potential of novel surface exposed and secreted proteins of *Streptococcus equi*. **Vaccine**, n.25, p.5583-5590, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.040>. doi:10.1016/j.vaccine.2007.02.040.
- TIMONEY, J.F. et al. IdeE reduce the bactericidal activity of equine neutrophils for *Streptococcus equi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.122, p.76-82, 2008. Disponível em: <<<http://dx.doi.org/ee00000001000j.vetimm.2007.10.017>>>. Doi:10.1016/j.vetimm.2007.10.017.
- WALKER, J.A.; TIMONEY, J.F. Construction of a stable non-mucoid deletion mutant of the *Streptococcus equi* Pinnacle vaccine strain. **Veterinary Microbiology**, n.89, p.311-321, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00205-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00205-5)>. Doi:10.1016/S0378-1135(02)00205-5.
- YIGEZU L.M. et al. Isolation of *Streptococcus equi* subspecies *equi* (strangles agent) from an Ethiopian camel. **Veterinary Record**, v.23, n.140, p.608, 1997.