

CARLOS JOSÉ LOCATELLI SALGADO

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE BACTERINA
AUTÓGENA CONTRA MENINGITE
ESTREPTOCOCCICA EM SUÍNOS**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título
de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003**

A meu pai, Plínio, pelos exemplos e ensinamentos.

A minha mãe pelo estímulo e compreensão.

A meus irmãos pelo afeto e companheirismo.

A meus tios e primos pela força e estímulo.

**A meus colegas de república pela amizade
e agradável convivência.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pelo oferecimento do curso.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo financiamento do projeto.

Ao laboratório MICROVET^â pelo apoio nas pesquisas e por ceder as amostras utilizadas no experimento.

Ao Prof. José Lúcio dos Santos pela valiosa orientação e apoio nas atividades e trabalho de pesquisa.

À Prof. Paula Dias Bevilacqua e Prof. Paulo pela grande ajuda nas análises estatísticas.

Aos estagiários Fátima e Luiz Gustavo Siqueira pelo apoio e pela dedicação durante a condução do experimento.

Aos funcionários do setor de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Veterinária da UFV pela colaboração nos trabalhos.

Ao amigo Luiz Gustavo Gomes pela grande ajuda na correção e apoio na feitura da tese.

À todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser concretizado.

ÍNDICE

Resumo.....	vi
Abstract.....	viii
1. Introdução.....	01
2. Revisão de literatura.....	03
2.1. Histórico.....	03
2.2. Etiologia.....	04
2.3. Epidemiologia.....	05
2.4. Fatores de Virulência.....	06
2.4.1. Adesinas e Polissacarídeos Capsulares.....	07
2.4.2. Proteínas Externas: MRP (“Muramidase Release Protein”) e EF (“Extracellular Factor”).....	08
2.4.3. Hemolisina (Suilisina).....	08
2.5. Patogenia.....	09
2.6. Sinais clínicos e lesões.....	10
2.7. Identificação do agente.....	12
2.8. Tratamento e prevenção.....	13
2.9. Imunidade e desenvolvimento de vacinas.....	13
2.10. Desafio.....	17
3. Materiais e métodos.....	18
3.1. Instalações e alimentação.....	18
3.2. Animais.....	19
3.3. Delineamento experimental.....	19
3.3.1. Experimento I.....	19
3.3.2. Experimento II.....	19
3.4. Preparo da bacterina e das amostras para desafio.....	20
3.5. Vacinação.....	21
3.6. Detecção de animais portadores.....	21
3.7. Desafio.....	22
3.8. Avaliação dos sinais clínicos.....	22
3.9. Procedimentos de necropsia.....	23
3.10. Bacteriologia <i>Post-mortem</i>	24
3.11. Análise estatística.....	25

4. Resultados e discussão.....	26
4.1. Detecção de animais portadores do <i>Streptococcus suis</i>..	26
4.2. Sinais clínicos.....	26
4.2.1. Escores médios dos sinais clínicos.....	34
4.3. Lesões.....	38
4.3.1. Escores médios das lesões.....	41
4.4. Bacteriologia.....	43
4.5. Proteção.....	50
5. Resumo e conclusões.....	56
6. Bibliografia.....	59

RESUMO

SALGADO, Carlos J. Locatelli, M.S. Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2003. **Produção e avaliação de bacterina autógena contra meningite estreptococcica em suínos.** Orientador: José Lúcio dos Santos. Conselheiros: Walter Vieira Guimarães e Paula Dias Bevilacqua.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar a eficácia de uma bacterina autógena na proteção de suínos desafiados com *Streptococcus suis* sorotipo 2 de alta virulência e testar vias e doses de inoculação do agente. Foram realizados dois experimentos com 64 animais em cada experimento. No Experimento I, 32 animais foram vacinados aos 21 e 45 dias de idade, através de injeção intramuscular de 2 e 3 mL da bacterina, respectivamente. Os 32 animais restantes constituíram o grupo controle não vacinado. Aos 60 dias de idade os 64 animais foram desafiados via intravenosa, na dosagem de $8,6 \times 10^9$ UFC. No experimento II, 64 animais foram divididos em dois grupos de 32 animais. Um grupo foi vacinado aos 25 (2 mL) e 50 (3 mL) dias de idade, por via intramuscular, e o outro constituiu o grupo controle não vacinado. Os animais foram desafiados aos 88 dias de idade na dosagem de $7,2 \times 10^9$ UFC. Para efeito de desafio, os animais foram divididos em quatro grupos: NVIP - 16 animais não vacinados e desafiados pela via intraperitoneal; NVIV - 16 animais não vacinados e desafiados pela via intravenosa; VIP - 16 animais vacinados e desafiados pela via intraperitoneal; e VIV - 16 animais vacinados e desafiados pela via intravenosa. No Experimento I, não foi possível detectar diferença significativa na proteção, sinais clínicos e lesões ($p > 0.05$) entre os grupos não vacinado e vacinado. Só foi possível detectar diferença significativa no número de animais com isolamento positivo do *S. suis* e na média da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. suis* ($P < 0.01$). Os resultados observados no Experimento II, foram: 1) os grupos NVIV e VIV apresentaram proteção, sinais clínicos e lesões similares ($P > 0.05$), e o número de animais com isolamento positivo do *S. suis* e a média da contagem de colônias de *S. suis* foi mais elevada no grupo NVIV ($P < 0.01$), confirmando os resultados apresentados no

Experimento 1; e 2) os grupos NVIP e VIP apresentaram diferenças significativas para proteção, sinais clínicos, lesões, número de isolamentos positivos e média da contagem bacteriana do agente ($P<0.01$). O grupo NVIP apresentou 5/16 mortes e 11/16 sobreviventes doentes, enquanto que o grupo VIP teve 14/16 sobreviventes sadios e 2/16 de sobreviventes doentes, não apresentando nenhuma morte. A temperatura retal no grupo NVIP foi, em média, $0,5^{\circ}$ C superior à do grupo VIP ($P<0.01$). O escore médio dos sinais clínicos nos grupos NVIP e VIP foi de $1,10\pm 0,10$ e $0,34\pm 0,05$, respectivamente, sendo mais elevado no grupo não vacinado ($P<0.05$). O escore médio das lesões também foi mais elevado no grupo NVIP ($0,89\pm 0,19$) em relação ao grupo VIP ($0,20\pm 0,08$) ($P<0.05$). O isolamento do *S. suis* foi positivo em 9/16 animais do grupo NVIP, com média da contagem bacteriana de $295,25\pm 91,62$ UFC/mL, sendo que no grupo VIP não foi possível isolar o agente em qualquer dos animais. A proteção da vacina para os animais desafiados pela via intraperitoneal foi calculada em 87,5%. Portanto, a via de desafio utilizada influenciou nos sinais clínicos, lesões e isolamento bacteriano dos animais vacinados e não vacinados. A via intravenosa não se mostrou adequada para esse tipo de experimento e a via intraperitoneal apresentou aspectos favoráveis. Finalmente, a vacina mostrou ser eficaz na prevenção da infecção pelo *S. suis* sorotipo 2 de alta virulência, protegendo os animais com uma eficiência estimada de 87,5%.

ABSTRACT

SALGADO, Carlos J. Locatelli, M.S. Universidade Federal de Viçosa, September of 2003. **Production and evaluation of autogenous bacterin against streptococcal meningitis in swine.** Adviser: José Lúcio dos Santos. Committee members: Walter Vieira Guimarães and Paula Dias Bevilacqua.

The present work was developed with the objective to determine the efficiency of an autogenous bacterin against *Streptococcus suis* serotype 2 and to test route and inoculation doses. Two experiments were accomplished with 64 animals in each experiment. In the Experiment I, 32 animals were vaccinated and 32 animals received placebo, being both groups challenged at the 60 days of age. In the Experiment II, the animals were divided in four groups: NVIP - 16 animals not vaccinated and challenged by the intraperitoneal route; VIP - 16 vaccinated animals and challenged by the intraperitoneal route; NVIV - 16 animals not vaccinated and challenged by the intravenous route; and VIV - 16 vaccinated animals and challenged by the intravenous route. All the groups were challenged at the 88 days of age. In the Experiment I, it was not possible to detect significant difference in the protection, clinical signs and lesions ($P > 0.05$) among the groups not vaccinated and vaccinated. However, the isolation of *S. suis* and the average of the bacterial count was higher ($P < 0.01$) in the group not vaccinated. The results observed in Experiment II in the groups NVIV and VIV presented protection, clinical signs and lesions similar ($P > 0.05$), and the number of animals with positive isolation of *S. suis* and the average of the bacterial count was higher in the group NVIV ($P < 0.05$). The groups NVIP and VIP presented significant difference for protection, clinical signs, lesions, number of positive isolations and average of the bacterial agent count ($P < 0.01$). The intravenous challenge route was not appropriate for that experiment type and the intraperitoneal route presented favorable aspects. The vaccine was efficient for prevention of the infection with high virulent *S. suis* serotype 2, protecting the animals with an efficiency of 87.5 percent.

1. INTRODUÇÃO

A meningite estreptocócica dos suínos é uma doença emergente na suinocultura industrializada, sendo causada pelo *Streptococcus suis*, produzindo quadros de septicemia, artrite e meningite nos animais (ALEXANDER, 1992). A infecção pelo *Streptococcus suis* tem sido considerada como uma das doenças de maior incidência na indústria de suínos, particularmente nos últimos 10 anos (GOTTSCHALK E SEGURA, 2000).

A doença apresenta maior incidência em rebanhos de produção intensiva com altas densidades de animais. Granjas com condições sanitárias inadequadas e doenças concomitantes apresentam maior taxa de infecção (AMASS et al., 1997). As taxas de morbidade variam de menos de 1% até mais de 50%, mas raramente são maiores que 5% (WINDSOR, 1977).

Apesar da baixa morbidade, as perdas econômicas devido ao *Streptococcus suis* são muito expressivas, sendo estimadas em centenas de milhões de dólares por ano (STAATS et al., 1997) e medidas convencionais de controle, como a vacinação, tem mostrado resultados não satisfatórios (BLOUIN et al., 1994). No Brasil, a doença foi descrita em todos os estados onde a suinocultura tecnificada tem importância, sendo responsável por grandes perdas econômicas devido a morte de animais e gastos com medicação (SANTOS et al., 1999; DEL' ARCO et al., 2001).

Durante a última década a indústria suína em todo o mundo direcionam seus esforços para produzir rebanhos com mínimo de doenças. Para isso, tem lançado mão de várias técnicas como antibioticoterapia, desmame precoce medicado e principalmente vacinação. Dessa forma, vem conseguindo eliminar ou controlar algumas das doenças (BLOUIN et al., 1994). Entretanto, essas técnicas estão se mostrando pouco eficazes no controle e eliminação do *Streptococcus suis*, que pode ser isolado da nasofaringe de diversos animais doentes ou mesmo sadios (ROBERTSON & BLACKMORE, 1987).

Até o momento, o método mais efetivo de limitar as perdas

econômicas é o tratamento de animais doentes com antimicrobianos injetáveis e a prevenção da doença com uso de antibióticos na ração ou água, fornecidos em períodos de maior probabilidade de ocorrência de surtos. Em rebanhos grandes o controle da meningite pode ser difícil e muito caro (AMASS et al., 1999). Os antibióticos de eleição no caso de surtos da doença são a penicilina ou amoxicilina. Entretanto, os antibióticos estão se tornando menos efetivos devido ao aumento da resistência dos isolados de *Streptococcus suis* (AARESTRUP et al., 1998a; AARESTRUP et al., 1998b; SANTOS et al., 1999; DEL' ARCO, 2001) e seu uso é pouco aceito pelos consumidores devido aos resíduos dos antimicrobianos na carcaça, principalmente quando se visa exportação da carne para países europeus.

ALEXANDER (1992) sugere que o uso de vacinas inativadas autógenas podem apresentar resultados promissores. Muitas dificuldades existem para que a vacinação seja efetiva. Uma delas é que muitos rebanhos de suínos são infectados com múltiplos sorotipos de *Streptococcus suis* e as bacterinas não produzem imunidade cruzada entre a maioria dos sorotipos (SIMONSON et al., 1989). Nesses casos, a vacina autógena tem vantagens sobre a comercial, pois os sorotipos usados são os mesmos encontrados na propriedade.

Alguns fatores têm contribuído negativamente para se obter segurança na vacinação contra a meningite estreptocócica, como a falta de avaliação da interferência da imunidade materna no desenvolvimento da imunidade do leitão pós-desmama (AMASS et al., 1999), falta de conhecimento exato sobre o mecanismo de proteção imune da doença, método de desafio utilizado quase sempre intravenoso, o que não representa a forma original de desafio da doença (TORREMORELL et al., 1999), entre outros.

Em função da importância econômica da doença no Brasil e no mundo e da necessidade de uma vacina realmente eficiente contra o *Streptococcus suis* para a indústria suinícola, o presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de determinar a eficiência de uma bacterina autógena na proteção de leitões desafiados com o *Streptococcus suis* sorotipo 2 de alta virulência e avaliar a melhor via e dose de desafio do

Streptococcus suis sorotipo 2.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

No início da década de 50 na Inglaterra e Holanda, foram relatados pela primeira vez casos de septicemia estreptocócica causando meningite e artrite em porcos e leitões. Posteriormente, Moor (1963) citados por GOTTSCHALK e SEGURA (2000), descreveu estreptococos hemolíticos similares aos que foram isolados em septicemia em porcos na Inglaterra e Holanda, classificando-os em 2 grupos *Lancefield*: S e R. Em 1975, WINDSOR e ELLIOTT, classificaram o organismo como pertencente ao grupo D *Lancefield* e a identificação S e R foi substituída por *Streptococcus suis* tipo I e II, respectivamente. Somente em 1987, o *Streptococcus suis* foi classificado como uma nova espécie por KLIPPER-BALZ e SCHLEIFER (1987), mostrando que o agente era uma espécie geneticamente homogênea e diferente dos demais membros do grupo *Lancefield* D.

No Brasil, a doença foi registrada por ZANUZZO e AVILA (1979), em Santa Catarina, sem, no entanto, apresentar a caracterização bioquímica e sorológica do *Streptococcus suis*. Vários trabalhos no Brasil relatam o isolamento do *Streptococcus suis* em diversos locais do país (REIS et al., 1980; FARINHA et al., 1981; BARCELLOS et al., 1984; GARCIA et al., 1988; BARCELLOS et al., 1995; GIMENEZ et al., 1997). Porém, esses autores somente classificaram as amostras como pertencentes aos sorotipos I e II.

A infecção pelo *Streptococcus suis* é atualmente reconhecida em todo o mundo onde existe suinocultura tecnificada, com casos registrados nos Estados Unidos, Holanda, Inglaterra, Canadá, Espanha, Austrália, Bélgica, Brasil, Dinamarca, Noruega, Finlândia, Alemanha, Irlanda, Japão, entre outros (GOTTSCHALK et al., 1993; KATAOCA et al., 1993; MACLENNAN et al., 1996; STAATS et al., 1997; LUQUE et al., 1998; SANTOS et al., 1999; WISSELINK et al., 2000).

2.2. Etiologia

O *Streptococcus suis* é uma bactéria gram positiva anaeróbica facultativa, que produz ou hemólise em Agar sangue de carneiro ou cavalo, respectivamente. O organismo é um cocobacilo e ocorre sozinho, em pares ou raramente em cadeias curtas (STAATS et al., 1997). A identificação de isolados do *Streptococcus suis* é possível com um mínimo de testes bioquímicos, especialmente quando são originários de suínos doentes (GOTTSCHALK e SEGURA, 2000), mas é recomendado que se faça a sorotipagem da amostra para confirmação (DEL' ARCO, 2001).

Baseado nos antígenos polissacarídeos capsulares, o agente é classificado em 35 sorotipos diferentes, do 1 ao 34 e o ½ (GOTTSCHALK e SEGURA, 2000). Alguns isolados reagem com mais de um antisoro, como o sorotipo ½ e o sorotipo 1 e 14, causando certa confusão. Neste último caso, alguns isolados pertencentes ao sorotipo 1 poderão reagir também com o antisoro do sorotipo 14 (GOTSTSCHALK et al., 1989).

O sorotipo 2 é considerado o mais virulento e mais freqüentemente associado a casos clínicos da doença. Entretanto, em determinadas circunstâncias algumas amostras de outros sorotipos podem se tornar altamente virulentas, como ocorrido com o sorotipo 14 na Inglaterra (HEATH et al., 1996) e o sorotipo ½ e 5 no Canadá (GOTTSCHALK e SEGURA, 2000). Outros sorotipos também são associados à doença em vários países, com os sorotipos ½, 1, 3, 4, 5, 8, 17, 19 e 21 no Canadá (GOTTSCHALK et al., 1993) e ½, 3, 4, 7, 8 e 14 na Inglaterra (MACLENNAN et al., 1996).

No Brasil, SANTOS et al., (1999) descrevem pela primeira vez a distribuição dos sorotipos dessa bactéria em suínos clinicamente doentes, mostrando que o sorotipo 2 é o mais prevalente com 62,7% dos isolados, seguido pelo sorotipo 1, com 7,5%.

Diferenças de virulência entre e dentro dos sorotipos de *Streptococcus suis* são encontradas, sendo que nem todo sorotipo e nem toda amostra de um sorotipo pode vir a causar doença. Algumas

amostras do sorotipo 2 do *Streptococcus suis* podem ser isoladas de animais sem nenhum sinal clínico da doença (STAATS et al., 1997).

2.3. Epidemiologia

O habitat natural do *Streptococcus suis* é o trato respiratório superior, particularmente as tonsilas e a cavidade nasal, podendo também ser encontrado no trato genital e digestivo de suínos. O agente é comumente associado à meningite, entretanto, outras patologias têm sido descritas como artrites, endocardites, pneumonia e septicemia com posterior morte (HIGGINS e GOTTSCHALK, 1999).

As taxas de morbidade variam de menos de 1% até mais de 50%, mas raramente são maiores que 5% (WINDSOR, 1977). Altas taxas de infecção são atribuídas a condições de baixa higiene e, ou doenças concorrentes (HEARD, 1991). Quando estabelecidas medidas apropriadas de tratamento, a letalidade é usualmente baixa (0-5%) (WINDSOR, 1977). Sem tratamento a letalidade pode atingir níveis superiores a 20% (GUISE et al., 1985).

Os suínos são mais intensamente afetados pelo *Streptococcus suis* sorotipo 2 entre 4 a 12 semanas de idade (REAMS et al., 1993). A doença tem picos geralmente após a desmama (por volta de seis semanas de idade) ou quando ocorre a mistura de animais. Suínos de todas as idades podem ser afetados, mas a susceptibilidade diminui com o aumento da idade após a desmama (LAMONT et al., 1980). Entretanto, DEL' ARCO (2001), analisando amostras isoladas em diversos locais no Brasil, observou que a maior ocorrência de casos clínicos acontece dos 50 aos 90 dias de idade e atribuíram a discordância dos seus resultados com os dados da literatura à grande quantidade de medicações preventivas realizadas nas granjas no Brasil após a desmama, com o objetivo de controlar surtos de outras doenças.

A introdução do agente em rebanhos livres ocorre geralmente através de animais portadores assintomáticos, na maioria das vezes animais do rebanho reprodutivo (AMASS et al., 1997). Doenças virais ou bacterianas concomitantes, ventilação deficiente ou qualquer situação de

estresse para o animal podem predispor os suínos a apresentarem a infecção pelo *S.suis* sorotipo 2 (SANFORD, 1989).

Os leitões se contaminam no momento, por via oro-nasal, a partir da própria mãe. A bactéria se localizará no trato respiratório superior dos leitões e também nas tonsilas, podendo contaminar outros animais. Alguns desses animais serão portadores saudáveis e nunca desenvolverão a doença clínica, outros, posteriormente, irão desenvolver bacteremia, alguns septicemia e, finalmente, meningite. Em rebanhos infectados pelo *Streptococcus suis*, grande proporção dos animais pode apresentar infecção subclínica e nunca apresentar os sinais clínicos (GOTTSCHALK e SEGURA, 2000), sendo que o mecanismo exato responsável pelo desencadeamento da doença ainda não é conhecido.

2.4. Fatores de virulência

Os fatores que conferem virulência ao *Streptococcus suis* tipo 2 não são totalmente conhecidos, mas sabe-se que a virulência de determinadas amostras está relacionada a proteínas como o fator extracelular (EF), muraminidase release proteína (MRP) e suilisina (GOTSCHALK e SEGURA, 2000).

Existe uma grande confusão na descrição dos fatores de virulência do *Streptococcus suis*. Entretanto, GOTTSCHALK e SEGURA (2000) mostram que existem amostras virulentas e avirulentas do *Streptococcus suis* sorotipo 2.

HIGGINS e GOTSCHALK (1999) concluíram que diferentes amostras de *Streptococcus suis* têm diferentes combinações de fatores de virulência e que amostras de *Streptococcus suis* são capazes de se manter no organismo do hospedeiro devido a resistência à fagocitose e também pela capacidade do agente de promover a lise dos fagócitos.

Os fatores de virulência demonstrados no *Streptococcus suis* são: fimbria (JAQUES et al., 1990), hemaglutininas (GOTTSCHALK et al., 1990), material capsular (ELLIOTT e TAI, 1978; QUESSY et al., 1994a), parede celular e proteínas externas (VECHT et al., 1996) e hemolisina (GOTTSCHALK et al., 1995).

2.4.1. Adesinas e Polissacarídeos capsulares

Em várias espécies de bactérias, a fimbria e a hemaglutinina são responsáveis pela adesão da bactéria, sendo que essas adesinas podem ser essenciais no estabelecimento da infecção. Apesar disso, acredita-se que existam outros fatores ligados a adesão do *Streptococcus suis* aos tecidos do hospedeiro (HAATAJA et al, 1993).

As adesinas são proteínas de ligação presentes na cápsula do *Streptococcus suis*. Essas proteínas podem participar no processo de estabelecimento da infecção, sendo que algumas amostras possuem maior capacidade de aderência às células no momento da colonização e posterior adesão aos tecidos. Entretanto, amostras avirulentas também podem possuir essas adesinas (HIGGINS e GOTTSCHALK, 1999).

O material capsular é um importante fator de virulência conferindo resistência à fagocitose da bactéria. No entanto, ainda não foram identificados bons fatores de virulência na cápsula do *S. suis* (HIGGINS e GOTTSCHALK, 1999). Os polissacarídeos capsulares do *Streptococcus suis* sorotipo 2 são constituídos de 5 açúcares, incluindo o ácido siálico, sendo este considerado o mais importante por inibir a via alternativa do complemento, proporcionando resistência à fagocitose. A ausência da cápsula em amostras mutantes causa o aumento da hidrofobicidade e da fagocitose do agente por fagócitos de ratos e suínos. Adicionalmente mutantes não capsulados se mostraram avirulentos em ratos e suínos (CHARLAND, et al., 1996). Entretanto, muitas amostras avirulentas do agente são encapsuladas, indicando, provavelmente, que existam outros importantes fatores de virulência. Para reforçar essa hipótese, CHARLAND, et al. (1996) demonstraram que amostras virulentas e avirulentas do *Streptococcus suis* sorotipo 2 possuem a cápsula com tamanho similar e com a mesma concentração de ácido siálico.

GOTTSCHALK e SEGURA (2000) concluíram que a resistência a eliminação do agente no sangue não é determinada somente pela presença dos lipopolissacarídeos capsulares, pois amostras avirulentas com cápsula completa são eliminadas da circulação em menos de 48 horas, enquanto que amostras com a mesma cápsula, só que virulentas, permanecem por mais de 5 dias.

Anticorpos contra o material capsular protegem apenas parcialmente contra a infecção (CHARLAND et al., 1997) e animais convalescentes e protegidos mostram baixo título de anticorpos contra o material capsular (GOTTSCHALK e SEGURA, 2000).

2.4.2. Proteínas externas: MRP (Muramidase Release Protein) e EF (Extracellular Factor)

Proteínas extracelulares têm sido descritas como fatores de virulência do *Streptococcus suis*. SMITH et al. (1997) marcaram dois fatores de virulência: “Muramidase release protein” (MRP) e “extracellular factor” (EF).

Nem todas amostras virulentas de *Streptococcus suis* possuem esses fatores, indicando que provavelmente existem outros fatores responsável pela virulência (VECHT et al, 1996). SMITH et al. (1997) sugerem que a virulência do *Streptococcus suis* é um processo multifatorial e que funções específicas podem ser cumpridas por fatores alternativos. Eles também sugerem que a síntese dessas proteínas pode ser somente coincidentemente associada a virulência do que ser o fator determinante por si.

Entretanto, a associação da MRP e EF com a virulência é observada em amostras isoladas em certos países, mas não em outros. Certamente existe associação entre essas proteínas (principalmente o EF) e a virulência, e um grande número de isolados virulentos possuem esses fatores. Porém, a ausência de uma ou ambas as proteínas não necessariamente está relacionada com a perda da virulência (GOTTSCHALK e SEGURA, 2000).

2.4.3. Hemolisina (Suilisina)

A hemolisina, conhecida como suilisina, tem sido associada a algumas amostras virulentas do sorotipo 2. Essa proteína é uma toxina sabidamente antigênica e que se liga ao colesterol. Tem como mecanismo de ação a formação de poros transmembranas, causando a morte das células (GOTTSCHALK et al., 1995).

Essa hemolisina não é produzida por todas as amostras virulentas de *Streptococcus suis*, indicando não ser essencial para o

desencadeamento da doença (JACOBS et al, 1996). Similarmente ao que ocorre com a MRP e EF, muitas amostras européias são suilisina positivas e as amostras norte americanas produzem variavelmente essa toxina (GOTTSCHALK e SEGURA, 2000).

GOTTSCHALK e SEGURA (2000) relatam que a suilisina possui um certo papel na patogenia da infecção, visto que essa toxina pode estar associada a amostras de *Streptococcus suis* sorotipo 2 de alta virulência e que até aquele momento não encontraram amostras avirulentas do agente que produzem a suilisina.

2.5. Patogenia

O mecanismo pelo qual a bactéria é disseminada pelo corpo do animal não é bem conhecido. A bactéria pode se espalhar sistemicamente a partir da nasofaringe, resultando esporadicamente em septicemia e morte (WINDSOR, 1977).

A patogenia da infecção é influenciada pelo estado de imunidade do hospedeiro, fatores ambientais e virulência da amostra (HIGGINS e GOTTSCHALK, 1999).

A maioria dos estudos da patogenia é voltada para o sorotipo 2 ou para a meningite. O caminho mais provável percorrido pela bactéria seria através da entrada na corrente sanguínea pelas tonsilas, onde possivelmente é o maior sítio de replicação e, desse local, via vasos linfáticos ou pela corrente sanguínea eferente, é levada a vários locais do corpo (WILLIAMS, 1990).

Pesquisadores sugerem que a meningite causada pelo *Streptococcus suis* tem origem em amostras virulentas que são fagocitadas, sobrevivem em mononucleares e ligadas a monócitos são transportadas até o sistema nervoso central, articulações ou cavidades serosas (conhecida como “teoria cavalo de tróia”), sendo descrita por WILLIAMS e BLACKMORE (1990). Entretanto, outros mecanismos de disseminação da bactéria existem, pois apenas uma pequena parte das bactérias permanece fagocitada por monócitos, sendo outra parte carregada por macrófagos e a maioria se mantém livre na corrente sanguínea (HIGGINS e GOTTSCHALK, 1999).

A meningite causada pelo *Streptococcus suis* é sempre precedida de fase de bacteremia (CHARLAND et al, 2000). WILLIAMS (1990) descreve que, nos casos de meningite, há evidências de que o agente é fagocitado por monócitos na corrente sanguínea após sair das tonsilas, sendo carregado até o líquido cefalorraquidiano, via plexo coróide, enquanto as amostras não virulentas são destruídas pela fagocitose. Isso estimula a produção de citocinas pelos monócitos e macrófagos, ocorrendo um processo inflamatório intenso nas meninges, podendo levar a acúmulo de material purulento no local. O aumento de volume do líquido cefalorraquidiano, que ocorre nos casos de meningite, causa aumento da pressão intracraniana, levando a possíveis danos em neurônios, o que gera os sinais clínicos nervosos da doença.

Histologicamente, tem sido descrito a necrose de parede de vasos e algumas oclusões do lúmen, mostrando a invasão de células inflamatórias nas meninges (SANFORT, 1987).

O sistema imune pode ter um papel importante na patogenia da doença. Considerando-se a teoria “operação cavalo de tróia”, citocinas produzidas por fagócitos ativados são capazes de interagir com o *Streptococcus suis*, aumentando a sua fagocitose, desempenhando papel de carrear mais agentes até o SNC, agravando os quadros de meningite. No caso, a migração de leucócitos através da barreira hematoencefálica “abriria portas” para a entrada de mais bactérias no SNC (GOTTSCHALK e SEGURA, 2000).

GOTTSCHALK et al. (1991) estudaram a aderência de amostras de *Streptococcus suis* na cavidade nasal, pulmão e cérebro. Demonstraram, através de micrografias eletrônicas, que as amostras presentes no trato respiratório superior possuem menor capacidade de adesão que as encontradas no cérebro e estas, por sua vez, possuem menor capacidade de adesão do que as encontradas no pulmão.

2.6. Sinais clínicos e lesões

Os principais sinais clínicos descritos em casos agudos da doença são depressão, febre, anorexia, artrite e sinais nervosos que incluem ataxia, tremores, pedalagem, paralisia, opstotomus, nistagmo e

convulsões. Suínos com infecção aguda ou super-aguda podem morrer sem apresentar sinais clínicos evidentes, embora isso não seja comum de ocorrer (WINDSOR, 1977; SANFORD, 1989; VECHT et al., 1996).

A doença aguda pode se tornar crônica, levando o animal a morte ou a se tornar portador sadio. Na doença crônica, pode estar presente artrite e, ou sintomas nervosos residuais (REAMS et al., 1996).

As lesões macroscópicas mais comuns são congestão das meninges, sendo que evidências de encefalite, edema e congestão do cérebro podem estar presentes (WINDSOR, 1977). No caso de poliartrites, as articulações carpais e tarsais são as mais comumente envolvidas (WINDSOR e ELLIOTT, 1975). Nas cavidades torácica e abdominal, depósitos de fibrina e aumento de líquido podem estar presentes. Em alguns casos, podem ser encontradas lesões cardíacas, como: pericardite fibrinopurulenta e, ou endocardite vegetativa valvular (SANFORD, 1987). Lesões pulmonares são comumente associadas a infecções pelo *Streptococcus suis*, mas o tipo de pneumonia causada pode variar de caso para caso. Algumas vezes é comum observar casos de consolidação pulmonar (REAMS et al., 1995).

A lesão histopatológica mais característica de meningite aguda pelo *Streptococcus suis* é um infiltrado difuso de neutrófilos. Outros achados histopatológicos incluem fibrina, edema e infiltrado celular nas meninges e plexo coróide (SANFORD e ROSENDAL, 1984).

Alguns autores atribuíram escores aos sinais clínicos e lesões encontradas nos animais, a fim de avaliar e comparar a gravidade dos quadros clínicos e patológicos entre os grupos experimentais (BLECHA et al., 1995; JACOBS et al., 1996; AMASS et al., 1999).

BLECHA et al. (1995) avaliaram os sinais clínicos com escores de 0 a 3 (normal a severo) para dispnéia, descarga nasal, depressão, e sinais nervosos; e 0 a 4 (nenhum membro afetado a quatro membros afetados) para artrite. Os escores atribuídos às lesões de necropsia foram de 0 a 2 (normal a severo) para meningite, pleurite, pericardite e peritonite; e de 0 a 4 (nenhum membro afetado a quatro membros afetados) para artrite. A temperatura retal era medida diariamente, sem serem atribuídos escores.

2.7. Identificação do agente

A identificação da bactéria como agente etiológico geralmente é feita em laboratório pelo seu isolamento de animais clinicamente doentes. O crescimento do *S. suis* geralmente é feito em Agar sangue de carneiro, onde são observadas pequenas colônias esverdeadas ou transparentes e levemente mucóides. Os testes bioquímicos e os resultados mais esperados para caracterizar o agente são: catalase negativo, Voges-Proskauer negativo, amilase positivo e não crescimento em meio com 6,5% de NaCl (VECHT et al., 1996; AMASS et al., 1997). Entretanto, os parâmetros bioquímicos devem ser usados como uma complementação dos testes sorológicos, pois estes não são critérios satisfatórios para a identificação clara dos isolados (DEL'ARCO, 2001).

Os isolados de *Streptococcus suis* são sorotipados com base nos seus polissacarídeos capsulares, usando 1 ou mais dentre os métodos seguintes: aglutinação em lâmina, imunodifusão, imunoprecipitação e coaglutinação (GOTTSCHALK et al., 1989; PAYVANDI et al., 1989; AMASS et al., 1997; STAATS et al., 1997). A coaglutinação é o teste mais usado mundialmente. Nesse teste, o antisoro para *Streptococcus suis* reage com a proteína A do *Staphylococcus aureus* e é misturado com o isolado a ser identificado. A reação positiva é caracterizada pela formação distinta de grandes agregados (GOTTSCHALK et al., 1993).

O teste de coaglutinação foi descrito por CHISTENSEN et al. (1973), sendo utilizado para a sorotipificação de amostras de *Streptococcus suis*, podendo ser usado como descrito pelo autor ou com algumas modificações (PAYVANDI et al., 1989; GOTTSCHALK et al., 1993). Por ser fácil e rapidamente realizado, a coaglutinação tem sido o teste escolhido pela maioria dos autores para a identificação do *Streptococcus suis* (PAYVANDI et al., 1989; GOTTSCHALK et al., 1993; AMASS et al., 1997; HIGGINS & GOTTSCHALK, 1999; SANTOS et al., 1999; SANTOS et al., 2000).

Existem outros métodos de diagnósticos propostos para identificação da doença, como a imunohistoquímica, imunofluorescência indireta e peroxidase anti-peroxidase (BOYLE et al., 2000). Testes de

ELISA também têm sido desenvolvidos para a identificação do agente e de rebanhos infectados (BLOUIN et al., 1994; KATAOKA et al., 1996). Recentemente, a técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) começou a ser testado para identificação do *Streptococcus suis*, demonstrando alta sensibilidade e especificidade (WISSELINK et al., 1999).

2.8. Tratamento e prevenção

O tratamento de escolha para animais clinicamente doentes é penicilina ou ampicilina injetáveis. Entretanto, é importante ressaltar que animais com sinais clínicos avançados da doença dificilmente se recuperam (SANFORD e ROSS, 1986). Casos de resistência a penicilinas têm sido descritos na literatura desde 1980 e, por isso, torna-se importante a realização de um antibiograma na escolha da droga (DEE et al., 1993). Relatos de resistência do *Streptococcus suis* a diversos agentes antimicrobianos foram descritos por WASTENSON et al. (1994), AARESTRUP et al. (1998a), AARESTRUP et al. (1998b) e DEL' ARCO (2001).

O uso de medicação estratégica na água ou ração, em períodos de maior probabilidade de ocorrência de surtos, é o mais indicado para a prevenção da doença em rebanhos (SANFORD e HIGGINS, 1999). O aparecimento de casos clínicos da doença pode ser minimizado mantendo ventilação adequada, evitando mistura de animais e movimentação excessiva, ou qualquer outro fator que cause estresse (HEARD, 1991).

2.9. Imunidade e desenvolvimento de vacinas

Até o momento, a maioria das vacinas utilizada para proteger contra a infecção pelo *Streptococcus suis* são bacterinas autógenas e os resultados têm sido inconsistentes. As razões exatas que levam a falhas na vacinação não são conhecidas (HIGGINS & GOTTSCHALK, 1999). Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de estabelecer quais mecanismos imunológicos (celulares e humorais) estão relacionados com a proteção contra infecção pelo *Streptococcus suis*, mas ainda não se

conseguiu uma resposta satisfatória (HOLT et al., 1989; STAATS et al., 1997; BUSQUE et al., 1997).

Alguns fatores têm contribuído negativamente para que as vacinas contra a meningite estreptocócica não sejam totalmente eficientes, como a falta de avaliação da interferência da imunidade materna no desenvolvimento da imunidade do leitão pós-desmama (AMASS et al., 1999), falta de conhecimento exato sobre o mecanismo de proteção imune da doença, método de desafio utilizado quase sempre intravenoso, o que não representa a forma natural de desafio da doença (TORREMORELL et al., 1999), falta de conhecimento sobre os fatores de virulência e variação da virulência não somente entre sorotipos, mas também entre amostras do mesmo sorotipo (VETCH et al., 1992).

Foi demonstrado que imunidade protetora passiva pode ser transferida para um suíno através de soro hiperimune (ALEXANDER, 1992). Estudos de proteção passiva indicam que soro de suínos hiperimunizados intravenosamente com bactérias inteiras inativadas pelo formol protegem camundongos e suínos contra desafios homólogos (HOLT et al., 1990).

ANDRESEN e TEGTMEIER (2001) demonstraram a transmissão passiva de imunidade, inclusive com bons resultados de proteção através de injeção de soro hiperimune em leitões um dia antes de serem desafiados com 10^{11} UFC de *Streptococcus suis* sorotipo 2 de alta virulência. O soro hiperimune foi obtido de cavalo inoculado com polissacarídeos capsulares purificados, destacando a importância do material capsular na proteção contra a infecção. WISSELINK et al. (2002) também demonstraram que o material capsular (CPS) pode ter função muito importante em relação à completa proteção imunológica em desafios homólogos, pois animais vacinados com amostras mutantes sem cápsula só conseguiram apresentar proteção parcial. Entretanto, animais vacinados com amostras capsuladas apresentaram proteção total. O perfil e o título de anticorpos nos dois casos eram muito similares, só diferindo em relação à presença de anticorpos para o material capsular nos animais vacinados com amostra capsulada.

A vacinação com bactérias inativadas demonstrou resultados diversos a campo, sendo que os melhores resultados foram obtidos usando vacinas inativadas autógenas (ALEXANDER, 1992). Este achado comprova que proteínas de uma determinada amostra produzem melhor proteção contra desafios homólogos (QUESSY et al., 1994b).

AMASS et al. (1999) relatam que não ocorre proteção em suínos quando usada vacina autógena em dose intramuscular única em leitões com 4 dias de idade. Neste trabalho, os autores citam que somente uma dose da vacina pode não ser suficiente, para gerar uma imunidade protetora contra desafios de *Streptococcus suis* e que a primeira dose da vacina deve ser administrada com no mínimo 3 ou 4 semanas de idade.

QUESSY et al. (1994b) observaram que frações protéicas da bactéria podem gerar proteção contra infecção e que existem determinadas frações protéicas que são mais imunogênicas do que outras.

Vacinas que utilizam amostras avirulentas de *Streptococcus suis* tipo 2 têm sido testadas e alguns trabalhos têm mostrado que produz boa proteção em suínos desafiados experimentalmente, sendo capazes de melhor estimular a imunidade humoral e também a celular do hospedeiro, devido à característica do agente de sobreviver em leucócitos durante um período de tempo (QUESSY et al., 1994c; BUSQUE et al., 1997). Entretanto, a segurança da vacina é questionada para uso a campo, pois não se sabe a capacidade da amostra reverter à virulência (HIGGINS & GOTTSCHALK, 1999).

Vacinas usando fatores de virulência purificados do agente (MRP e EF) proporcionaram proteção parcial (84%) contra desafios com bactérias altamente virulentas MRP+ e EF+. Entretanto, foi constatado que bacterinas autógenas proporcionaram proteção maior (88,8%) do que vacinas purificadas (WISSELINK et al., 2001).

Anticorpos contra a suilisina têm oferecido proteção em ratos e porcos contra a infecção por amostras virulentas de *Streptococcus suis* sorotipo 2 em modelos experimentais (JACOBS et al., 1994; JACOBS et al., 1996). JACOBS et al. (1996) concluíram que a neutralização desse fator de virulência provavelmente é suficiente para proteger os suínos

contra desafios experimentais de *Streptococcus suis*. No entanto, várias amostras virulentas de *Streptococcus suis* sorotipo 2 não produzem a suilisina (GOTTSCHALK e SEGURA, 2000).

WISSELINK et al. (2002) testaram três tipos de vacinas e demonstraram que bacterinas contendo amostra totalmente encapsulada de *Streptococcus suis* sorotipo 2 protegem totalmente leitões contra a doença e mortes depois de desafio com amostra homóloga. Bactérias mutantes não encapsuladas conferiram proteção completa contra letalidade, mas somente proteção parcial contra morbidade. Vacina viva utilizando amostras mutantes não capsuladas conferiram apenas proteção parcial contra morbidade e mortalidade.

Em relação aos adjuvantes utilizados na composição das vacinas, WISSELINK et al. (2001) concluíram que o adjuvante oleoso (emulsão água-óleo) ocasionou uma proteção maior que o adjuvante hidróxido de alumínio. Observaram ainda que o título de anticorpos nos animais onde foi utilizado a vacina com o adjuvante oleoso foi 68% superior ao hidróxido de alumínio.

Possíveis explicações para as falhas das vacinas foram levantadas por vários autores, como a destruição de antígenos protetores ou perda da antigenicidade da bactéria causada pelo aquecimento ou processamento pelo formol (HOLT et al., 1990), fraca imunogenicidade da cápsula bacteriana (SEPÚLVEDA et al., 1996), produção de anticorpos contra antígenos não ligados à virulência do agente (HOLT et al., 1989), ausência de algumas amostras ou sorotipos envolvidos no processo patológico (REAMS et al., 1996) e o grande número de sorotipos virulentos encontrados (VETCH et al., 1992). Outros fatores podem estar envolvidos na resposta imune inadequada contra o *Streptococcus suis*, como idade, status imunológico do animal, contato com animais portadores, diferentes sorotipos de *Streptococcus suis* na preparação da vacina e via de desafio utilizada nos experimentos (BLOUIN et al., 1994; TORREMORELL et al., 1999). HIGGINS & GOTTSCHALK (1999) relatam que até aquele momento não se sabe quais as possíveis causas que geram as falhas de imunidade protetora nos animais.

2.10. Desafio

O método de desafio mais descrito na literatura é a inoculação de culturas de *Streptococcus suis* por via intravenosa. Vários autores têm utilizado essa via em seus experimentos para testar vacinas, imunidade ou patogenicidade (CLIFTON-HADLEY et al., 1984; KATAOCA et al., 1991; BLECHA et al., 1995; JACOBS et al., 1996; BUSQUE et al., 1997; AMASS et al., 1999; WISSELINK et al., 2002). Outras vias também utilizadas para desafio foram injeção nasal (VECHT et al., 1989; TORREMORELL et al., 1999), nebulização de aerossóis (MADSEN et al., 2001b), contato direto e indireto com animais doentes (BERTHELOT-HÉRAULT et al., 2001), via intraperitoneal em leitões (TORREMORELL e PIJOAN, 1996), via intraperitoneal em camundongos (BLOUIN et al., 1994) e a subcutânea (ANDRESEN e TEGTMEIER, 2001). Entretanto, esses autores citam que a utilização de injeção nasal, aerossóis ou contato direto e indireto com animais doentes, não houve reprodução da doença em todos os animais desafiados, apresentando baixa taxa de morbidade.

BERTHELOT-HÉRAULT et al (2001) obtiveram sucesso na transmissão aérea do *Streptococcus suis* sorotipo 2 em leitões, sendo que a transmissão foi mais significativa quando foi utilizada amostras mais virulentas. Através de contato indireto e utilizando amostras de alta virulência, apenas dois animais de um grupo de oito apresentaram sinais clínicos e lesões similares aos observados nos rebanhos. Conseguiram ainda, isolar o agente das tonsilas de todos os susceptíveis e induziram a produção de anticorpos em todos os animais, confirmando a transmissão aérea do agente. Todos os oito animais se tornaram portadores assintomáticos, confirmado pelo isolamento do agente nas tonsilas e presença de anticorpos.

Em trabalhos realizados por MADSEN et al. (2001b) com a transmissão aerógena do *Streptococcus suis*, através de nebulização de aerossóis mais ácido acético a 5%, nove de um total de doze animais expostos e se tornaram portadores do agente, mas apenas três que receberam corticóide cinco dias após o desafio apresentaram sinais clínicos e lesões compatíveis com a doença. A aplicação de corticóides,

segundo os autores, causa uma imunodepressão semelhante à causada pelo estresse nos animais na granja.

ANDRESEN e TEGTMEIER (2001) desafiaram leitões pela via subcutânea, com dosagem de 1×10^{11} UFC e 6×10^{10} UFC. Sete entre oito animais desafiados apresentaram sinais graves da doença, sendo que apenas um animal apresentou sinais nervosos clássicos. Um animal desafiado com 6×10^{10} UFC não apresentou nenhum sinal clínico da doença, tornando-se portador sadio do agente.

A maioria dos autores que tentou a via intravenosa, utilizou a dosagem de 2×10^9 a 4×10^9 UFC, conseguindo reproduzir bem a doença (BLECHA et al., 1995; JACOBS et al., 1996; AMASS, et al. 1999). KATAOCA et al. (1991) conseguiram reproduzir a doença em todos os animais inoculados não vacinados, com uma dose intravenosa de $0,68 \times 10^{10}$ e de $1,78 \times 10^{10}$ UFC. Em seu trabalho de avaliação de vacinas, WISSELINK et al (2002) desafiaram leitões SPF (“specified pathogen-free”) de nove semanas de idade com 1×10^7 UFC/animal, por via intravenosa, conseguindo reproduzir a doença em todos os animais não vacinados (100% morbidade), sendo que no grupo de cinco animais quatro apresentaram sinais nervosos clássicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Instalações e alimentação

O experimento foi realizado no Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os animais foram alojados em um galpão de alvenaria coberto com telhas de amianto e pé direito de 3,0 metros. Foram distribuídos em quatro baias com 4 x 5 metros cada, piso de cimento, cocho de alvenaria e paredes com 80 cm de altura. Os bebedouros eram do tipo pendular, sendo instalados 2 por baia.

Antes da entrada dos animais nas baias, estas foram lavadas com bomba de alta pressão e detergente e desinfetadas com glutaraldeído na concentração de 300 ppm.

Os animais foram alimentados *ad libitum* com a mesma dieta que seria utilizada na granja de origem até cinco dias antes da idade prevista para o desafio. A partir dessa idade foram alimentados com ração sem nenhum tipo de antibiótico ou promotor de crescimento que pudesse interferir no desenvolvimento do *Streptococcus suis* nos animais inoculados.

3.2. Animais

Para cada um dos experimentos, I e II, foram adquiridos sessenta e quatro animais de um único rebanho classificado como GRSC (granja de suínos certificadas), sendo os animais livres de doenças graves (tuberculose, aujeszky, pneumonia enzoótica, brucelose, peste suína clássica, leptospirose e rinite atrófica progressiva) e do *Streptococcus suis* sorotipo 2.

Nos dois experimentos os animais foram desmamados na granja de origem com vinte dias de idade e aproximadamente seis quilogramas. Após a desmama, foram levados ao DVT e alojados nas baias acima citadas, sendo separados de acordo com o grupo experimental.

3.3. Delineamento experimental

3.3.1. Experimento I

Sessenta e quatro animais foram distribuídos em dois grupos: 1) trinta e dois animais controle, não vacinados e desafiados com amostra MVLG-789 (Grupo NV); 2) trinta e dois animais vacinados e desafiados com amostra MVLG-789 (Grupo V). Ambos os grupos foram desafiados pela via intravenosa.

3.3.2. Experimento II

Os animais foram distribuídos em quatro grupos: 1) dezesseis animais controle não vacinados e desafiados pela via intraperitoneal (Grupo NVIP); 2) dezesseis animais vacinados e desafiados pela via intraperitoneal (Grupo VIP); 3) dezesseis animais controle não vacinados e desafiados pela via intravenosa (Grupo NVIV); e 4) dezesseis animais vacinados e desafiados pela via intravenosa (Grupo VIV). Todos os

animais do experimento II foram vacinados e desafiados com a amostra MVLG-789, a mesma amostra do experimento I.

A distribuição dos animais nos grupos foi feita por critério de peso, sendo que os grupos formados foram o mais homogêneo possível.

3.4. Preparo da bacterina e do inóculo para desafio

Para ambos os experimentos foram utilizados os mesmos procedimentos de preparo da bacterina e do inóculo para desafio. A amostra utilizada para produção da bacterina foi a mesma utilizada para o posterior desafio dos animais. A amostra MVLG-789, liofilizada foi selecionada e cedida pelo laboratório Microvet¹, tendo sido isolada de cérebro de animal que apresentava quadro clínico de meningite pelo *Streptococcus suis* sorotipo 2, de uma granja com histórico de surtos de meningoencefalite.

A amostra liofilizada de *Streptococcus suis* foi reidratada e inoculada em Agar Todd Hewitt² acrescido de 10% de sangue desfibrinado de carneiro e incubada a 37° C por 6 horas. A massa bacteriana foi coletada em salina tamponada PBS pH 7,2 e padronizada na concentração $2 \sim 3 \times 10^9$ UFC/mL, através da leitura da densidade óptica da suspensão (absorvância de 0,9), feita em espectrofotômetro à um comprimento de onda de 540 nm. A curva padrão foi traçada anteriormente, fazendo-se leituras de densidade óptica e contagens de colônias em placas. Logo após a padronização, foi preparado e analisado um esfregaço corado pela coloração de Gram, com o intuito de verificar uma possível contaminação por outros microrganismos. Teste de pureza da cultura foi realizado em Agar Todd Hewitt. Esta suspensão foi utilizada para posterior desafio dos animais.

Para produção da bacterina foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima para a obtenção da cultura, sendo ela inativada pela adição de 0,2% de formol a 37% por 12 horas a 37° C. Após a inativação uma alíquota da cultura foi semeada em Agar sangue base³ acrescido de

¹ Microvet Microbiologia Veterinária Especial Ltda. Viçosa, MG, Brasil

² Difco Laboratories, Detroit, MI. EUA

³ Difco Laboratories, Detroit, MI. EUA

10% de sangue desfibrinado de carneiro e incubadas a 37°C por 48 horas. A cultura inativada foi adicionada de 16% de Emulsigem^{®4}, emulsão óleo em água. O teste de inocuidade foi realizado com 5 camundongos pela aplicação intraperitoneal de 200 µl e acompanhados por 10 dias. O teste de esterilidade foi realizado pela inoculação em caldo Tioglicolato e Agar Sabouraud e incubados a 37° C por 72 horas.

3.5. Vacinação

Os animais foram vacinados cinco dias após chegarem da granja, sendo este tempo essencial para adaptação dos mesmos às instalações e diminuir qualquer tipo de estresse.

Os animais do experimento I receberam a primeira dose (2,0 mL) da vacina aos 25 dias de idade e a segunda (3,0 mL) aos 45 dias de idade, todas por via intramuscular profunda no pescoço. A vacinação dos animais foi precedida de anti-sepsia local com algodão embebido em álcool iodado. Os animais não vacinados receberam na mesma data a aplicação do placebo (Agar Todd Hewitt mais adjuvante Emulsigen^R), sendo administrados 2 mL na primeira aplicação e 3 mL na segunda. Os animais foram observados por 2 horas pós-inoculação e depois diariamente por 10 dias a fim de detectar algum tipo de reação indesejável.

Os animais do experimento II receberam a primeira dose da vacina (2 mL) aos 25 dias de idade e a segunda dose (3 mL) aos 50 dias de idade. Todos os procedimentos e cuidados utilizados no experimento I foram repetidos no experimento II.

3.6. Detecção de animais portadores do *Streptococcus suis*

Foram coletados swabs nasais profundos dos animais de ambos experimentos dois dias antes do desafio. Foi realizada uma amostragem na qual se escolheu aleatoriamente dez e cinco animais de cada grupo experimental no experimento I e II, respectivamente, totalizando 20 animais em cada experimento. Ao todo, foram coletados 40 swabs nasais

⁴ MVP Laboratoies, NE, EUA

profundos para detectar possíveis animais portadores do *Streptococcus suis*. Esses swabs foram plaqueados em Agar Todd Hewitt e incubados em anaerobiose parcial a 37° C por 48 horas.

3.7. Desafio

Os animais do experimento I foram desafiados aos 60 dias de idade, quinze dias após terem recebido a segunda aplicação da vacina. O desafio foi realizado na parte da tarde. Os animais foram imobilizados por dois ajudantes, colocados em uma calha e a orelha do animal foi desinfetada com auxílio de algodão embebido em álcool iodado. A dose de desafio utilizada nos animais foi de $8,6 \times 10^9$ UFC, sendo inoculado 2 mL da suspensão na concentração de $4,3 \times 10^9$ UFC/mL, utilizando-se seringa plástica de 3 mL e agulha para aplicação intradérmica (12,7 x 0,33 mm). A via de aplicação foi a intravenosa, na veia marginal da orelha. Logo após a aplicação, os animais foram identificados e soltos nas respectivas baias.

Os animais do experimento II foram desafiados aos 88 dias de idade, 38 dias após a segunda dose da vacina. O desafio foi realizado na parte da manhã. Nos dois grupos onde a via de inoculação foi a intravenosa, os procedimentos de inoculação foram os mesmos do experimento I. Nos grupos, onde o desafio foi intraperitoneal, os animais foram suspensos pelos membros posteriores de “cabeça para baixo”, em posição vertical, com a finalidade de evitar a inoculação em alças intestinais. O local da inoculação foi aproximadamente a 7 cm de distância ao membro posterior e 4 cm à direita da linha média do abdômen. Foram realizados procedimentos de assepsia com algodão e álcool iodado. A inoculação foi feita com agulhas 30 x 10 mm e seringa de 3 mL. A dose de desafio utilizada foi de $7,2 \times 10^9$ UFC, sendo inoculados 3 mL da suspensão (concentração de $2,4 \times 10^9$ UFC/mL) em cada animal.

3.8. Avaliação dos sinais clínicos

Durante sete dias pós-inoculação foi realizada a avaliação dos sinais clínicos diariamente pela tarde no experimento I e pela manhã no experimento II. Os animais que não morreram até o 7° dia foram

sacrificados e submetidos à necropsia.

Os sinais clínicos avaliados nos animais foram: depressão, artrite, sinais nervosos, sinais respiratórios e temperatura retal. Para cada sinal clínico foi atribuído um escore que variou de 0 a 3, variando de normal a severo (Adaptado de BLECHA et al., 1995):

- Apatia: 0 – animal se alimentado, ingerindo água e sem dificuldade em se levantar; 1 – praticamente não se alimenta, ingerindo água e dificuldade em levantar; 2 – não se alimenta, ingere pouca água e levanta somente se forçado; 3 – não se alimenta, não ingere água e decúbito lateral permanente.
- Artrite: 0 – nenhum das articulações afetadas; 1 – uma articulação afetada; 2 – duas articulações afetadas; 3 – três ou mais articulações afetadas.
- Sinais nervosos: membros enrijecidos, cabeça voltada para trás, hiperemia da esclera (olhos vermelhos), nistagmo, opstotomo, pedalagem. 0 – nenhum tipo de sinal nervoso; 1- apenas um tipo de sinal; 2 – dois ou três sinais presentes; 3 – quatro ou mais sinais presentes.
- Sinais respiratórios: 0 – nenhum tipo de sinal; 1 – corrimento nasal leve, pouca dificuldade respiratório e sem tosse; 2 – corrimento nasal leve, dificuldade respiratória e tosse esporádica; 3 – corrimento nasal grave, intensa dificuldade respiratória e tosse freqüente.
- Temperatura retal: 0 – temperatura inferior a 40,5° C; 1 – temperatura entre 40,5° e 40,9° C; 2 – temperatura entre 41° e 41,5° C; 3 – temperatura acima de 41,6° C.

Os animais que morreram durante o experimento foram necropsiados, registrando quantas horas pós-inoculação ocorreu a morte.

3.9. Procedimentos de necropsia

Assim que se detectou a morte, os animais foram necropsiados imediatamente. Os animais foram identificados e avaliados quanto aos seguintes parâmetros: peritonite, pleurisia/pericardite, meningite

(depósitos fibrinopurulentos na calota craniana) e artrites. Para cada parâmetro foi atribuído um escore que variou de 0 a 2 (ausente a severo):

- Peritonite: 0 – ausência de fibrina e, ou líquido na cavidade abdominal; 1 – presença de pequena quantidade de fibrina e, ou líquido na cavidade abdominal; 2 – presença de média ou grande quantidade de fibrina e, ou líquido na cavidade abdominal.
- Pericardite/pleurisia: 0 – ausência de fibrina na cavidade torácica e pericárdio e líquido pericárdico normal; 1 - pequena quantidade de fibrina na cavidade torácica e, ou pericárdio e, ou aumento discreto no líquido pericárdico; 2 – quantidade moderada ou intensa deposição de fibrina no pericárdio e, ou pleura e, ou aumento intenso no líquido pericárdico.
- Meningite: 0 – ausência de congestão das meninges e nenhum depósito de fibrina na calota craniana; 1 – congestão leve a moderada das meninges e, ou depósitos de fibrina leve na calota craniana; 2 – congestão grave das meninges e, ou depósitos de fibrina moderados a intensos na calota craniana.
- Artrite: 0 – nenhuma das articulações afetadas; 1 – uma ou duas articulações afetadas; 2 – três ou mais articulações afetadas. Caracterização da articulação afetada pelo aumento de volume e aspecto do líquido sinovial (turvo ou purulento).

3.10. Bacteriologia *Post-mortem*

Durante os procedimentos de necropsia foram coletados, assepticamente, swabs do cérebro, sangue cardíaco, articulações, peritônio e pleura. Foi feita a padronização dos swabs em relação a quantidade de algodão e ao procedimento de coleta do material nos tecidos contaminados. Apenas uma pessoa foi responsável pela coleta do material, tentando-se obter o máximo de padronização na coleta. No experimento I, também foram coletados 20 fragmentos de pulmões com lesões suspeitas, sendo 12 de animais do grupo não vacinado e 8 de animais do grupo vacinado.

Os swabs e o macerado dos fragmentos de pulmão foram suspensos em 2 mL de salina tamponada (PBS) pH 7,2 e inoculados

em Agar sangue de carneiro a 5% e incubados em anaerobiose a 37° C por 24 a 48 horas. No mínimo três colônias que cresceram na placa foram submetidos a coloração de Gram, testes bioquímicos e sorotipagem.

3.11. Análise estatística

Os resultados obtidos em ambos os experimentos foram submetidos a análise quantitativa. Essa análise foi utilizada para comparação entre os grupos vacinados e não vacinados em relação a: 1) número de mortos e de sobreviventes; 2) número de saudáveis (sem sinais clínicos) e doentes; 3) número de animais com e sem lesões; e 4) número de animais positivos e negativos ao isolamento do *Streptococcus suis*. O número de animais com ou sem as características acima foram avaliados pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

Os escores foram avaliados por análise de variância. O número de animais com cada grau de escores de sinais clínicos nos diversos tempos, bem como os escores das lesões nos grupos vacinados e não vacinados foram analisados segundo a variância, e seguido do teste de Kruskal - Wallis.

A temperatura retal média dos grupos vacinados e não vacinados, bem como a contagem bacteriana no isolamento do *Streptococcus suis*, foram submetidas à ANOVA. Nos casos onde foram obtidas diferenças significativas, o teste de “t-Student” foi usado para identificar possíveis contrastes nas médias entre os grupos.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas Epi Info 6.4 (CDC, Atlanta, E.U.A.) e SAEG 3.5 (UFV, Viçosa-MG, Brasil). Para todos os testes estatísticos, um valor de $p \leq 0.05$ (95% de probabilidade), foi considerado significativo.

O cálculo de proteção da vacina foi estimada utilizando se a taxa de ataque dos animais vacinados (TAv) e não vacinados (TAnv). A proteção da vacina foi calculada quando observada diferença estatística significativa entre os grupos experimentais.

$$TAv = N^{\circ} \text{ vacinados doentes} / \text{número total de vacinados}$$

$$TAnv = N^{\circ} \text{ não vacinados doentes} / \text{número total de não vacinados}$$

Proteção da vacina (%) = [(TAnv – TAv)/TAnv] x 100 (Epi Info 6.4, CDC, Atlanta, E.U.A., 1996).

Também foi calculado o risco relativo, significando quantas vezes mais chance os animais não vacinados teriam de adquirir a doença, quando comparados aos vacinados (Epi Info 6.4, CDC, Atlanta, E.U.A., 1996).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Detecção de animais portadores do *Streptococcus suis*

No experimento I, foi isolado *Streptococcus sp* em 4/20 swabs coletados. No experimento II, foram isolados *Streptococcus sp* e, ou *Staphylococcus sp* em 8/20 swabs nasais coletados dois dias antes do desafio. Em nenhum dos animais, de ambos os experimentos, foi isolado o *Streptococcus suis*.

Segundo HIGGINS & GOTTSCHALK (1999), o habitat natural do *Streptococcus suis* é o trato respiratório superior, particularmente tonsilas e cavidade nasal, sendo indicados swabs nasais ou tonsilares para verificar possível estado de portador do agente. Portanto, com os resultados apresentados acima, foi descartada a possibilidade dos animais experimentais serem portadores sadios do *Streptococcus suis* e apresentarem imunidade contra o agente, comprometendo o resultado dos experimentos. Além disso, a granja de origem dos animais não apresentava histórico da ocorrência de casos ou mesmo de surtos de meningite causada pelo *Streptococcus suis*.

4.2. Sinais clínicos

Noventa e quatro por cento dos animais no experimento I(60/64) apresentaram sinais clínicos graves da doença, com apatia e artrite moderada a severa. Esses animais quase não se locomoviam, permaneciam a maior parte do tempo em decúbito lateral e não alimentavam ou ingeriam água. Somente um animal do grupo não

vacinado e três do grupo vacinado continuava a se alimentar e ingerir água até o fim do experimento.

A média da temperatura retal observada no grupo não vacinado foi de $40,33 \pm 0,18^\circ \text{C}$ e nos vacinados de $40,01 \pm 0,17^\circ \text{C}$, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as mesmas ($p > 0,05$). Entretanto, a temperatura retal foi sempre menor no grupo vacinado, em relação ao grupo controle não vacinado, ao longo do experimento. O comportamento da temperatura retal média dos dois grupos ao longo do tempo apresentou tendência de queda (figura 1). Segundo MUIRHEAD e ALEXANDER (1997) a temperatura retal média normal para leitões nessa faixa etária seria de 39°C . Temperaturas retais abaixo de $38,5^\circ \text{C}$ indicam que o animal está com endotoxemia ou hipotermia e abaixo de $37,5^\circ \text{C}$ indicam que o animal se aproxima da morte. Cento e vinte horas pós-inoculação, a temperatura retal já era inferior à 38°C em 27% dos animais de ambos os grupos, sendo a queda mais acentuada no grupo não vacinado.

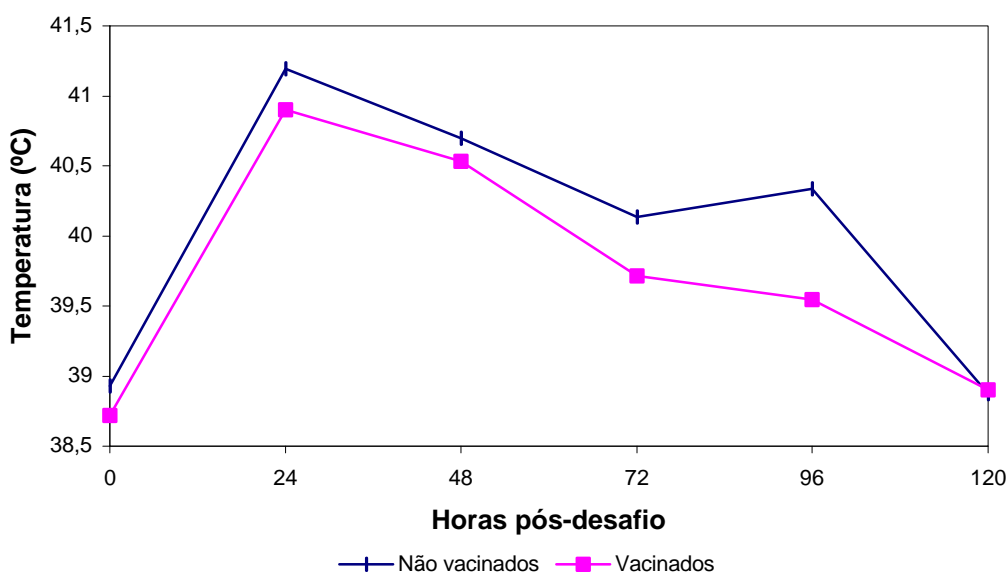


Figura 1: Temperatura retal média após o desafio dos animais dos grupos vacinado e não vacinado, durante o período de acompanhamento, do experimento I.

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) no número de animais que apresentaram sinais clínicos entre o grupo vacinado e não vacinado,

para nenhum parâmetro observado. Os sinais clínicos observados foram semelhantes nos dois grupos, como pode ser observado na Tabela 1.

TABELA 1. Porcentagem de animais que apresentaram sinais clínicos no experimento I

Grupo	Apatia	Artrite	Febre*	Sinais nervosos	Sinais respiratórios
NV	96,87% ^a	96,87% ^a	53,12% ^a	43,75% ^a	25,00% ^a
V	90,62% ^a	90,62% ^a	59,37% ^a	34,37% ^a	15,62% ^a

^a Letras iguais na mesma coluna indicam que não foi observada diferença estatística significativa ($p>0.05$).

* Animais que apresentaram temperatura retal maior ou igual a 40,5° C, em algum momento no experimento.

Em 25% (8/32) dos animais do grupo não vacinado e em 15,62% (5/32) do grupo vacinado apresentaram sinais respiratórios. Dois animais não vacinados e um vacinado apresentaram sinais respiratórios graves. Os sinais respiratórios apresentados pelos animais foram tosse, dispnéia e secreção nasal serosa e mucopurulenta (Tabela 2).

TABELA 2. Número de animais com sinais respiratórios, em relação ao número de animais que apresentaram algum tipo de sinal respiratório no experimento I.

Grupo	Tosse	Dispnéia	Secreção nasal serosa	Secreção nasal mucopurulenta
NV	8/8 ^a	2/8 ^a	4/8 ^a	3/8 ^a
V	5/5 ^a	1/5 ^a	2/5 ^a	1/5 ^a

^a Letras iguais na mesma coluna indicam que não foi observada diferença estatística significativa ($p>0.05$) entre os grupos experimentais.

Em 43,75% (14/32) dos animais não vacinados e em 34,37% (11/31) dos vacinados apresentaram sinais nervosos clássicos da doença. Todos os animais do experimento I que morreram apresentaram previamente sinais nervosos claros, exceto dois animais vacinados que morreram com menos de 24 horas pós desafio. Os sinais nervosos apresentados mais freqüentemente pelos animais foram pedalagem,

opstótomo, nistagmo e olhos vermelhos (Tabela 3). Sete animais no grupo não vacinado e cinco no vacinado apresentaram sinais nervosos graves, com escore 2 ou 3.

TABELA 3. Número de animais com sinais nervosos, em relação ao número de animais que apresentaram algum tipo de sinal nervoso no experimento I

Grupo	Pedalagem	Opstotomo	Nistagmo	Esclera hiperêmica
NV	14/14 ^a	11/14 ^a	8/14 ^a	7/14 ^a
V	11/11 ^a	9/11 ^a	9/11 ^a	8/11 ^a

^a Letras iguais na mesma coluna indica que não foi observada diferença estatística significativa ($p>0.05$) entre os grupos experimentais.

Os sinais clínicos encontrados no experimento I são parecidos aos descritos por diversos autores que realizaram experimentos semelhantes, com exceção dos sinais respiratórios, que não são citados em diversos trabalhos pesquisados (TORREMORELL e PIJOAN, 1996; AMASS et al., 1999; TORREMORELL et al., 1999; MADSEN et al., 2001a; WISSELINK et al., 2002). Entretanto, BERTHELOT-HÉRAULT et al. (2001) em experimento onde testaram a via aerógena como modelo de desafio do *Streptococcus suis* em suínos, observaram quatro entre oito animais com sinais clínicos respiratórios e lesões compatíveis com pneumonia exudativa. REAMS et al. (1995) citam que sinais respiratórios e lesões pulmonares são comumente associadas a infecções pelo *Streptococcus suis* e que o tipo de pneumonia causada pode variar de caso para caso. Algumas vezes é comum observar casos de consolidação pulmonar. GOTTSCHALK et al. (1991) citam que é comum o isolamento de *Streptococcus suis* sorotipo 2 em pulmões de animais com casos de meningite, causando sinais respiratórios e lesões de pneumonia nesses animais. HIGGINS e GOTTSCHALK et al. (1999) citam que são comuns os casos de pneumonias causados pelo *Streptococcus suis* e em alguns casos pode ser o quadro patológico mais comumente encontrado.

A temperatura retal média encontrada por BERTHELOT-HÉRAULT et al. (2001) em animais não vacinados e desafiados por via aerógena foi de $40,6 \pm 0,3^{\circ}$ C, muito semelhante à temperatura observada no grupo não vacinado ($40,33 \pm 0,18^{\circ}$ C). AMASS et al., (1999), encontraram sinais clínicos muito semelhantes aos descritos no experimento I. Observaram artrite em todos os animais e sinais nervosos em 50% e 30 % dos animais não vacinados e vacinados, respectivamente. WISSELINK et al. (2002) observaram sinais nervosos e, ou artrite em 87% e depressão em 100% dos animais não vacinados.

No experimento II, no grupo VIP somente dois e três animais apresentaram apatia e artrite, respectivamente. Já no grupo NVIP, todos os animais apresentaram apatia e artrite. Os grupos desafiados pela via intravenosa apresentaram sinais clínicos semelhantes, não sendo possível verificar diferença significativa entre eles ($p > 0.05$). Ao se comparar o número de animais com e sem sinais clínicos nos grupos vacinado e não vacinado, os grupos desafiados pela via intraperitoneal apresentaram diferença significativa entre si ($P < 0.01$), o que não foi observado nos grupos desafiados pela via intravenosa ($P > 0.05$). Os resultados dos sinais clínicos do experimento II podem ser observados na Tabela 4.

TABELA 4. Porcentagem de animais que apresentaram sinais clínicos no experimento II

Grupo	Apatia	Artrite	Febre*
NVIP	100% ^a	100% ^a	75,0% ^a
VIP	12,5% ^b	18,7% ^b	18,7% ^b
NVIV	100% ^a	100% ^a	68,7% ^a
VIV	93,7% ^a	87,5% ^a	25,0% ^b

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna representa que foi encontrada diferença estatística significativa ($p < 0.05$) entre os grupos experimentais.

* Animais que apresentaram temperatura retal maior ou igual a $40,5^{\circ}$ C, em algum momento no experimento II.

Os grupos desafiados pela via intraperitoneal apresentaram uma temperatura retal média de $40,12 \pm 0,21^{\circ}$ C (não vacinados) e $39,65 \pm 0,12^{\circ}$

C (vacinados). A temperatura retal média dos grupos desafiados pela via intravenosa foi de $39,91 \pm 0,16^\circ \text{C}$ (não vacinados) e de $39,89 \pm 0,16^\circ \text{C}$ (vacinados). As médias da temperatura retal diferiram significativamente entre os grupos vacinado e não vacinado desafiados pela via intraperitoneal ($P=0.01$). Entretanto, não foi possível verificar diferença significativa ($P=0.39$) em relação a média da temperatura retal nos grupos vacinado e não vacinado desafiados pela via intravenosa.

A temperatura retal ao longo do tempo pode ser observado na Figura 2. As temperaturas retais médias ao longo do tempo tendem a cair em todos os grupos no experimento II, e com 120 horas pós-inoculação pode-se observar uma tendência de estabilização.

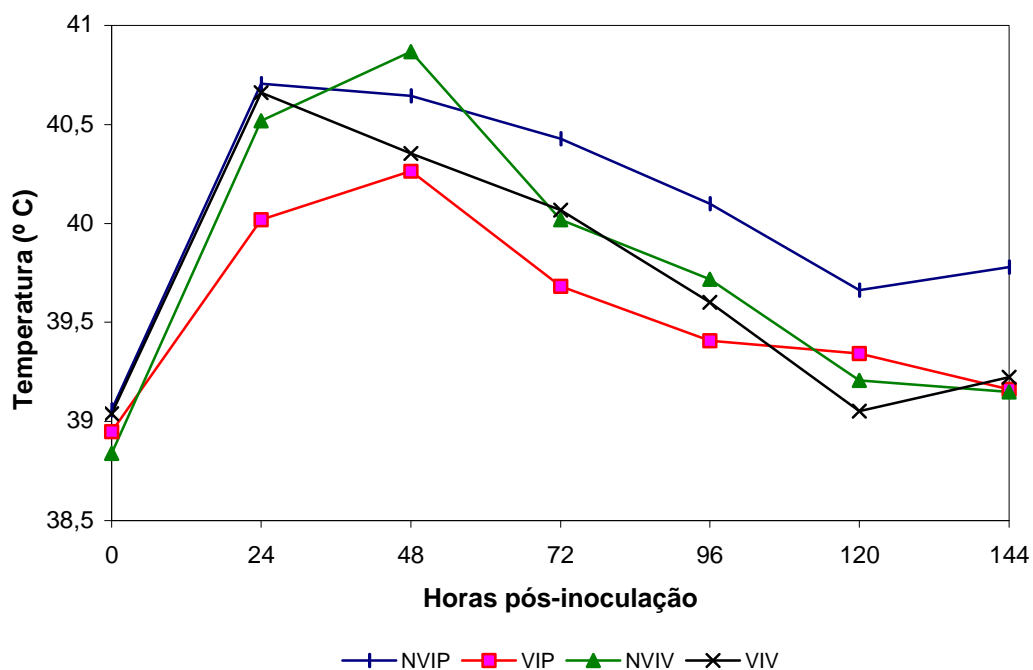


Figura 2: Temperatura retal média após o desafio dos animais dos quatro grupos experimentais, durante o período de acompanhamento, no experimento II.

A temperatura retal média foi mais elevada no grupo NVIP do que nos grupos desafiados pela via intravenosa, embora nenhuma diferença significativa tenha sido observada entre eles ($P>0.05$). O grupo VIP teve a menor média de temperatura retal (Figura 2). A temperatura retal dos grupos desafiados pela via intravenosa sofreu uma queda acentuada

depois de 72 horas de inoculação, apresentando um comportamento similar ao experimento I. Essa queda na temperatura pode ser atribuída ao estado de caquexia apresentado pelos animais no fim do experimento, visto que não se alimentavam ou ingeriam água há muito tempo. Entretanto, a queda de temperatura não foi tão acentuada nos grupos do experimento II devido, provavelmente, a maior reserva corporal desses animais.

No experimento II, nenhum animal apresentou sinais nervosos ou respiratórios. Esse resultado não era esperado, pois foi utilizada a mesma amostra de *Streptococcus suis* do experimento I. As causas da ausência dos sinais nervosos não foram bem entendidas. A única diferença significativa que ocorreu entre os dois experimentos foi a idade de desafio dos animais. As doses de desafio utilizadas em ambos os experimentos foi semelhante, não sendo igual devido a margem de erro padrão da padronização do inóculo por densidade óptica. No experimento I o desafio foi realizado com 60 dias de idade e no experimento II aos 88 dias de idade. Utilizou-se essa idade de desafio mais elevada no experimento II com a intenção de verificar se a vacina proporcionava proteção aos animais por um período mais longo. REAMS et al. (1993) citam em seu trabalho que os suínos são susceptíveis a infecção pelos *Streptococcus suis* de 4 as 12 semanas de idade. Os animais do experimento estavam com 12,3 semanas de idade, podendo ser mais resistentes a penetração do *Streptococcus suis* no SNC. Por outro lado, DEL' ARCO (2001) cita a ocorrência da doença em idades mais avançadas no Brasil em relação às idades mencionadas na literatura internacional. A autora atribui tal fato à grande medicação utilizada nas creches no Brasil, que faz com que ocorra grande incidência da doença até 15 semanas de idade.

As idades de desafio utilizadas por AMASS et al. (1999) e WISSELINK et al. (2002) foram de 14 e 63 dias, respectivamente, não sendo relatada na literatura consultada idades de desafio inferiores ou superiores a estas. A maioria dos trabalhos consultados utilizava desafiar os leitões com 50 a 56 dias de idade (BLECHA et al., 1995; JACOBS et al., 1996; BERTHELOT-HÉRAULT et al., 2001; WISSELINK et al., 2001). Em todos os trabalhos acima citados, os animais desafiados

apresentaram sinais nervosos clássicos da doença. No experimento I, onde os animais foram desafiados com 60 dias de idade, vários animais apresentaram sinais nervosos clássicos, confirmando os resultados da literatura. Entretanto, no experimento II, a idade de desafio foi de 88 dias. Essa idade é bem superior aos 63 dias utilizados por WISSELINK et al. (2002), sendo que nenhum dos animais apresentou sinais nervosos. Talvez essa idade elevada possa ser a causa da ausência dos sinais nervosos no experimento II, e os animais mais velhos podem ser mais resistentes à meningite em condições experimentais.

No experimento II, existiu uma nítida diferença entre os sinais clínicos apresentados pelos animais do grupo VIP e os demais grupos do experimento. Quatorze animais do grupo VIP estavam se alimentando 48 horas pós-inoculação. Com 92 horas pós-desafio, todos os animais desse grupo já estavam comendo e bebendo água. Nos grupos NVIP, NVIV e VIV nenhum animal conseguia levantar para se alimentar. Ao fim do experimento, 144 horas pós-inoculação, além dos animais do grupo VIP, apenas quatro animais (um do grupo NVIP, um do grupo VIV e dois do grupo NVIV) conseguiam levantar-se.

A diferença encontrada entre os animais do grupo VIP e os demais grupos pode ser atribuída ao efeito da vacina. A inoculação pela via intraperitoneal pode ter proporcionado aos animais vacinados tempo necessário para desenvolver uma resposta imune contra o *Streptococcus suis*, impedindo que os animais apresentassem quadros graves da doença. Entretanto, os animais não vacinados ou desafiados pela via intravenosa, possivelmente não conseguiram desenvolver uma resposta imune adequada para a proteção contra a doença grave. Utilizando-se o desafio intravenoso, tem-se um excesso de antígenos inoculados diretamente na corrente sanguínea, sendo a resposta imune insuficiente para a proteção do animal. Diversos autores levantam essa hipótese como uma provável causa da falha das vacinas na proteção dos animais (BLOUIN et al., 1994; TORREMORELL e PIJOAN, 1996; TORREMORELL et al., 1999; BERTHELOT-HÉRAULT et al., 2001; MADSEN et al., 2001b).

4.2.1. Escore dos Sinais clínicos

Os escores médios dos sinais clínicos no grupo não vacinado e vacinado no experimento I foram, respectivamente, $1,37\pm 0,42$ e $1,15\pm 0,41$, não sendo encontrada diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$). Os escores médios dos sinais clínicos observados no experimento I estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Nesse experimento, foi possível observar tendência de aumento nos escores dos sinais clínicos no decorrer do tempo pós-inoculação, exceto para a febre, onde observamos tendência de queda. Em experimento semelhante realizado por JACOBS et al. (1996), os animais desafiados apresentavam tendência de piora nos escores dos sinais clínicos ao longo do tempo.

TABELA 5. Média ponderada dos escores dos sinais clínicos (experimento I), de acordo com as horas pós-desafio.

Grupo	Horas	Apatia	Artrite	Febre ($>40,5$)	Sinais nervosos	Sinais respiratórios
NV	24	2,13	1,87	1,85	0,00	0,00
	48	2,71	2,75	1,20	0,25	0,14
	72	2,52	2,92	0,29	0,92	0,32
	96	2,29	2,33	0,25	0,67	0,54
	120	2,74	2,87	0,00	1,30	1,30
V	24	1,81	1,63	1,63	0,00	0,00
	48	2,38	2,71	0,87	0,17	0,00
	72	2,13	2,79	0,13	0,71	0,21
	96	2,35	2,48	0	0,52	0,35
	120	2,36	2,59	0	0,59	0,32

Na Tabela 6 pode ser observada uma pequena diferença entre a média de escores dos sinais clínicos nos grupos vacinado e não vacinado. A média dos escores dos sinais clínicos nos grupos vacinado e não vacinado foi sempre maior para o segundo grupo, entretanto a

diferença encontrada não foi estatisticamente significativa em nenhum dos casos ($p>0.05$).

TABELA 6. Escores médios e desvio padrão dos sinais clínicos no experimento I, no período de 24 a 120 horas pós-desafio.

Grupo	Apatia	Artrite	Febre ($>40,5$)	Sinais nervosos	Sinais respiratórios
NV	2,48±0,13	2,55±0,22	0,72±0,39	0,63±0,26	0,46±0,26
V	2,20±0,12	2,44±0,23	0,53±0,36	0,40±0,15	0,18±0,08

No experimento II, o escore médio dos sinais clínicos nos grupos NVIP e VIP foi de 1,10±0,24 e 0,34±0,13, respectivamente, sendo possível detectar diferença significativa entre os grupos experimentais ($p<0.01$). No grupo NVIV e VIV, a média do escore dos sinais clínicos foi de 1,08±0,31 e 1,02±0,31, respectivamente, não sendo detectada diferença significativa entre eles ($p>0.05$). Os escores médios dos sinais clínicos nos diversos tempos pós-inoculação podem ser observados na Tabela 7.

Observando-se os escores médios dos sinais clínicos ao longo do tempo pós-inoculação na Tabela 7, é possível verificar uma tendência de melhora nos sinais clínicos apresentados pelos animais em todos os grupos experimentais, sendo mais acentuada para febre e apatia. Esse resultado não está de acordo com o encontrado no experimento I, onde os animais apresentaram tendência de piora no escore dos sinais clínicos, exceto para febre.

As médias dos escores dos sinais clínicos no período completo do experimento II, estão apresentadas na Tabela 8. Como pode ser observado, nenhum animal dos grupos experimentais apresentaram sinais clínicos nervosos ou respiratórios.

TABELA 7. Média ponderada dos escores dos sinais clínicos* (experimento II), de acordo com as horas pós-desafio.

Sinal clínico	Horas	NVIP	VIP	NVIV	VIV
Apatia	24	1,14	0,31	1,31	1,00
	48	1,36	0,63	1,25	1,13
	72	1,73	0,56	1,31	1,13
	96	1,27	0,25	1,38	1,20
	120	1,09	0,13	1,19	1,00
	144	0,73	0,00	0,94	0,88
Artrite	24	1,29	0,24	1,75	1,73
	48	1,36	0,49	1,75	1,80
	72	1,45	0,49	1,94	1,87
	96	1,45	0,49	1,56	1,73
	120	1,45	0,36	1,25	1,67
	144	1,36	0,28	1,50	1,38
Febre	24	1,43	0,25	0,75	0,87
	48	1,18	0,44	1,27	0,53
	72	0,82	0,13	0,27	0,13
	96	0,50	0,00	0,00	0,20
	120	0,09	0,06	0,00	0,07
	144	0,00	0,00	0,06	0,06

* No experimento II os animais não apresentaram sinais nervosos e respiratórios

TABELA 8. Média ponderada dos escores dos sinais clínicos no experimento II, envolvendo os períodos de 24 a 144 horas pós-desafio.

Grupo	Apatia	Artrite	Febre (>40,5)
NVIP	1,22±0,16	1,40±0,06	0,67±0,28
VIP	0,31±0,12	0,39±0,07	0,15±0,08
NVIV	1,23±0,08	1,63±0,12	0,39±0,25
VIV	1,06±0,10	1,70±0,14	0,31±0,06

No experimento II, não houve diferença significativa para nenhum dos sinais clínicos avaliados nos grupos desafiados pela via intravenosa ($P>0.05$), confirmando o resultado encontrado no experimento I. Nos

animais desafiados pela via intraperitoneal, houve diferença significativa nos escores de apatia, artrite e febre ($P < 0.05$).

Os escores médios dos sinais clínicos dos animais desafiados pela via intravenosa no experimento I foram mais elevados do que no experimento II, podendo isso ser atribuído a idade dos animais. Como os animais do experimento II eram mais velhos, provavelmente apresentavam maior resistência a infecção pelo *Streptococcus suis*. A idade mais provável para a ocorrência de surtos de meningite nas granjas é em torno de 6 semanas de idade (LAMONT et al., 1980), sendo os animais mais susceptíveis à infecção entre 4 a 12 semanas (REAMS et al., 1993).

Os animais vacinados desafiados pela via intraperitoneal apresentaram escore médio de sinais clínicos bastante inferiores aos apresentados pelos não vacinados. Essa diferença pode ser atribuída ao efeito da vacina nos animais. Apenas alguns animais vacinados apresentaram sinais clínicos, sendo que estes foram mais brandos e todos se recuperaram totalmente até o fim do experimento.

Os escores médios dos sinais clínicos dos animais de ambos os grupos desafiados pela via intravenosa no experimento II foram semelhantes ao dos animais não vacinados desafiados pela via intraperitoneal. Isso mostra que a inoculação do *Streptococcus suis* por ambas as vias pode ser usada para reproduzir a doença, não sendo notadas diferenças significantes entre os sinais clínicos apresentados pelos animais.

Os animais do experimento II apresentaram tendência de melhora significativa nos sinais clínicos a partir de 96 horas pós-inoculação, provavelmente indicando ocorrência de imunidade humoral e, ou celular contra o *Streptococcus suis*, induzida pela vacina. A melhora foi mais acentuada nos animais vacinados, quando comparados com os animais não vacinados. Os animais do grupo VIP começaram a apresentar melhoras no quadro clínico a partir de 48 horas pós-inoculação, caracterizando uma proteção maior e mais rápida do que nos animais não vacinados.

4.3. Lesões

Todos os sessenta e quatro animais do experimento I foram necropsiados logo após detectada sua morte ou no fim do experimento, quando os sobreviventes foram sacrificados. Os animais foram sacrificados com 120 horas pós-desafio devido a questões humanitárias e de bem estar animal, a fim de evitar o sofrimento excessivo dos leitões.

Nesse experimento, dez animais vacinados morreram em média a 65 ± 20 horas pós-inoculação e nove não vacinados com 39 ± 10 horas pós-inoculação. Dois animais não vacinados morreram com menos de 24 horas pós-inoculação. O primeiro animal a morrer no grupo vacinado foi 48 horas pós-inoculação.

As lesões encontradas foram artrite, peritonite, encefalite, pneumonia e pleurisia e, ou pericardite, com freqüências de 96,87%, 75,00%, 43,75%, 35,94% e 34,37%, respectivamente. As lesões encontradas nos animais do experimento I estão descritas na Tabela 9. Outras lesões encontradas foram áreas de infartos no baço (seis animais), sendo dois vacinados e quatro não vacinados, três animais não vacinados com hidropericárdio, quatro animais não vacinados com pericardite e um animal não vacinado com aderência de pleura. Os dois animais do grupo não vacinado que morreram com menos de 24 horas pós-inoculação não apresentaram lesões graves, sendo encontrado apenas pequenas quantidades de fibrina na cavidade abdominal.

TABELA 9. Porcentagem de animais que apresentando lesões no experimento I

Grupo	Artrite	Peritonite	Pleurisia / Pericardite *	Encefalite **	Pneumonia ***
NV	100% ^a	71,87% ^a	40,62% ^a	53,12% ^a	40,62% ^a
V	93,75% ^a	78,12% ^a	28,12% ^a	34,37% ^a	31,25% ^a

^a Letras iguais na mesma coluna indica que não foi observada diferença estatística significativa ente os grupos experimentais ($p > 0.05$).

* Quatro animais apresentaram pericardite e três hidropericárdio no grupo NV.

** Cinco animais do grupo NV e um do grupo V apresentaram depósito fibrinopurulento na calota craniana.

*** Pneumonia caracterizadas por área de hepatização pulmonar.

O número de animais apresentando lesões no grupo vacinado e não vacinado foi sempre menor para o primeiro grupo, principalmente para encefalite, entretanto, a diferença encontrada não foi estatisticamente significativa em nenhum dos casos. Cinco animais do grupo não vacinado apresentaram lesões graves de encefalite, com depósitos de material purulento na calota craniana. Apenas um animal do grupo vacinado apresentou depósito purulento.

As lesões pulmonares encontradas eram tipos de hepatização que lembravam lesões causadas pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*, apesar de serem animais oriundos de granja livre de pneumonia enzoótica. Em dois animais do grupo não vacinado, foram encontradas lesões de pneumonia que cobriam mais de 50% da área pulmonar. Entre os 23 animais que apresentaram pneumonia, a porcentagem média de área pulmonar atingida no grupo não vacinado foi de 15,26% e nos vacinados foi de 8,88%.

Em trabalhos semelhantes, diversos autores não citam a presença de lesões pulmonares nos animais desafiados (KATAOCA et al., 1991; JACOBS et al., 1996; AMASS et al., 1999; WISSELINK et al., 2001; WISSELINK et al., 2002). Entretanto, lesões pulmonares são comuns em animais infectados pelo *Streptococcus suis*, incluindo áreas de hepatização, broncopneumonias fibrinosas ou supurativas, enfisema interlobular e pleurite fibrinopurulenta (STAATS et al., 1997; HIGGINS e GOTTSCHALK, 1999). MADSEN et al. (2001), utilizando a via de desafio aerógena, encontraram áreas de hepatização pulmonar em três de quatro suínos desafiados. GOTTSCHALK et al. (1991) relatam a capacidade do *Streptococcus suis* de se aderir aos tecidos pulmonares de suínos, causando casos graves de pneumonia.

No experimento II, 31,3% (5/16) dos animais do grupo NVIP morreram com 36±10 horas pós-inoculação e 6,3% (1/16) do grupo VIV morram com 36 horas pós-inoculação. Dois animais do grupo NVIP morreram com menos de 24 horas pós-inoculação e apresentaram apenas quadro de ascite grave com pequena quantidade de fibrina na cavidade abdominal.

A Tabela 10 mostra o número de animais que apresentaram lesões de necropsia para todos os grupos experimentais, no experimento II. As freqüências encontradas para artrite, peritonite e pleurisia/pericardite foram, respectivamente, de 73,44%, 60,93% e 21,87%. Além dessas lesões também foram encontrados pericardite em três animais do grupo NVIP, um no grupo VIP, dois no NVIV e um no VIV, hidroperitônio em quatro animais do grupo NVIP e em um do grupo VIP, hidropericárdio em um animal do grupo NVIP, áreas de infarto no baço em cinco animais do grupo NVIV, dois no grupo VIP e um do grupo VIV e um animal do grupo NVIV com aderências do fígado, pleura e peritônio.

TABELA 10. Porcentagem de animais que apresentaram lesões no experimento II

Grupo	Artrite	Peritonite	Pleurisia / Pericardite	Encefalite	Pneumonia
NVIP	81,25% ^a	93,75% ^a	43,75% ^a	2/16 ^a	0/16 ^a
VIP	37,50% ^b	31,25% ^b	6,25% ^b	0/16 ^a	0/16 ^a
NVIV	81,25% ^a	62,50% ^a	25,00% ^a	0/16 ^a	0/16 ^a
VIV	93,75% ^a	50,00% ^a	2/16 ^a	0/16 ^a	0/16 ^a

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna indica que foi observada diferença estatística significativa entre os grupos experimentais ($p < 0.05$).

O número de animais com lesões sugestivas de infecção pelo *Streptococcus suis* não diferiu estatisticamente entre os animais vacinados e não vacinados com desafio intravenoso ($P > 0.2$). Entretanto, foi observada diferença significativa ($P < 0.01$) no número de animais com lesões entre o grupo VIP com os demais grupos do experimento II.

As lesões mais comumente associadas à infecção pelo *Streptococcus suis* são a artrite, com aumento de volume das articulações e depósito purulento na cavidade sinovial, e a meningite, com a congestão das meninges e depósitos fibrinopurulentos na calota craniana. Fibrina nas cavidades serosas e pneumonia podem estar associadas aos quadros de infecção (STAATS et al., 1997; HIGGINS e GOTTSCHALK, 1999).

KATAOCA et al. (1991); JACOBS et al. (1996); AMASS et al. (1999); WISSELINK et al. (2001); e WISSELINK et al. (2002) citam como principais lesões encontradas nos animais a artrite e a meningite, mesmo quando a via de desafio utilizada não é a intravenosa. AMASS et al. (1999) encontraram 70% (7/10) dos animais desafiados com lesões sugestivas de meningite e 100% (10/10) com artrite. ANDERSEN et al. (2001) encontraram 88% (7/8) com artrite aguda ou poliartrite, 50% com sinais nervosos e 22% apresentaram lesões compatíveis com infecção pelo *Streptococcus suis* (artrite ou poliartrite, pericardite, endocardite, pleurite e peritonite). WISSELINK et al. (2002) encontraram 80% (4/5) de animais com encefalite, 100% (5/5) com artrite e 80% (4/5) com fibrina nas cavidades serosas, no grupo de animais não vacinados. Esses resultados se aproximam muito do encontrado no experimento I, com exceção das lesões pulmonares. Já no experimento II, provavelmente devido à idade mais avançada dos animais, foram encontradas poucas lesões sugestivas de meningite. Foi observado apenas 2/64 animais com congestão cerebral moderada, mas sem depósito purulento na calota craniana. Entretanto, artrite e fibrina nas cavidades serosas foram muito semelhantes ao citado na literatura e ao observado no experimento I.

Devido a ausência de sinais clínicos nervosos e respiratórios nos animais do experimento II, era esperado que não fosse encontrado lesões sugestivas de meningite e pneumonia nos animais.

Os achados de necropsia reforçam os resultados encontrados em sinais clínicos e indicam que os animais do grupo VIP foram mais resistentes à doença do que os animais do grupo NVIP, provavelmente devido ao efeito da vacina.

4.3.1. Escores médios das lesões

No experimento I, os escores médios das lesões foram de $0,53 \pm 0,12$ no grupo vacinado e de $0,66 \pm 0,13$ entre os não vacinados, não tendo sido detectada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos. As médias dos escores das lesões estão representadas na Tabela 11.

TABELA 11. Escore médio das lesões dos animais mortos e sacrificados durante o experimento I

Grupo	Peritonite	Pleurisia / Pericardite	Encefalite	Pneumonia	Infartos de Baço
NV	0,91±0,25	0,66±0,32	0,63±0,23	0,75±0,37	0,38±0,29
V	0,97±0,22	0,38±0,23	0,41±0,21	0,59±0,36	0,31±0,26

Apesar de não ser possível verificar diferença estatisticamente significativa ($P < 0.05$) no escore das lesões entre o grupo vacinado e o não vacinado, é possível notar uma tendência do grupo vacinado a apresentar menores escores. Isso também foi observado nos escores de sinais clínicos. WISSELINK et al. (2001), testando bacterinas para proteção de suínos, observaram tendência do grupo vacinado a apresentar menores escores de lesões e de sinais clínicos em relação ao grupo não vacinado sem, entretanto, encontrar diferença estatística significativa ($P > 0.05$).

Assim como nos sinais clínicos, as lesões encontradas nos animais de ambos os grupos foram similares. Isso pode ser consequência da utilização de uma via de desafio inadequada.

No experimento II, foi observada diferença estatisticamente significativa ($P < 0.01$) no escore do grupo NVIP (1,14±0,43) em relação ao grupo VIP (0,27±0,18). Nos grupos NVIV e VIV os escores médios das lesões foram, respectivamente, 0,71±0,29 e 0,81±0,38, não sendo possível detectar diferenças significantes entre elas ($P > 0.05$). Os resultados dos escores médios das lesões encontradas nos grupos do experimento II podem ser vistos na Tabela 12.

Os escores médios das lesões dos animais vacinados e não vacinados desafiados pela via intraperitoneal apresentaram diferença significativa ($P < 0.05$). Entretanto, os grupos desafiados pela via intravenosa não diferiram entre si ($P > 0.05$). Os resultados se aproximam bastante dos encontrados em sinais clínicos, indicando que somente o grupo VIP foi protegido pela vacina. Os animais do grupo NVIP apresentaram escores de lesões similares aos dos grupos NVIV e VIV ,

não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre eles ($p>0.05$), confirmando a hipótese de que a via intravenosa não é uma via adequada para o desafio dos animais. A utilização dessa via não nos permitiu verificar a eficácia da vacina.

TABELA 12. Escore médio das lesões dos animais mortos e sacrificados durante o experimento II

Grupo	Artrite	Peritonite	Pleurisia / Pericardite	Encefalite	Pneumonia
NVIP	1,13±0,35 ^a	1,56±0,39 ^a	0,75±0,48 ^a	0,13±0,16 ^{a*}	0
VIP	0,44±0,25 ^b	0,31±0,23 ^b	0,06±0,12 ^b	0	0
NVIV	1,00±0,31 ^a	0,81±0,32 ^a	0,31±0,23 ^a	0	0
VIV	1,44±0,39 ^a	0,69±0,34 ^a	0,31±0,34 ^a	0	0

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna representa que foi encontrada diferença estatística significativa ($p<0.05$) entre os grupos experimentais.

* Dois animais apresentaram congestão cerebral moderada.

A diferença entre o grupo vacinado e não vacinado, desafiados pela via intraperitoneal, confirma os resultados apresentados em sinais clínicos, onde também foi detectada diferença significativa, podendo ser atribuída ao efeito da vacina.

4.4. Bacteriologia

Os resultados do isolamento do *Streptococcus suis* da articulação, peritônio, pleura, cérebro e sangue cardíaco no experimento I estão representados na Tabela 13. O *Streptococcus suis* foi isolado com maior frequência na articulação (42,19%), sangue cardíaco (32,81%), peritônio (29,69%), pleura (29,69%) e cérebro (21,87%).

O número de animais com isolamento positivo foi menor no grupo vacinado em relação ao não vacinado. No grupo NV foi possível isolar o *Streptococcus suis* em 30/32 animais (93,7%). No grupo V, o isolamento ocorreu em 17/32 animais (53,1%), sendo encontrada diferença significativa ($P<0.01$) entre o número de animais positivos no isolamento entre os dois grupos. Entretanto, quando comparados o isolamento

bacteriano nos diversos órgãos, só foi observada diferença significativa para o isolamento na articulação ($P<0.01$) e no sangue cardíaco ($P<0.05$). No peritônio, pleura e cérebro, apesar da diferença numérica, não foi detectada diferença significativa ($P>0.2$).

TABELA 13. Número de animais com isolamento positivo do *Streptococcus suis* sorotipo 2 no experimento I

Grupo	Articulação	Peritônio	Pleura	Cérebro	Sangue cardíaco
NV	20/32 ^a	12/32 ^a	11/32 ^a	9/32 ^a	14/32 ^a
V	7/32 ^b	7/32 ^a	8/32 ^a	5/32 ^a	7/32 ^b

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna representa que foi encontrada diferença estatística significativa ($p<0.05$) entre os grupos experimentais.

No experimento I, em todos os 12 fragmentos de pulmão com lesões suspeitas coletados de animais do grupo não vacinados e em 4/8 fragmentos de pulmão coletados do grupo vacinado foram isolados o *Streptococcus suis*. Entretanto, segundo HIGGINS e GOTTSCHALK (1999), o isolamento do *Streptococcus suis* de pulmões deve ser interpretado com cuidado, uma vez que esse organismo é comumente encontrado no trato respiratório superior dos suínos. JACOBS et al. (1996) isolaram o *Streptococcus suis* do pulmão de dois animais que não apresentavam lesões de pneumonia, entretanto, estes animais apresentaram sinais clínicos nervosos e lesões graves da doença.

A análise dos resultados nos indica que a vacina ajudou na eliminação do agente nos animais infectados. Apesar da vacina não apresentar redução significativa dos sinais clínicos e lesões, parece estimular o sistema imune a eliminar o agente do organismo animal.

Na Figura 3 esta indicada as médias da contagem do *Streptococcus suis* nos animais vacinados e não vacinados. A média da contagem bacteriana foi significativamente ($P<0.01$) mais elevada no grupo de animais não vacinados ($209,92\pm 54,99$) do que no grupo vacinado ($102,34\pm 40,99$). Quando analisado os diversos locais onde se tentou o isolamento, a diferença foi significativa para a média da

contagem bacteriana na articulação ($P<0.01$), não sendo significativa para as médias das contagens no cérebro ($P=0.41$), sangue cardíaco ($P=0.11$), peritônio ($P=0.14$) e pleura ($P=0.66$).

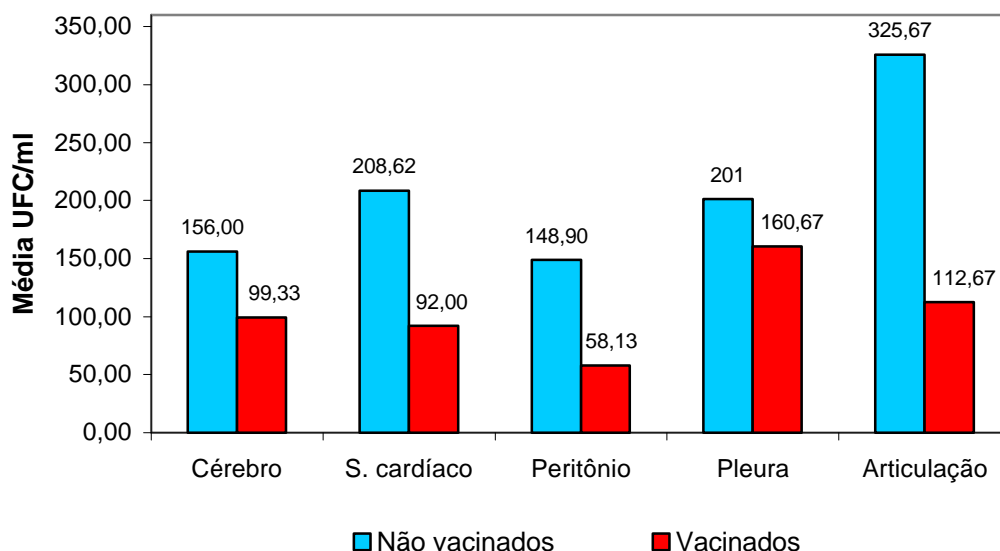


Figura 3: Contagem bacteriana média (UFC/mL) dos grupos no experimento I

O número de animais positivos no isolamento do *Streptococcus suis* e as médias das contagens bacterianas no grupo vacinado foram inferiores aos do grupo não vacinado, indicando algum efeito da vacina em estimular o sistema imune a eliminar o agente do organismo. Em alguns trabalhos realizados para teste de bacterinas, os autores relatam que os animais vacinados possuíam maior chance de eliminar o agente do organismo do que os animais não vacinados (ANDRESEN et al., 2001; WISSELINK et al., 2002).

A média da contagem bacteriana nos nove animais não vacinados mortos durante o experimento I foi de $435,23 \pm 134,41$ UFC/mL e dos dez animais vacinados foi de $219,32 \pm 108,13$ UFC/mL, sendo encontrada diferença significativa entre eles ($P=0.02$). Entretanto, quando comparadas as médias das contagens bacterianas em cada local onde se tentou o isolamento, não foi detectada diferença significativa ($P>0.05$) em nenhum dos locais (Tabela 14).

TABELA 14. Média da contagem bacteriana (UFC/mL) nos animais mortos durante o experimento I.

Grupo	Articulação	Peritônio	Pleura	Cérebro	Sangue cardíaco
NV	608 ^a	115 ^a	495 ^a	460 ^a	505 ^a
V	305 ^a	122 ^a	184 ^a	279 ^a	207 ^a

^a Letras iguais na mesma coluna representa não que foi encontrada diferença estatística significativa ($p>0.05$) entre os grupos experimentais.

Isolou-se o *Streptococcus suis* em todos os nove animais do grupo não vacinado que morreram durante o experimento. No grupo vacinado, em oito dos dez animais mortos foi isolado o *Streptococcus suis*. Em dois animais que morreram com menos de 24 horas pós-inoculação, não foi obtido isolamento positivo do *Streptococcus suis*, indicando possivelmente um choque séptico. A contagem bacteriana nos animais mortos ($320,38\pm 90,07$ UFC/mL) foi mais alta ($P<0.05$) do que a média nos animais sacrificados ($155,96\pm 63,74$ UFC/mL).

MADSEN et al. (2001b), testando a via de inoculação aerógena para o *Streptococcus suis*, observaram isolamento positivo em todos os animais que apresentaram sinais clínicos e lesões macroscópica e em ¼ dos animais sadios. WISSELINK et al. (2002) conseguiram isolamento positivo em todos os animais que apresentaram lesões no grupo não vacinado. Em dois de cinco animais vacinados, mesmo apresentando lesões características da doença, não foi obtido sucesso no isolamento do agente.

No experimento II, o isolamento do *Streptococcus suis* foi feito por meio da coleta de swabs dos animais necropsiados. Os resultados do isolamento podem ser observados na Tabela 15.

Nos 32 animais desafiados pela via intravenosa, foi obtido o isolamento do *Streptococcus suis* em 9/16 animais do grupo não vacinado e em 3/16 do grupo vacinado, sendo observada diferença significativa entre eles ($P<0.05$). Entretanto, não houve diferenças significativas ($P>0.05$) entre os grupos em relação ao número de isolamentos positivos

no cérebro, sendo observada diferença no isolamento da articulação ($P=0.049$), sangue cardíaco ($P<0.01$), peritônio ($P=0.015$) e pleura ($P=0.03$).

Nos grupos NVIV e VIV, a contagem bacteriana média foi de $140,13\pm 71,8$ UFC/mL e $18\pm 39,2$ UFC/mL, respectivamente, sendo estatisticamente diferentes entre si ($P<0.01$).

O grupo não vacinado desafiado pela via intravenosa apresentou uma proporção de isolamento do agente na articulação, sangue cardíaco, peritônio, cérebro e pleura de 7/16 (43,75%), 7/16 (43,75%), 8/16 (50,00%), 7/16 (43,75%) e 5/16 (31,25%), respectivamente. No grupo vacinado obteve-se uma proporção de isolamento do agente na articulação e cérebro de 2/16 (12,5%) e 1/16 (6,25%), respectivamente, sendo que não se conseguiu o isolamento no peritônio, pleura e sangue cardíaco de nenhum dos animais.

ANDRESEN et al. (2001), trabalhando com imunidade passiva, encontraram no grupo controle, constituído por oito animais, sete (87,5%) com isolamento positivo na articulação e três (37,5%) no cérebro. Além disso, conseguiram isolar o *Streptococcus suis* do endocárdio e do pericárdio de dois animais.

O isolamento do agente no cérebro de cinco animais dos grupos NVIV e um do VIV foi um resultado não esperado, pois nenhum desses animais apresentaram sinais clínicos e lesões compatíveis com a meningite.

Os resultados do isolamento bacteriano dos grupos vacinado e não vacinado desafiados pela via intravenosa foram significativamente diferentes, o que não pôde ser observado em sinais clínicos e lesões, apesar dos resultados sempre mostrarem médias menores para o grupo vacinado (tabela 15).

Nos 32 animais desafiados pela via intraperitoneal, o *Streptococcus suis* foi isolado em 14/16 (87,5%) animais do grupo não vacinado em pelo menos um local onde se tentou o isolamento e de nenhum animal do grupo vacinado. Houve diferença significativa entre o grupo de animais vacinados e não vacinados ($P<0.01$) para todos os locais onde se tentou o isolamento. Nenhum dos animais vacinados,

desafiados pela via intraperitoneal, apresentou isolamento positivo, indicando, provavelmente, que a vacina proporcionou ao sistema imune condições favoráveis para eliminação completa do agente do organismo. Por isso, provavelmente, o grupo VIP apresentou redução significativa em sinais clínicos e lesões, caracterizando o efeito da vacina na proteção dos animais.

TABELA 15. Número de animais com isolamento positivo do *Streptococcus suis* no experimento II

Grupo	Articulação	Peritônio	Pleura	Cérebro	Sangue cardíaco
NVIP	7/16 ^b	8/16 ^b	5/16 ^b	7/16 ^b	7/16 ^b
VIP	0/16 ^a	0/16 ^a	0/16 ^a	0/16 ^a	0/16 ^a
NVIV	7/16 ^b	5/16 ^b	4/16 ^b	4/16 ^b	6/16 ^b
VIV	2/16 ^a	0/16 ^a	0/16 ^a	1/16 ^a	0/16 ^a

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna representa que foi encontrada diferença estatística significativa ($p < 0.05$) entre os grupos experimentais.

A contagem bacteriana média no grupo NVIV foi de 295,25±134,68 UFC/mL, enquanto que no grupo VIV apresentou média de 45±124 UFC/mL, sendo encontrada diferença significativa entre os grupos ($P < 0.01$). Em um animal do grupo VIV, que morreu com 36 horas pós-inoculação, foi obtido o isolamento do *Streptococcus suis* somente na articulação.

Em todos os cinco animais mortos no grupo NVIP foi possível realizar o isolamento do *Streptococcus suis* em pelo menos três locais diferentes, sendo que a média da contagem bacteriana nesses animais foi de 696,8±347,31 UFC/mL, enquanto que no grupo VIP não foi obtido isolamento positivo do agente.

O isolamento do *Streptococcus suis* do cérebro de sete animais do grupo não vacinado foi um resultado não esperado, pois apenas dois deles apresentaram congestão nas meninges, um apresentou pequena quantidade de depósito fibrinopurulento nas meninges e nenhum deles apresentou qualquer tipo de sinal nervoso.

WISSELINK et al. (2002), em experimento semelhante, no qual testaram três tipos de vacinas, observaram que os animais não vacinados apresentaram isolamento positivo do *Streptococcus suis* em todos os locais onde se detectou lesões macroscópicas. Entretanto, apenas três de sete animais vacinados que apresentaram lesões se conseguiu o isolamento do agente e em nenhum dos animais sem lesão obteve-se isolamento positivo. Esses resultados não estão de acordo com os achados no experimento II, onde mesmo animais sem lesões macroscópicas apresentaram isolamento positivo do *Streptococcus suis*. ANDRESEN et al. (2001) isolaram o *Streptococcus suis* no cérebro de três em oito animais desafiados, sendo que apenas um deles apresentou sinais nervosos e lesões compatíveis com meningite. Também não conseguiram isolar o agente em lesões nas articulações e em endocardite, atribuindo esse fato a essas lesões serem causadas por outros agentes e, mais possivelmente, devido a falha na tentativa de isolamento devido a um baixo número de bactérias viáveis nos sítios das lesões.

A meningite causada pelo *Streptococcus suis* é sempre precedida de fase de bacteremia, ocorrendo a penetração do agente via plexo coróide nas meninges (CHARLAND et al, 2000). Uma possível explicação para os isolamentos de *Streptococcus suis* no cérebro dos animais no experimento II é que o tempo de 144 horas não foi suficiente para causar os quadros de meningite. A bactéria estava presente no cérebro, entretanto não foi capaz de causar danos suficientes para a manifestação dos sinais nervosos ou das lesões. SANFORD (1987) descreve que o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica pode explicar em parte o edema cerebral, aumento da pressão intracraniana e bloqueio do fluxo de sangue para o cérebro, sempre observados em casos de meningite, o que pode causar danos aos neurônios e o aparecimento dos sinais nervosos. Provavelmente, devido aos animais serem mais velhos e conseqüentemente mais resistentes à doença, não foi proporcionado tempo hábil suficiente para causar um aumento da pressão intracraniana significativa para provocar os danos aos neurônios.

Os dados apresentados no isolamento do *Streptococcus suis* do grupo desafiado pela via intraperitoneal reforçam os resultados encontrados em sinais clínicos e lesões, nos quais também foi detectada diferença significativa entre os grupos vacinados e não vacinados. Desta forma, podemos concluir que a vacina produziu uma imunidade adequada nos animais vacinados e desafiados pela via intraperitoneal, pois apresentaram boa resistência ao desafio do *Streptococcus suis* sorotipo 2 de alta virulência.

Observando-se os resultados, os animais vacinados eliminaram o *Streptococcus suis* do organismo com maior eficiência do que os animais não vacinados. A vacina aumentou a resistência do organismo ao agente, mesmo com o desafio sendo feito pela via intravenosa. Apesar de não ter sido encontrada diferenças significativas para número de animais doentes, escores de sinais clínicos e de lesões, houve diferença no isolamento bacteriano, sugerindo que a vacina proporcionou certa imunidade ao animal. JACOBS et al. (1996), testando uma vacina contendo suilisina, observaram que nenhum dos animais vacinados apresentou isolamento positivo para o agente e concluíram que a vacina foi eficiente na proteção dos animais.

TABELA 16. Média da contagem bacteriana (UFC/mL) nos animais do experimento II

Grupo	Articulação	Peritônio	Pleura	Cérebro	Sangue cardíaco
NVIP	257±179 ^b	496±251 ^b	265±216 ^b	127±86 ^b	332±229 ^b
VIP	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
NVIV	264±198 ^b	138±135 ^b	85±84 ^b	107±109 ^b	106±115 ^b
VIV	88±130 ^a	0 ^a	0 ^a	2±3 ^a	0 ^a

^{ab} Letras diferentes nas colunas representa que foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os grupos experimentais.

4.5. Proteção

No experimento I, os animais foram desafiados 15 dias após a segunda dose da vacina, aos 60 dias de idade, por injeção intravenosa na

veia marginal da orelha com $8,6 \times 10^9$ UFC da amostra homóloga MV-789. Pode-se observar os resultados de proteção encontrados no experimento I na Tabela 17. Não houve diferença significativa ($P > 0.05$) entre o grupo vacinado e o não vacinado em relação ao número de mortes, sobreviventes sadios e sobreviventes doentes. A taxa de proteção calculada nesse experimento foi zero.

Analisando os resultados, pode-se supor que a proteção da vacina nessas condições experimentais não foi adequada. Um dos principais fatores que afeta a proteção pela vacina em condições experimentais é a forma de desafio utilizada (quase sempre intravenoso), o que não representa a forma natural de desafio da doença (AMASS et al., 1999; TORREMORELL et al., 1999; BERTHELOT-HÉRAULT et al., 2001). Portanto, foi realizado outro experimento no qual foi testada a via de desafio intraperitoneal.

Tabela 17: Número (%) de animais sobreviventes sadios, sobreviventes doentes e mortos / número total de animais em cada grupo no experimento I

Grupo	Sobreviventes sadios [*]	Sobreviventes doentes ^{**}	Mortos ^{***}
NV	1/32 (3%) ^a	22/32 (69%) ^a	9/32 (28%) ^a
V	3/32 (9%) ^a	19/32 (60%) ^a	10/32 (31%) ^a

^a Letras iguais nas colunas representa que não foi encontrada diferença estatística significativa ($p > 0.05$) entre os grupos experimentais.

^{*} Número (%) de animais que não apresentaram nenhum sinal clínico.

^{**} Número (%) de animais que apresentaram algum sinal clínico específico.

^{***} Número (%) de animais mortos.

No experimento II, os animais foram desafiados aos 88 dias de idade, 38 dias após terem recebido a segunda dose da vacina, sendo 32 pela via intravenosa e 32 pela via intraperitoneal. Os resultados de proteção encontrados no experimento II podem ser observados na Tabela 18 e Figura 4.

Tabela 18: Número (%) de animais sobreviventes sadios, sobreviventes doentes e mortos / número total de animais em cada grupo no experimento II

Grupo	Sobreviventes sadios [*]	Sobreviventes doentes ^{**}	Mortos ^{***}
NVIP	0/16 (0%) ^a	11/16 (68%) ^a	5/16 (32%) ^a
VIP	14/16 (88%) ^b	2/16 (12%) ^b	0/16 (0%) ^b
NVIV	1/16 (6%) ^a	15/16 (94%) ^a	0/16 (0%) ^a
VIV	1/16 (6%) ^a	14/16 (88%) ^a	1/16 (6%) ^a

^{ab} Letras diferentes nas colunas representa que foi encontrada diferença estatística significativa ($p < 0.05$) entre os grupos experimentais.

^{*} Número (%) de animais que não apresentaram nenhum sinal clínico.

^{**} Número (%) de animais que apresentaram algum sinal clínico específico.

^{***} Número (%) de animais mortos.

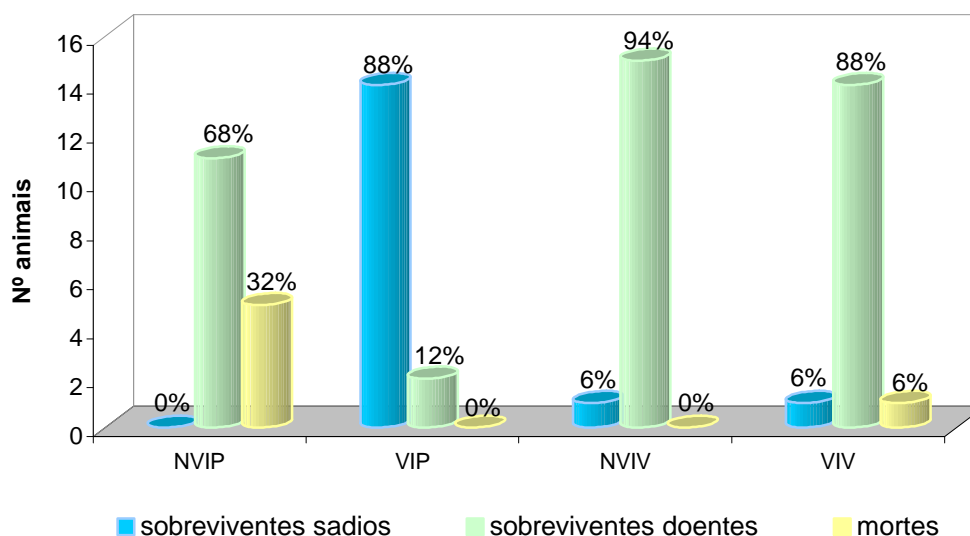


Figura 4: Número de animais mortos, sobreviventes sadios e sobreviventes doentes no experimento II

Não houve diferença estatisticamente significativa no número de mortes, sobreviventes sadios e sobreviventes doentes nos Grupos NVIV e VIV ($P > 0.05$), o que confirma o resultado apresentado pelo experimento I, no qual também não foi verificada diferença significativa entre o grupo vacinado e não vacinado.

Entretanto, os grupos dos animais vacinados e não vacinados desafiados pela via intraperitoneal, apresentaram diferença estatística significativa ($P < 0.01$) entre si em relação ao número de animais doentes e sadios. Também, o número de mortes foi significativamente maior ($P < 0.01$) no grupo não vacinado em relação ao grupo vacinado.

A análise dos resultados indica que a via de inoculação interfere na taxa de proteção da vacina. Os grupos de animais não vacinados desafiados pelas duas vias não apresentaram diferenças significativas ($P > 0.05$) em relação ao número de animais doentes e sadios, sendo que pode ser observada diferença significativa ($P < 0.05$) entre o número de mortes nos dois grupos. No grupo VIV o número de animais doentes foi superior ao número de doentes do grupo VIP ($P < 0.01$), podendo supor que a via intravenosa seria uma via mais “agressiva” do que a intraperitoneal.

Recentemente, alguns autores têm questionado a via intravenosa como método de desafio para teste de vacinas. O principal argumento desses autores é o fato dessa via não reproduzir a rota natural de infecção do agente e a inoculação de $10^6 - 10^9$ UFC/animal é provavelmente muito alta quando comparada com a infecção natural (AMASS et al., 1999; TORREMORELL et al., 1999; BERTHELOT-HÉRAULT et al., 2001; MADSEN et al., 2001a).

TORREMORELL e PIOJAN (1996) observaram aumento no nível de anticorpos e na imunidade celular dos animais vacinados pela via intraperitoneal. Relataram a possibilidade de maior resposta imune quando os animais são desafiados por essa via, em relação à via intravenosa. Entretanto, pouco se sabe sobre os antígenos imunogênicos do *Streptococcus suis*. Vacinas vivas avirulentas ou mortas virulentas de *Streptococcus suis* sorotipo 2 protegem os suínos somente contra desafios com amostras de sorotipos homólogos (HOLT et al., 1989 e 1990; BUSQUE et al., 1997; WISSELINK et al., 2002).

Os grupos desafiados pela via intraperitoneal apresentaram resultados que indicam a eficácia da vacina na proteção dos animais. Após 48 horas de inoculação, somente dois animais vacinados estavam doentes, sendo que os demais estavam aparentemente normais,

alimentando-se e bebendo água sem qualquer dificuldade, inclusive locomotor. No mesmo momento, no grupo não vacinado, todos os animais relutavam para levantar e não se alimentavam ou ingeriam água.

Os animais vacinados e desafiados pela via intravenosa apresentaram quadros clínicos semelhantes aos não vacinados. Os animais de ambos os grupos estavam apáticos e não conseguiam levantar para comer ou ingerir água.

Observando os resultados apresentados no experimento II (Tabela 18), pode-se concluir que a via de inoculação usada para o desafio interfere significativamente ($P < 0.01$) no efeito da proteção pela vacina. A via intravenosa como método de desafio para teste de vacinas, pode não reproduzir a rota natural de infecção do agente e a inoculação de 10^9 a 10^{10} UFC/animal é provavelmente muito alta quando comparada com a infecção natural (TORREMORELL et al., 1999). A campo, acredita-se que o desafio do agente não é tão alto e a inoculação do *Streptococcus suis* diretamente na corrente sanguínea do animal facilita a ação da bactéria, não proporcionando tempo hábil suficiente para uma resposta adequada do sistema imune contra a infecção. Portanto, mesmo os animais vacinados não conseguiriam boa proteção contra o desafio do agente quando desafiados pela via intravenosa.

A via aerógena, por ser a rota natural de infecção do agente a campo, poderia ser o método mais adequado a esse tipo de experimento. Entretanto, vários autores utilizaram a via aerógena como alternativa, mas só conseguiram reproduzir a doença em um pequeno número de animais desafiados, sendo que a maioria se tornava portador sadio do *Streptococcus suis* (TORREMORELL et al., 1999; BERTHELOT-HÉRAULT et al., 2001; MADSEN et al., 2001b). Em experimentos onde se deseja verificar a eficácia de uma vacina, essa via de desafio não é a mais indicada, pois seria necessário um grande número de animais para obter diferenças estatisticamente significativas, pois a maioria dos animais se tornaria portador sadio do agente, mesmo no grupo não vacinado.

TORREMORELL e PIJOAN (1999) sugerem a inoculação de amostras de *Streptococcus suis* em mucosas de leitões, simulando a rota de infecção natural do agente e uma possível melhora na resposta imune

por parte do hospedeiro, o que pode não ocorrer no desafio intravenoso. BLOUIN et al. (1994) conseguiram reproduzir a doença em camundongos utilizando a rota de inoculação intraperitoneal, conseguindo bons níveis de proteção nos animais desafiados. A escolha da via intraperitoneal se baseou na existência de poucos estudos sobre esta via como método alternativo de desafio para esse tipo de experimento. Além disso, essa seria uma das poucas vias alternativas citadas na literatura que apresentou resultados favoráveis.

No experimento II, a taxa de proteção da vacina nos animais desafiados pela via intraperitoneal, foi de 87,5 por cento, quando comparado o número de animais sadios e doentes. No entanto, a taxa de proteção da mesma vacina nos animais desafiados pela via intravenosa foi 0%. Os resultados de proteção no grupo vacinado desafiado pela via intravenosa foram influenciados pela via de desafio, pois quando utilizada a via de desafio intraperitoneal a proteção da vacina foi superior.

A taxa de proteção de 87,5% pode ser considerada alta para condições experimentais. Mesmo utilizando o desafio intraperitoneal, a quantidade de bactérias inoculadas no animal é muito alta, situação não esperada em condições naturais. Além disso, o animal sofre grande estresse quando é imobilizado para se fazer o desafio, o que pode contribuir para menor eficiência da resposta imune e menor proteção da vacina. O sistema imune do animal tem que ter altos títulos de anticorpos para conseguir combater a infecção causada por uma grande quantidade do *Streptococcus suis* no organismo. Por isso, à campo, pode-se esperar proteção maior do que a apresentada no experimento.

WISSELINK et al. (2002), em experimento semelhante, obtiveram taxa de proteção de 100%, 20% e 0%, utilizando bacterinas autógenas de *Streptococcus suis* sorotipo 2 em adjuvante oleoso, vacina de amostra não capsulada EF positiva e vacina viva com amostra mutante não capsulada, respectivamente. Entretanto, o experimento possuía número limitado de animais, sendo composto de apenas 5 animais por grupo experimental. BLOUIN et al. (1994) conseguiram proteção de 100% através de imunização passiva de camundongos com soro hiperimune obtido de suínos vacinados com bacterinas autógenas. Quando o soro

hiperimune era diluído para um título de 1:25600, a proteção obtida foi de 80%. Em experimento conduzido por JACOBS et al. (1996), foi obtida taxa de proteção de 79% e 29% utilizando-se vacinas purificadas de Suilisina e Fatores Extracelulares, respectivamente. Entretanto, utilizaram somente 3 animais em cada grupo experimental. AMASS et al. (1999) conseguiram 0% de proteção utilizando vacinas autógenas de amostras de *Streptococcus suis* sorotipo 2 de alta virulência aplicadas em dose única em leitões de 14 dias de idade.

Quando analisado o risco relativo nos grupos desafiados pela via intraperitoneal, foi verificado que os animais vacinados apresentavam uma probabilidade oito vezes menor de apresentar a doença do que os animais não vacinados. Espera-se que essa probabilidade aumente ainda mais quando a vacina for utilizada à campo.

A taxa de proteção da vacina e o risco relativo indicam que a vacina foi eficiente na proteção dos animais contra o desafio do *Streptococcus suis* sorotipo 2 de alta virulência, nas condições experimentais.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O *Streptococcus suis* é uma bactéria que tem causado grandes prejuízos à indústria de suínos no Brasil, particularmente nos últimos 10 anos. Os prejuízos causados anualmente são estimados em milhões de dólares com gastos em antibióticos, perdas de produtividade e morte de animais. O agente infecta suínos causando meningite, artrite, septicemia e pneumonia. Já foram identificados 35 sorotipos, do 1 ao 34 e o ½, sendo que o sorotipo 2 é o mais freqüentemente associado à doença no Brasil e no mundo. Até o momento, não se têm resultados satisfatórios no controle da doença nas granjas, pois as vacinas não têm proporcionado boa proteção. No controle da meningite tem sido priorizado o uso de antibióticos na ração ou água. Entretanto, os gastos com medicação são muito elevados, tem ocorrido um aumento na resistência do agente aos antimicrobianos nos últimos anos e os resíduos de antibióticos na carne são pouco aceitos, principalmente quando se visa exportação. O presente

trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar a eficácia de uma bacterina autógena na proteção de suínos desafiados com *Streptococcus suis* sorotipo 2 de alta virulência e também testar vias e doses de inoculação do agente. No experimento I, onde todos os animais foram desafiados pela via intravenosa, não foi possível detectar diferença significativa na proteção, sinais clínicos e lesões ($P>0.05$) entre os grupos não vacinado e vacinado. Só foi possível detectar diferença significativa no número de animais com isolamento positivo do *Streptococcus suis* e na média da contagem bacteriana ($P<0.01$). Os resultados observados no experimento II, nos grupos desafiados pela via intravenosa, foram muito semelhantes aos encontrados no experimento I. Os grupos vacinado e não vacinado desafiados pela via intravenosa apresentaram proteção, sinais clínicos e lesões similares ($P>0.05$), e o número de animais com isolamento positivo do *Streptococcus suis* e a média da contagem bacteriana foi mais elevada no grupo não vacinado ($P<0.01$). Os grupos vacinado e não vacinado desafiados pela via intraperitoneal apresentaram diferenças significativas ($P<0.01$) para todos os parâmetros analisados. O grupo NVIP apresentou 31% de mortos e 69% de sobreviventes doentes, enquanto que o grupo VIP teve 87% de sobreviventes sadios e 13% de sobreviventes doentes. A temperatura retal no grupo NVIP foi, em média, 0,5° C maior do que no grupo VIP ($P<0.01$). Nenhum dos animais do experimento II apresentou sinais nervosos e respiratórios. O escore médio dos sinais clínicos nos grupos não vacinado e vacinado foi de 0,79 e 0,17, respectivamente, sendo mais elevado no grupo não vacinado ($P<0.05$). O escore médio das lesões também foi mais elevado no grupo não vacinado (0,72) em relação ao grupo vacinado (0,21) ($P<0.05$). O isolamento do *Streptococcus suis* foi positivo em 56,25% e 0% nos animais não vacinados e vacinados, respectivamente. A média da contagem bacteriana no grupo não vacinado foi de 295,47 UFC/mL, sendo superior ($P<0.01$) a encontrada para o grupo vacinado, no qual não foi obtido isolamento positivo. A proteção da vacina para os animais desafiados pela via intraperitoneal foi calculada em 87,5%.

Portanto, com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que a via de desafio utilizada influencia nos sinais clínicos, lesões

e isolamento bacteriano dos animais vacinados e não vacinados. A via intravenosa não se mostrou adequada para esse tipo de experimento e a via intraperitoneal apresentou aspectos favoráveis. Quando o desafio é feito pela via intravenosa, provavelmente não existe tempo suficiente para o organismo desenvolver uma resposta imune adequada contra o agente, mesmo nos animais vacinados.

A vacina mostrou ser eficiente na prevenção da infecção pelo *Streptococcus suis* sorotipo 2 de alta virulência, protegendo os animais com uma eficiência estimada de 87,5%. Entretanto, mesmo utilizando a via de desafio intraperitoneal, a concentração de bactéria inoculada no animal é muito alta quando comparada a condições das granjas. Por isso espera-se que a vacina a campo seja mais eficiente do que em condições experimentais. Os animais vacinados apresentaram poucos sinais clínicos e lesões e o isolamento bacteriano foi negativo em todos eles. Desta forma, a vacina proporcionou uma imunidade adequada para que os animais pudessem responder favoravelmente à eliminação do agente do organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M., JORSAL, S.E., JENSEL, N.E., Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic sample in Denmark during 1995 and 1996. *Vet Microbiol.*, v. 60, n. 1, p. 59-66, 1998a.
- AARESTRUP, F. M.; RASMUSSEN, S. R.; ARTUSSON, K.; JENSEN, N. E. Trends in the resistance to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* isolates from Denmark and Sweden. *Vet Microbiol.*, v. 63, n. 1, p. 71-80, 1998b.
- ALEXANDER, T.J.L. *Streptococcus suis: an update. Proc. Pig Vet Soc.*, v. 21, p. 50-60, 1992.
- ANDRESEN, L.O., TEGTMEIER, C. Passive immunization of pigs against experimental infection with *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol.*, v. 81, n. 3, p. 331-344, 2001.
- AMASS, S., SANMIGUEL, P., CLARK, L.K., Demonstration of vertical transmission of *Streptococcus suis* in swine by genomic fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, n.6, p.1595-1596, 1997.
- AMASS, S., STEVENSON, G., KNOX, K., REED, A. Efficacy of an autogenous vaccine preventing streptococci in piglets. *Food Animal Practice*, v.17, p. 480-484, 1999.
- BARCELLOS, D.E.S.N., BOROWSKI, S.M., OLIVEIRA, S.J. Infecção de suínos pelo *Streptococcus suis* tipo II no Rio Grande do Sul: pesquisa de portadores pelo exame bacteriológico de amígdalas coletadas em frigoríficos. *Arq. Fac. Vet UFRGS*, v.23, n.1, p. 101-107, 1995.
- BARCELLOS, D.E.S.N., OLIVEIRA, S.J., BOROWSKI, S.M. Infecção de suínos pelo *Streptococcus suis* tipo II em Santa Catarina. *Rev. Bras. Med. Vet*, v.6, n.4, p. 128-129, 1984.
- BERTHELOT-HÉRAULT, F., GOTTSCHALK, M., LABBÉ, A., CARIOLET, R., KOBISCH, M. Experimental airborne transmission of *Streptococcus suis* capsular type 2 in pigs. *Vet Microbiol.*, v.82, n.1, p. 69-80, 2001.
- BLECHA, F., REDDY, D.N., CHITKO-MCKOW, C.G., MCVEY, D.S., CHENGAPPA, M.M., GOODBAND, R.D., NELSEN, J.L. Influence of recombinant bovine interleukin-1 beta and interleukin-2 in pigs

- vaccinated and challenged with *Streptococcus suis*. *Vet Immun. and Immunopathology*, v.44, n.3, p. 329-346, 1995.
- BLOUIN, C., HIGGINS, R., GOTTSCHALK, M., SIMARD, J. Evaluation of the antibody response in pigs vaccinated against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Vet Res.*, v. 58, n.1, p. 49-54, 1994.
- BOYLE, M., FEENESTRA, A.A., TEGMEIER, C., RASMUSSEN, S.R., BILLE-HANSEN, V. Detection of *Streptococcus suis* by in situ hybridization, indirect immunofluorescence, and peroxidase-antiperoxidase assays in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections from pigs. *J. Vet Diagn. Invest.*, v. 12, n. 3, p. 224-232, 2000.
- BUSQUE, P., HIGGINS, R., CAYA, F., QUESSY, S. Immunization of pigs against *Streptococcus suis* serotype 2 infections using a live avirulent strain. *Can J. Vet Res.*, v. 61, n. 4, p. 275-279, 1997.
- CHARLAND, N.; JACQUES, M.; LACOUTURE, S.; GOTTSCHALK, M. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and ½ . *Microbiol.*, v. 143, n. 11, p. 3607-3614, 1997.
- CHARLAND, N., KOBISCH, M., MARTINEAU-DOIZÉ, B., JACQUES, M., GOTTSCHALK, M. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.34, n.14, p.3607-3614, 1996.
- CHARLAND, N., NIZET, V., RUBENS, C.E., KIM, K.S., LACOUTURE, S., GOTTSCHALK, M. *Streptococcus suis* serotype 2 interaction with human brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, v.68, n.2, p.637-643, 2000.
- CHISTENSEN, P., KAHLMETER, G., JONSSON, S., KRONVALL, G. New method for the serological grouping of Streptococci with specific antibodies to protein A-containing Staphylococci. *Infection and Immunity*, v. 7, n. 6, p. 881-885, 1973.
- CLIFTON-HADLEY, F.A., ALEXANDER, T.J.L., ENRIGHT, M.R., GUISE, J. Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2 by sampling tonsils of slaughter pigs. *Vet Rec.*, v. 115, n.6, p. 562-564, 1984.

- DEE, S.A., CARLSON, A.R., WINKELMAN, N.L., COREY, M.M. Effects of management practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine. *J. Am. Vet Med. Assoc.*, v. 203, p. 295-299, 1993.
- DEL'ARCO, A.E. Caracterização de amostras de *Streptococcus suis* em suínos clinicamente doentes no Brasil. Tese mestrado: Universidade Federal de Viçosa, 71 p., 2001.
- ELLIOTT, S.D., TAI, J. The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *J. Exp. Med.*, v. 148, p.1699-1704, 1978.
- FARINHA, F.B., BERSANO, J.G., RODRIGUES, F.M., GENICOLO, L., REITER, S.C. Meningite em suínos causada pelo *Streptococcus suis* tipo. *R. Arq. Inst. Biol.*, v. 48, p. 91-95, 1981.
- GARCIA, R.G.F., SCHONHOFEN, C.A. Meningite em suínos por *Streptococcus suis* tipo II. *Rev. Set Cienc. Agr.*, v.10, n.1-2, p. 207-209, 1988.
- GIMENEZ, S.M., PEZERICO, S., LANGONI, H., CABRAL, K.G., CARREIRA, R.C. Pesquisa de suínos portadores de *Streptococcus suis*, na região sul de Botucatu-São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 8, 1997, Foz do Iguaçu. Anais...Foz do Iguaçu: ABRAVES, 1997, p. 235-236.
- GOTTSCHALK, M., HIGGINS, R., BOUDREAU, M., Use of polyvalent reagent for serotyping of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, n. 8, p. 2192-2194, 1993.
- GOTTSCHALK, M., HIGGINS, R., JACQUES, M., MITTAL, K.R., HENRICHSEN, J. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, n.12, p. 2633-2636, 1989.
- GOTTSCHALK, M., LEBRUN, A., JACQUES, M., HIGGINS, R. Hemagglutination properties of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* V. 28, n.8, p. 2156-2158, 1990.
- GOTTSCHALK, M., PETITIBOIS, S., HIGGINS, R., JACQUES, M. Adherence os *Streptococcus suis* capsular type 2 to porcine lung sections. *Can. Vet Res.*, v. 55, n. 3, p. 302-304, 1991.

- 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.
- GOTTSCHALK, M., LACOUTURE, S., DUBREUIL, D. Characterization of *Streptococcus suis* serotype 2 strains haemolysin. *Microbiol.*, v. 141, n. 1, p. 149-185, 1995.
- GUISE, H.J., PENNY, R.H.C., DUTHIE, A.N.S. Streptococcal meningitis in pigs: field trial to compare the effects of two different treatment. *Vet Rec.*, v. 117, n. 1, p. 65-66, 1985.
- HAATAJA, S., TIKKANEN, K., LIUKKONENE, J., FRANÇOIS-GERARD, C., FINNE, J. Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, n. 12, p. 2895-2900, 1993.
- HEARD, T. *Streptococcus suis* type 2 in British pig herds. In: E. Boden (ed.), Swine practice, Baillière Tindall, London, p. 105-114, 1991.
- HEATH, P.J., HUNT, B.W., DURFF, J.P., WILKINSON, J.D. *Streptococcus suis* serotypes 14 as a cause of pig disease in the UK. *Vet Rec.*, v. 139, n. 3, p. 450-451, 1996.
- HIGGINS, R., GOTTSCHALK, M. Streptococcal diseases. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 563-570, 1999.
- HOLT, M.E., ENRIGHT, M.R., ALEXANDER, T.J.L. Immunization of pigs with killed cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res. Vet Sci.*, v. 45, n. 3, p. 345-352, 1990.
- HOLT, M.E., ENRIGHT, M.R., ALEXANDER, T.J.L. Studies of the protective effects of different fractions of sera from pigs immune to *Streptococcus suis* type 2 infection. *J. Comparative Pathology*, v. 100, n. 4, p. 435-442, 1989.
- JACOBS A.A.C., LOEFFEN, P.L.W., VAN DEN BERG, A.J.G., STORM, P. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 12, p. 1742-1748, 1994.
- JACOBS, A.A.C., VAN DEN BERG, A.J.G., BAARS, J.C., LOEFFEN, P.L.W., Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-

- activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *Vet Rec.*, v. 7, n. 139, p. 225-288, 1996.
- JAUQUES M., GOTTSCHALK, M., FOIRI, B., HIGGINS, R. Ultrastructural study on surface components of *Streptococcus suis*. *J. Bacteriol.*, v. 172, p. 2833-2838, 1990.
- KATAOCA, Y., HARITANI, M., MORI, M., KISHIMA, M., SUGIMOTO, C., NAKAZAWA, M., YAMAMOTO, K. Experimental infections of mice with *Streptococcus suis* type 2. *J. Vet Med. Sci.*, v. 53, n. 6, p. 1043-1049, 1991.
- KATAOCA, Y., SUGIMOTO, C., NAKAZAWA, M., MOROZUNI, T., KASHIWAZAKI, M. The epidemiological studies of *Streptococcus suis* infections in Japan from 1987 to 1991. *J. Vet Med. Sci.*, v. 55, n. 4, p. 457-459, 1993.
- KATAOCA, Y., YAMASHITA, T., SUNAGA, S., IMADA, Y., ISHIKAWA, H., KISHIMA, M., NAKAZAWA, M. An Enzyme-Like Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of antibody against *Streptococcus suis* type 2 in infected pigs. *J. Vet Med. Sci.*, v. 58, n. 4, p. 369-372, 1996.
- KILPPER-BALZ, R., and SCHLEIFER, K.H. *Streptococcus suis* sp nov.; nom. *Rev. Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 37, p. 1640-1641, 1987.
- LAMONT, M.H., EDWARDS, P.T., WINDSOR, R.S., Streptococcal meningitis in pigs: results of a five-years survey. *Vet Rec.*, v. 107, n. 4, p. 467-469, 1980.
- LUQUE, I.; TARRADAS, C.; ARENAS, A.; MALDONADO, A.; ASTORGA, R.; PEREA, A. *Streptococcus suis* serotypes associated with different disease conditions in pigs. *Vet Rec.*, v. 27, n. 142, p. 726-727, 1998.
- MACLENNAN, M., FOSTER, G., DICK, K., SMITH, W., NIELSEN, B. *Streptococcus suis* serotypes 7, 8 and 14 from diseased pigs in Scotland. *Vet Rec.*, v. 26, n. 139, p. 423-424, 1996.
- MADSEN, L.W., AALBAEK, B., NIELSEN, O.L., JENSEN, H.E. Aerogenous infection of microbiologically defined minipigs with *Streptococcus suis* serotype 2. *APMIS*, v. 109, p. 412-418, 2001a.
- MADSEN, L.W., NIELSEN, B., AALBAEK, B., JENSEN, H.E., NIELSEN, J.P., RIISING, H.J. Experimental infection of Conventional pigs with

- Streptococcus suis* serotype 2 by Aerosolic exposure. *Acta. Vet Scand.*, v. 42, p. 303-306, 2001b.
- MUIRHEAD, M.R., ALEXANDER, T.J.L., Managing pig health and the treatment of disease. United Kingdom: 5M Enterprises Ltd., 608pp, 1997.
- PAYVANDI, F., SRIKUMARAN, S., SHIELDS, T.R., ERICKSON, E.D. Monoclonal antibodies for coagulation of *Streptococcus suis* type 1. *Vet Microb.*, v. 20, n. 3, p. 349-356, 1989.
- QUESSY, S., DUBREUIL, D., A., HIGGINS, R., MALOUIN, F., JACQUES, M. Increase of capsular material thickness following *in vivo* growth of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains. *FEMS Microbial. Lett.*, v. 115, n. 1, p. 19-26, 1994a.
- QUESSY, S., DUBREUIL, D., CAYA, M., LÉTOURNEAU, R., HIGGINS, R. Comparison of pigs, rabbits and mouse IgG response to *Streptococcus suis* serotype 2 proteins and active immunization of mice against the infections. *Can. J. Vet Res.*, v. 58, n. 2, p. 220-223, 1994b.
- QUESSY, S., DUBREUIL, D., M., HIGGINS, R. Immunization of mice against *Streptococcus suis* serotype 2 infections using a live avirulent strain. *Can. J. Vet Res.*, v. 58, n. 3, p. 299-301, 1994c.
- REAMS, R.Y., GLICKMAM, L.T., HARRINGTON, D.D., BOWERSOCK, T.L., THACKER, H.L., *Streptococcus suis* infections in swine: a retrospective study of 256 cases. Part I: Epidemiologic factors and antibiotic susceptibility patterns. *J Vet Diag. Invest.*, v.6, n. 3, p. 326-334, 1993.
- REAMS, R.Y., HARRINGTON, D.D., GLICKMAN, L.T., THACKER, H.L., BOWERSOCK, T.L. Fibrinohemorrhagic pneumonia in pigs naturally infected with *Streptococcus suis*. *J. Vet Diag. Invest.*, v. 7, n. 4, p. 406-408, 1995.
- REAMS, R.Y., HARRINGTON, D.D., GLICKMAN, L.T., THACKER, H.L., TERRY, L.B. Multiple serotypes of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. *J. Vet Diag. Invest.*, v.8, n.1, p. 119-121, 1996.
- REIS, R., NASCIMENTO, E.F., COELHO, A.M.B., LEITE, R.C., NOGUEIRA, R.H.G. Doença de suínos no estado de Minas Gerais. V.

- Meningite estreptocócica em leitões desmamados. *Arq. Esc. Vet UFMG*, v.32, n.3, p. 375-381, 1980.
- ROBERTSON, I.D., BLACKMORE, D.K., The detection of pigs carrying *Streptococcus suis* type 2. *Epidemiol. Infect.*, v. 35, n. 1, p. 1-4, 1987.
- SANFORD, S.E., HIGGINS, R. Streptococcal disease. In: L, A.D.; STRAW, B.E., MENGELING, W.L., D'ALLAIRE, S., TAYLOR, D.J. Disease of swine. Iowa State Press, Ames, Iowa, p. 588-590, 1999.
- SANFORD, S.E. *Streptococcus suis*: a strategic update. In: *Proceedings of the annual meeting of the American association of swine practitioners. Des Moines*, p. 193-195, 1989.
- SANFORD, S.E. Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs II – Central nervous system lesions. *Can. J. Vet Res.*, v. 51, n. 4, p. 486-489, 1987.
- SANFORD, S.E., ROSENDAL, S. *Streptococcus suis* type II. Is this a respiratory pathogen of swine? In: *Proceedings of the annual meeting of the American association of swine practitioners. Des Moines*, p. 112-115, 1984.
- SANFORD, S.E., ROSS, R.F. Streptococcal diseases. In: A.D. Leaman, B. Straw, R.D. Glock, W.L. Mengeling, R.H.C. Penny and Scholl (eds), Disease of swine, 6 th ed., Iowa State university Press, p. 607-610, 1986.
- SANTOS, J.L., DEL'ARCO, A.E., RIBEIRO, M.C.E., GUIMARÃES, W. Distribuição de sorotipos de *Streptococcus suis* em suínos clinicamente doentes no Brasil. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 26, 1999, Belo Horizonte, Anais... Minas Gerais, p. 239-240, 1999.
- SANTOS, J. L.; DEL'ARCO, A. E.; RIBEIRO, M. C. E.; GUIMARÃES, W. Occurrence of *Streptococcus suis* serotypes in pigs in Brazil. In: THE 16TH INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 17, 2000, Melbourne. *Proceedings...* Austrália, p. 536, 2000.
- SEPÚLVEDA, E.M., ALTMAN, E., KOBISCH, M., D'ALLAIRE, S., GOTTSCHALK, M. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-base indirect ELISA. *Vet Microb.*, v. 52, n. 1-2, p. 113-125, 1996.

- SIMONSON, R., CARLSON, M., FREESE, W., and ABRAHAM. A. *Streptococcus suis* immunology: stimulation of immunity using a commercial bacterin (Strep Bac). In: *Proceeding of the Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners, Des Moines*, 83-85, 1989.
- SMITH, H.E., WISSELINK, H.J., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N., VECHT, U, SMITS, M.M. Virulence markers of *Streptococcus suis* type 1 and 2. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 418, p. 651-655, 1997.
- STAATS, J.J., FEDER, I., OKWUMABUA, O., CHENGAPPA, M.M. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res. Comm.*, v.21, n. 6, p.381-387, 1997.
- TORREMORELL, M. and PIJOAN, C. Intraperitoneal vaccination against *Streptococcus suis* serotype 2 with an autogenous vaccine. In: THE 14TH INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15, 1996, Bologna. *Proceedings...*, Italy, p.425, 1996.
- TORREMORELL, M., PIJOAN, C., DEE, S. Experimental exposure of young pigs using a pathogenic strain of *Streptococcus suis* serotype 2 and evaluation of this method for disease prevention. *Can. J. Vet Res.*, v. 63, n. 2, p. 269-275, 1999.
- VECHT, U., WISSELINK, H.J., REEK, F.H., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N., SMITH, H.E. Diagnosis of several capsular serotypes of *Streptococcus suis* by phenotype and PCR and the relation with virulence for pigs. *Proc. Int. Pig Vet*, v.14, n. 1-2, p.298, 1996.
- VETCH, U., ARENDS, J.P., VAN DER MOLEN, F.J., VAN LEENGOED, L.A.M.G. Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after experimentally induced infections of newborn germ free pigs. *Am. J. Vet Res.*, v. 50, n. 9, p. 1037-1043, 1989.
- VECHT, U., WISSELINK, H.J., SMITH, H.E. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infect. Immun.*, v. 60, n. 4, p. 550-556, 1992.

- WASTENSON, Y., HOIE, S., ROBERTS, M.C. Characterization of antibiotics resistance in *Streptococcus suis*. *Vet Microb.*, v. 41, n. 1, p. 41-49, 1994.
- WILLIAMS, A.E., BLAKMORE, W. E. Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *J. Infec. Dis.*, v. 162, n. 4, p. 474-481, 1990.
- WILLIAMS, A.E. Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Microbiol. Pathogen*, v.8, n.7, p. 762-764, 1990.
- WINDSOR, R.S., ELLIOTT, S.D. Streptococcal infections in young pigs. IV. An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs. *Journal of Hygiene*, v.75, p. 69-78, 1975.
- WINDSOR, R.S. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis* type II. *Vet Rec.*, v. 101, n. 3, p.378-379, 1977.
- WISSELINK, H.J., REEK, F.H., VECHT, U., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N., SMITH, H.E. Detection of virulent strains of *Streptococcus suis* type 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* type 1 in tonsillar specimens of pigs by PCR. *Vet Microbiol.*, v. 67, n. 2, p. 143-157, 1999.
- WISSELINK, H. J.; SMITH, H. E.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; PEPPERKAMP, K.; VECHT, U. Distribution of capsular types and production of muramidase released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet Microbiol.*, v. 74, n. 3, p. 237-248, 2000.
- WISSELINK, H.J., VECHT, U., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N., SMITH, H.E. Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* type 2 strains by a muraminidase-released protein and extracellular factor vaccine. *Vet Rec.*, v. 148, n. 4, p. 473-477, 2001.
- WISSELINK, H. J., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; PEPPERKAMP, K., HILGERS, L.A.T., , SMITH, H. E. Assessment of protection efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol.*, v. 84, n. 2, p. 155-168, 2002.

ZANUZZO, A.J., e AVILA, L.A.F. Encefalite suína. Nota técnica. Concórdia. Sadia Concórdia S/A. Industria e Comércio. Área de produção Agropecuária. Setor Veterinário, 1979.