

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Diversidade genética e proteica de *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolados de equídeos

Anais de Castro Benitez
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

ANAIS DE CASTRO BENITEZ

Diversidade genética e proteica de *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolados de equídeos

Dissertação 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*.

Orientadora: Raffaella B. C. T. Santos

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

B467d
2025 Benitez, Anaïs de Castro, 1997-
Diversidade genética e proteica de *Streptococcus equi*
subsp. *equi* isolados de equídeos / Anaïs de Castro Benitez. –
Viçosa, MG, 2025.

1 dissertação eletrônica (51 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Raffaella Bertoni Cavalcanti Teixeira Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Medicina Veterinária, 2025.

Referências bibliográficas: f. 45-51.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.486>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Adenite equina. 2. Cavalos - Doenças - Aspectos genéticos. 3. Genoma. 4. Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz. 5. Proteoma. 6. *Streptococcus zooepidemicus*. I. Santos, Raffaella Bertoni Cavalcanti Teixeira, 1982-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.108962

ANAIS DE CASTRO BENITEZ

Diversidade genética e proteica de *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolados de equídeos

Dissertação 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*.

APROVADA: 19 de maio de 2025.

Assentimento:

Anais de Castro Benitez
Autora

Raffaella Bertoni Cavalcanti Teixeira Santos
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 06/08/2025 às 10:22:19 e pela orientadora em 07/08/2025 às 10:59:39. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **V4Q6.CO1J.A2WW** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Raffaella Bertoni, por sua orientação dedicada, paciência e incentivo ao longo de todo este processo de orientação que já completa seis anos. Sua confiança no meu trabalho foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Obrigada por ser este exemplo de profissional e pessoa. O crescimento se torna mais fácil quando podemos mirar em exemplos tão elevados.

Ao meu noivo, Carlos Henrique, por ser meu porto seguro em todos os momentos. Obrigada por estar ao meu lado com amor, compreensão e apoio incondicional. Agradeço também por sua paciência constante e por saber me compreender até nos momentos em que nem eu mesma consigo. Sua sensibilidade em perceber meus limites e sua presença firme nas horas difíceis foram essenciais para que eu me mantivesse equilibrada ao longo desta jornada. Sem você o caminho seria muito mais árduo.

Às minhas queridas amigas de hospital, Vanessa, Vívian e Duda, por dividirem comigo os desafios e alegrias da rotina intensa, e por tornarem os dias mais leves com companheirismo e bom humor. É muito bom poder compartilhar todas essas fases com vocês.

A Victória, minha eterna amiga de infância que compartilhou comigo o sonho de sermos veterinárias. Cá estamos nós realizando essa vitória juntas. Queria que aquelas meninas de tantos anos atrás pudessem nos ver hoje. Agradeço pelas dicas e incentivos, tenho muita sorte por ter você no meu caminho!

A Giulia, pela parceria, incentivo e amizade construída ao longo da residência e pós-graduação. Você me inspira a ser mais além do meio acadêmico. É fundamental manter o equilíbrio para podermos dar o nosso melhor.

Aos meus pais, Viviane e Vinícius, que foram meus maiores exemplos de dedicação à vida acadêmica. Obrigada por me inspirarem a seguir esse caminho e por todo amor, suporte e sabedoria compartilhados.

À Ana Júlia, obrigada por todo o auxílio no laboratório de bacteriologia, ao curso de MIC e todas as outras técnicas, você se tornou uma grande amiga! Obrigada também à professora Cida e ao pessoal do laboratório de

bacteriologia da UFV que se disponibilizou a ajudar em vários momentos.

À MicroVet, pela disponibilidade das amostras, insumos e laboratórios para confecção dos testes diagnósticos. Geisa, Gabi e equipe da bacteriologia, muito obrigada pela paciência, ensinamentos e auxílio em grande parte dos testes, vocês me ensinaram muito sobre habilidades laboratoriais. Dr. Lucas dos Santos pela idealização da pesquisa, disponibilidade e auxílio com conceitos e também pelo entusiasmo com o projeto.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa que viabilizou a realização desta pesquisa e ao professor Nero e ao CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo subsídio para o sequenciamento Sanger e materiais de laboratório. A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

BENITEZ, Anais de Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2025. **Diversidade genética e proteica de *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolados de equídeos**. Orientadora: Raffaella Bertoni Cavalcanti Teixeira Santos.

A adenite equina é uma doença de importância econômica e social para a equideocultura no mundo inteiro e há séculos pesquisas são realizadas para melhor compreensão de seu agente etiológico e recomendações de manejo preventivo na medicina veterinária. O patógeno causador é *Streptococcus equi* subsp. *equi*, microrganismo com ampla variedade genética e que, através de mecanismos adaptativos, possui forte adaptação ao organismo do hospedeiro equino, possibilitando sua ampla disseminação pela presença de animais subclínicos em plantéis. Embora essa bactéria seja comumente encontrada na prática de medicina veterinária em Minas Gerais, até 2024 não há estudos publicados sobre a epidemiologia da doença ou sobre a diversidade genética do agente etiológico no estado, que abriga o maior rebanho de equídeos do Brasil. Objetivou-se com o presente estudo identificar a diversidade genética dos isolados de *S. equi* provenientes de amostras de Minas Gerais e compará-la com dados de isolados previamente publicados no Brasil e outros países; avaliar a eficácia da técnica de MALDI-TOF para a identificação de subespécies de *Streptococcus*; e analisar o perfil de resistência da bactéria aos principais antibacterianos utilizados na medicina equina. Para isso, foram realizadas análises bioquímicas de 32 isolados de animais com suspeita de adenite equina, seguidas de PCR e sequenciamento genético da proteína SeM, análise por MALDI-TOF e antibiograma. O sequenciamento genético revelou que o gene da proteína SeM das amostras analisadas apresentou maior similaridade com isolados de outros países do que com aqueles previamente descritos no Brasil, em outras regiões. Foram identificados apenas dois alelos do gene da SeM entre os isolados avaliados, o que sugere uma relativa homogeneidade desse gene nos isolados de *Streptococcus equi* provenientes da região estudada. O MALDI-TOF é uma técnica eficiente para a diferenciação correta e rápida das subespécies de *Streptococcus*. Os isolados avaliados foram sensíveis aos principais antibacterianos utilizados na medicina equina, mas alguns se apresentaram resistentes à enrofloxacin. Para uma melhor compreensão da diversidade genética dos isolados de *S. equi* em Minas Gerais, são necessários estudos com um número maior de isolados, além da análise do genoma bacteriano completo.

Palavras-chave: Adenite; cavalo; Garrotilho; genoma; MALDI TOF; proteoma; resistência; *Streptococcus zooepidemicus*

ABSTRACT

BENITEZ, Anais de Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2025. **Genetic and protein diversity of *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from equids**. Adviser: Raffaella Berton Cavalcanti Teixeira Santos.

Equine strangles is a disease of significant economic and social importance to the equine industry worldwide. For centuries, research has been conducted to better understand its etiological agent and to establish preventive management strategies in veterinary medicine. The causative pathogen, *Streptococcus equi* subsp. *equi*, displays substantial genetic diversity and, through adaptive mechanisms, is highly suited to the equine host, enabling widespread dissemination via subclinical carriers within herds. Although this bacterium is frequently encountered in veterinary practice in Minas Gerais, as of 2024, no published studies have addressed the epidemiology of the disease or the genetic diversity of its etiological agent in the state, which has the largest equid herd in Brazil. The aim of this study was to identify the genetic diversity of *S. equi* isolates obtained from samples collected in Minas Gerais and to compare them with previously published isolates from Brazil and other countries; to evaluate the effectiveness of the MALDI-TOF technique for the identification of *Streptococcus* subspecies; and to analyze the antimicrobial resistance profile of the bacterium against commonly used drugs in equine medicine. Biochemical analyses were conducted on 32 isolates from animals suspected of having equine strangles, followed by PCR and genetic sequencing of the SeM protein, MALDI-TOF analysis, and antimicrobial susceptibility testing. Genetic sequencing revealed greater similarity of the SeM protein gene with isolates from other countries than with Brazilian isolates from other regions. Only two SeM gene alleles were identified, suggesting homogeneity of this gene among the *S. equi* isolates from the sampled region. MALDI-TOF proved to be an efficient method for accurate and rapid differentiation of *Streptococcus* subspecies. The evaluated isolates were sensitive to the main antimicrobials used in equine medicine, but some showed resistance to enrofloxacin. The study results highlighted the importance of a deeper understanding of the genetic diversity and epidemiology of *Streptococcus equi* isolates in Minas Gerais for equine medicine.

Keywords: Adenitis; horse; Strangles; genome; MALDI-TOF; proteome;

resistance; *Streptococcus zooepidemicus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Adenite equina.....	12
2.2 Streptococcus equi subsp. equi.....	14
2.3 Métodos de identificação de Streptococcus equi subsp. equi.....	16
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo geral.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1 Amostras utilizadas.....	18
5.1 Análise bioquímica dos isolados.....	19
5.2 Análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	19
5.3 Análise através de MALDI TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight).....	19
5.6 Análise do sequenciamento genético dos isolados.....	21
5.5 Avaliação do perfil de sensibilidade a antibacterianos.....	22
6. RESULTADOS.....	22
6.1 Análise bioquímica e por PCR.....	22
6.2 Avaliação descritiva das amostras e distribuição geográfica.....	22
6.3 Análise MALDI TOF.....	25
6.4 Análise do Sequenciamento Sanger.....	29
6.5 Perfil de sensibilidade a antibacterianos.....	37
7. DISCUSSÃO.....	37
8. CONCLUSÃO.....	44
9. DIREÇÕES FUTURAS.....	45
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
11. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	51

1. INTRODUÇÃO

O microrganismo *Streptococcus equi* subsp. *equi* (*S. equi*) é uma bactéria com reconhecido potencial patogênico em equídeos, sendo o agente etiológico da doença conhecida como adenite equina. A enfermidade afeta principalmente as vias aéreas anteriores, causando febre, faringite e abscedação dos linfonodos submandibulares e retrofaríngeos (BOYLE et al, 2018). A adenite caracteriza-se por elevada morbidade e baixa mortalidade. Hospedeiros que se recuperaram da apresentação clínica da doença e que passam a ter a bactéria colonizando suas vias aéreas anteriores de forma subclínica, comumente chamados de portadores assintomáticos, são essenciais na manutenção do *S. equi* em plantéis de criação de forma silenciosa, muitas vezes levando a surtos de origem desconhecida (NEWTON et al, 1997; BOYLE et al, 2018; JARAMILLO-MORALLES et al, 2022). Apesar de não causar a morte dos equinos com frequência, é uma doença que leva a significativas perdas econômicas para a equideocultura devido à queda de performance dos animais, custo de medicamentos, tratamentos veterinários e com a vacinação do rebanho. Considerando sua ampla distribuição mundial, a adenite equina é considerada uma das doenças de maior impacto para a equideocultura globalmente (WALLER, 2014; CHHABRA et al, 2023), afetando animais de trabalho, cavalos atletas, reprodutores, cavalos usados para lazer e potros.

Um aspecto relevante a ser considerado é a variabilidade genética dessa bactéria, que resulta em ampla diversidade de fatores de virulência envolvidos nos mecanismos de invasão no hospedeiro. Diversos isolados de *S. equi* já foram identificados e descritos em vários países e continentes (HARRIGTON et al, 2002; KELLY et al, 2006; LIBARDONI et al, 2013; JAVED et al, 2016; MORRIS et al, 2020; MITCHELL et al, 2021). A análise da proximidade genética entre diferentes isolados bacterianos pode ser usada para traçar a origem geográfica de surtos, bem como monitorar sua disseminação (MITCHELL et al, 2021). Além disso, é possível a ocorrência de múltiplos isolados em um mesmo surto, o que pode influenciar na apresentação clínica da doença. Em alguns trabalhos, essa ferramenta foi empregada para determinar se a apresentação clínica da doença foi causada pelo isolado bacteriano usado na produção da vacina viva atenuada (KELLY et al, 2006). O reconhecimento genético dos isolados também tem importância fundamentada na necessidade de identificação de fatores de virulência candidatos para a produção de vacinas (LEE et al, 2021).

A apresentação clínica da adenite equina é objeto de amplas discussões quanto à conduta terapêutica, sendo, na maioria dos casos, contraindicado o uso de antibacterianos, devido à natureza autolimitante da enfermidade e potencial de interferência no desenvolvimento da resposta imune do paciente a infecções subsequentes (RAMEY, 2007; BOYLE et al., 2018).

Nos quadros em que há o desenvolvimento de complicações, se torna necessário o uso de antibacterianos. Estudos focados em bactérias que afetam o trato respiratório têm demonstrado uma resistência significativa de *Streptococcus equi* à penicilina, que é o antibacteriano de primeira escolha no tratamento da adenite equina (FONSECA et al, 2020). Tal cenário ressalta a necessidade de vigilância constante sobre os padrões de susceptibilidade antibacteriana, uma vez que falhas terapêuticas podem impactar negativamente o prognóstico clínico e favorecer a disseminação de isolados resistentes nos plantéis.

Na América do Sul existem trabalhos que descrevem a epidemiologia e genética do *S. equi* no estado do Rio Grande do Sul no Brasil (LIBARDONI et al, 2013; LIBARDONI et al, 2016), uma pesquisa sobre a prevalência do *S. equi* em animais assintomáticos e o perfil de resistência a antibacterianos na Colômbia (JARAMILLO-MORALLES et al, 2022), e um trabalho que inclui o sequenciamento genético de isolados de *S. equi* da Argentina (MITCHELL et al, 2021). Apesar dessas contribuições, os dados disponíveis ainda são limitados, sendo necessários mais estudos abrangentes em toda a América do Sul, inclusive em outras regiões do Brasil. Ressalta-se, especialmente, a falta de estudos no estado de Minas Gerais, que é o maior produtor de equídeos do país (IBGE, 2023), com um rebanho de mais de 800 mil animais, entre cavalos, muares e asininos. O estado também é origem de raças brasileiras importantes, como o Mangalarga Marchador, que tem grande valor econômico e cultural. Nesse contexto, a obtenção de dados sobre *Streptococcus equi* é estratégica para o controle da enfermidade, sobretudo diante do déficit de pesquisas voltadas para essa população equina e os patógenos que a acometem. A caracterização da diversidade genética do agente é fundamental para elucidar aspectos epidemiológicos, rastrear a origem de surtos, identificar isolados em portadores assintomáticos e subsidiar o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Adenite equina

A adenite equina, também conhecida como garrotilho (denominada “strangles” em inglês e “adenitis equina” em espanhol) já vem sendo relatada em equídeos desde o século XIII d.C (RUFUS, 1256) com descrições detalhadas de sua manifestação clínica em textos antigos da veterinária que a julgavam uma doença inevitável (SOLLEYSEL, 1664). Seu agente etiológico foi identificado pela primeira vez, em 1888, como sendo a bactéria *S. equi* (SHUTZ, 1888). Apesar de sua ampla repercussão global, a doença ainda apresenta altas taxas de prevalência em todos os continentes. A única população equina livre da enfermidade é a da Islândia, em função de seu isolamento geográfico (WALLER, 2014; BOYLE et al, 2018). No Brasil, os únicos estudos epidemiológicos sobre adenite equina, publicados até o ano de 2024, foram realizados no Rio Grande do Sul, apresentando distribuição de portadores assintomáticos por todo o território do estado (LIBARDONI et al, 2013; LIBARDONI et al, 2016). Dentre os fatores de risco associados à contaminação pela bactéria, há a participação em eventos com aglomerações de equinos, comedouros compartilhados, casos positivos na propriedade, idade mais jovem dos animais e histórico de deslocamento (LIBARDONI et al, 2016; JARAMILLO-MORALLES et al, 2022).

Os animais sintomáticos desenvolvem febre, faringite, secreção nasal inicialmente serosa, que posteriormente se torna mucopurulenta, e linfadenopatia dos linfonodos da cabeça, podendo ocorrer abscedação com liberação de secreção contendo alta carga bacteriana após aproximadamente uma semana do início da doença, favorecendo a ocorrência de surtos no plantel (BOYLE, 2023). Essa apresentação clínica manifesta-se devido à propagação da bactéria *S. equi* que se infiltra comumente por via nasofaríngea e alcança rapidamente os linfonodos regionais, se proliferando e levando a um infiltrado massivo de leucócitos polimorfonucleados nos linfonodos acometidos (HARRINGTON et al, 2002). Os sinais clínicos da doença podem ser brandos, porém levam a queda de performance e impossibilidade de realização de exercício físico ou trabalho. Normalmente, o curso da doença é autolimitado, e o animal pode se recuperar completamente ou tornar-se um portador

assintomático, quando não há mais sinais clínicos de infecção, embora o patógeno permaneça no organismo em atividade metabólica basal, podendo ser transmitido a outros animais. (HARRIS et al, 2015). Com menor frequência, a doença pode se desenvolver para complicações secundárias que, diferentemente da doença inicial, estão associadas a taxas de mortalidade mais elevadas (BOYLE, 2018). Entre essas complicações, há o garrotilho metastático, caracterizado por abscedação em diversos órgãos e tecidos do hospedeiro; a púrpura hemorrágica, uma vasculite necrosante imunomediada; e o empiema de bolsa gutural, que ocorre quando há acúmulo de secreção purulenta no interior da bolsa gutural, geralmente causado pela fistulação de linfonodos retrofaríngeos, podendo haver formação de condroides na cavidade (BOYLE, 2017).

O tratamento de casos clínicos de adenite com antibacterianos é ainda discutido, considerando que poderia retardar a maturação de abscessos e impedir a formação de memória imunológica e produção de anticorpos contra futuras infecções pela bactéria (RAMEY, 2007). As indicações para a antibioticoterapia, de acordo com o Consenso de 2018 sobre adenite equina do Colégio Norte Americano de Medicina Interna Veterinária, devem ser baseadas nas seguintes condições: animais com febre muito alta, linfadenopatia grave com consequente dificuldade respiratória, abscessos metastáticos, casos de púrpura hemorrágica tratados com corticosteróides e infecções de bolsa gutural, que devem ser tratadas de forma local e sistêmica.

Mundialmente existem iniciativas particulares de vigilância para doenças respiratórias de equinos e até mesmo específicas para a adenite equina. Dentre elas há o “Surveillance of Equine Strangles” (SES), criado pelo “Royal Veterinary College” na Grã-Bretanha, e o “International Collating Centre” (ICC), que recebe informações de diversos territórios sobre surtos de doenças infecciosas em equinos. No ano de 2023, o ICC reportou 365 surtos de adenite equina ao redor do globo, porém, nenhuma das notificações foi de origem Brasileira (INTERNATIONAL COLLATING CENTRE, 2024). No Brasil, os casos confirmados de adenite equina são de notificação obrigatória ao Serviço Veterinário Oficial e devem ser reportados mensalmente, conforme estabelecido pela Instrução Normativa nº 50/2013 (BRASIL, 2013). No entanto, considerando-se que diversos animais com sintomatologia clínica no país são tratados de forma empírica e sem a realização de testes diagnósticos, a real

prevalência da enfermidade no Brasil, bem como no estado de Minas Gerais, permanece desconhecida.

Os portadores assintomáticos são frequentes, sendo apontado pelo consenso de Boyle (2018) que cerca de 10% dos cavalos acometidos por surtos de adenite equina desenvolvem empiema persistente nas bolsas guturais devido à falha na drenagem dessas estruturas. Em um estudo de prevalência realizado na Colômbia, 68% dos animais que testaram positivo no PCR para *S. equi* (13,8% dos animais testados) não apresentavam sintomatologia, sendo, portanto, portadores assintomáticos (JARAMILLO-MORALLES et al, 2022). Esses dados destacam a importância da doença para a equideocultura e a necessidade de maiores estudos sobre seu agente etiológico.

2.2 *Streptococcus equi* subsp. *equi*

A bactéria *Streptococcus equi* subsp. *equi* é um coco gram positivo, β -hemolítica, do grupo C de Lancefield, com grande proximidade genética com *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*), bactéria com potencial patogênico que leva a doenças também supurativas de mucosas em diversas espécies de mamíferos (FARROW e COLLINS, 1984). Sua proximidade genética é tanta que alguns isolados podem ter as colônias macroscopicamente indistinguíveis umas das outras (HARRINGTON et al, 2002). Ambas as bactérias pertencem ao grupo de *Streptococcus* piogênicos compartilhado também por *Streptococcus pyogenis*, patógeno que afeta seres humanos. Essas espécies compartilham mecanismos de virulência em comum, havendo evidências de troca horizontal de DNA entre elas (HOLDEN et al. 2009).

Apesar de raros relatos de infecção atípica em outras espécies, inclusive humanos, *Streptococcus equi* é considerado um patógeno restrito ao hospedeiro, com infecção adaptada a equídeos (POPESCU et al, 2006). O ciclo de infecção de *S. equi* no hospedeiro é definido por uma doença aguda com manifestação clínica de curto prazo, a adenite equina, seguida por uma infecção subclínica de longo prazo (HARRIS et al, 2015). Análises de isolados de *S. equi* advindos de diferentes animais após o fim da apresentação clínica da doença revelam o

desenvolvimento de características semelhantes entre as bactérias, como resultado da adaptação ao nicho dentro do hospedeiro para infecção persistente (HOLDEN et al, 2009; HARRIS et al, 2015). Esses dados demonstram a dinâmica de adaptação e evolução genética desse patógeno em sua relação com o hospedeiro, tornando-se progressivamente mais restrito à espécie que infecta. Assim, o *S. equi* pode persistir em estado de baixa demanda energética e na ausência de sinais clínicos por vários anos, proporcionando ao organismo uma oportunidade prolongada de ser eliminado no ambiente e transmitido para animais susceptíveis (NEWTON et al, 2000).

As bases moleculares associadas à infecção por *S. equi* são bem descritas na literatura, incluindo os fatores de virulência envolvidos na aderência, moléculas expressas envolvidas na evasão do sistema imunológico e as relacionadas à aquisição de nutrientes e disseminação pelo hospedeiro (HARRINGTON et al, 2002). Dentre os diversos fatores de virulência desta bactéria, destaca-se a Proteína M-like ou SeM (*Streptococcus equi* M-like protein), molécula de membrana com alta afinidade ao fibrinogênio equino, que auxilia na adesão da bactéria às células do hospedeiro e confere propriedades antifagocíticas, dificultando sua detecção pelo sistema imune (BOSCHWITZ e TIMONEY, 1994; TIMONEY et al, 1997). Essa proteína possui similaridade com proteínas de membrana de outros *Streptococcus*, como as proteínas de membrana M de *S. pyogenes* e a SzP de *S. zooepidemicus* (TIMONEY et al, 1997). No entanto a SeM é encontrada apenas na parede de *S. equi*, sendo amplamente utilizada para diagnóstico molecular por PCR (NEWTON et al, 2000; KELLY et al, 2006). Por sua relevância na virulência da bactéria, a SeM tem sido alvo de estudos genéticos, os quais demonstraram que alterações nas sequências posteriores ao N terminal de isolados descritos na literatura resultam na produção de diferentes aminoácidos, sugerindo a existência de múltiplos alelos da proteína SeM (CHANTER et al, 2000; KELLY et al, 2006). *S. equi* possui alta homogeneidade no DNA e não pode ser distinguido por eletroforese enzimática multilocus ou por métodos de tipagem por sequência multilocus que utilizam genes “housekeeping” (KELLY et al, 2006). Assim, a utilização dos alelos da SeM permitiu, por exemplo, que casos clínicos de adenite equina anteriormente atribuídos à administração de vacinas contendo bactérias vivas atenuadas fossem corretamente associados à infecção por isolados de campo, uma vez que o sequenciamento da região da proteína SeM possibilita a

diferenciação precisa entre os alelos dos isolados vacinais e isolados de campo (NEWTON et al, 2005; KELLY e al, 2006).

2.3 Métodos de identificação de *Streptococcus equi* subsp. *equi*

A coleta adequada de amostras para diagnóstico em casos de adenite equina é essencial para evitar resultados falso-negativos. Para identificar portadores assintomáticos de *S. equi*, a técnica ideal consiste na coleta de lavado das bolsas guturais, realizado com o auxílio de um endoscópio (BOYLE et al, 2018; JARAMILLO-MORALLES et al, 2022). O aspirado de abscessos de linfonodos em animais com linfadenomegalia causada por abscedação é uma boa alternativa, visto que apresentam alta contagem bacteriana. Outros focos para coleta simplificada podem ser utilizados, porém com menor sensibilidade, como lavado ou swab nasofaríngeo ou swab nasal em animais que apresentem secreção no trato respiratório (BOYLE et al, 2012; LINDAHL et al, 2013).

Em relação aos métodos laboratoriais de identificação da bactéria existem possibilidades variadas. Para a identificação bioquímica de um isolado cultivado de *S. equi*, são realizados os testes de fermentação de lactose, sorbitol e trealose, sendo o resultado positivo para a caracterização da bactéria quando não há fermentação de nenhum destes sacarídeos (GRANT e CHANTER, 1993). Esse resultado permite que se diferencie o microrganismo do *S. zooepidemicus*, que, quando exposto ao teste, leva a fermentação de lactose e sorbitol. A trealose é usada pois sua fermentação indica o crescimento de *S. equisimilis*, outro *streptococcus* do grupo C Lancefield (KUWAMOTO et al, 2001).

O PCR é frequentemente utilizado na rotina clínica e pesquisa na hipiatria, sendo um método confiável para a identificação e confirmação de infecção por *S. equi*, geralmente através da identificação do gene da SeM que não está presente em outros *streptococcus*. É um bom método para sua diferenciação do *S. zooepidemicus*, quando há dúvida no agente causador da doença investigada (NEWTON et al, 2000; Kelly et al, 2006; LIBARDONI et al, 2013, JAVED et al, 2016). Além disso, principalmente para caráter de pesquisa, o sequenciamento do genoma total ou de partes do genoma, como do gene da SeM e

sequenciamento 16S rRNA, já foi realizado para caracterização de mutações e para comparação genética entre isolados (KELLY et al, 2006; LIBARDONI et al, 2013; MORRIS et al, 2020; MITCHELL et al, 2021).

O MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) é uma técnica de espectrometria de massas utilizada na proteômica que analisa, principalmente, proteínas ribossomais bacterianas. Essa análise gera um perfil característico de picos de massa peptídica, uma espécie de “impressão digital”, que permite a identificação da espécie bacteriana avaliada (SINGHAL et al., 2015). No entanto, o próprio fabricante da tecnologia ressalta que a identificação de subespécies pode não ser acurada. Apesar dessa limitação, o MALDI-TOF tem se mostrado eficaz na diferenciação de isolados entre *Streptococcus equi* subsp. *equi* e *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (MANI et al., 2017), demonstrando seu potencial no diagnóstico rápido e na diferenciação entre subespécies de determinadas bactérias. Assim, essa técnica representa uma alternativa promissora para a identificação bacteriana em contextos clínicos e epidemiológicos que demandam precisão e agilidade.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O investimento em pesquisas voltadas aos isolados de *Streptococcus equi* de Minas Gerais e fronteiras possui relevância regional, nacional e internacional, uma vez que o estado possui o maior rebanho equino do Brasil. A adenite equina, apesar de sua baixa mortalidade, é considerada a doença infecto-contagiosa de maior prevalência entre os equinos, gerando prejuízos econômicos expressivos devido à queda de performance dos animais, custos com tratamentos e prevenção. A presença de portadores assintomáticos representa um desafio adicional ao controle da doença, ressaltando a necessidade de investigação aprofundada da variabilidade genética de *S. equi*. A caracterização dessa diversidade permite rastrear a origem dos surtos, compreender a relação genética entre os isolados regionais e aqueles já descritos na literatura nacional e internacional, além de subsidiar medidas de biossegurança e vigilância epidemiológica. Estudos epidemiológicos pioneiros voltados à caracterização genética de *S. equi* no estado de Minas Gerais são fundamentais para a consolidação de uma base de dados regional, fomentando o desenvolvimento de pesquisas futuras. Tais investigações contribuem

diretamente para a formulação de estratégias mais eficazes de prevenção e controle da adenite equina, promovendo a saúde animal e a sustentabilidade da equideocultura nos âmbitos regional, estadual e nacional.

3.1. Objetivo geral

Avaliar a diversidade genética e proteica dos isolados de *S. equi* advindos de cidades do estado de Minas Gerais e Rio de Janeiro;

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a diversidade genética entre os isolados obtidos;
- Determinar a proximidade genética dos isolados analisados em relação aos isolados descritos em outras regiões do Brasil e exterior;
- Avaliar a capacidade da técnica de MALDI-TOF em discriminar isolados a nível de subespécie;
- Caracterizar a diversidade das proteínas ribossomais entre os isolados obtidos através do MALDI-TOF;
- Determinar o perfil de sensibilidade dos isolados frente aos antibacterianos comumente utilizados na medicina equina.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostras utilizadas

Foram avaliadas 32 amostras liofilizadas provenientes de secreção purulenta de animais com suspeita clínica de adenite equina, enviadas por veterinários a campo e recebidas

por laboratório parceiro (Microvet) entre os anos de 2012 e 2024. Dentre estas, 28 amostras foram coletadas no estado de Minas Gerais e 4 na região de fronteira entre Minas Gerais e o estado do Rio de Janeiro.

5.1 Análise bioquímica dos isolados

As amostras foram inicialmente inoculadas em meio de cultura ágar Todd Hewitt na temperatura de 37°C durante 24 horas para crescimento e isolamento microbiológico e identificadas através de testes bioquímicos de fermentação de lactose, sorbitol e trealose (GRANT e CHANTER, 1993; LIBARDONI et al, 2013). O resultado foi considerado positivo para a caracterização de *S. equi* quando não houve fermentação de nenhum destes sacarídeos; e considerado positivo para *S. zooepidemicus* quando houve fermentação de lactose e sorbitol (KUWAMOTO et al, 2001). As culturas foram utilizadas para realização do PCR e do MALDI TOF. Os isolados originados das culturas foram liofilizados e mantidos estocados para viabilizar análises futuras.

5.2 Análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As 32 amostras foram submetidas à técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para confirmar a identificação dos isolados como *S. equi*. Houve o uso de amostras de controle positivo (isolado conhecido de *S. equi*) e negativo (mistura de todos os reagentes sem cultura bacteriana). Os primers forward ASW73 (5'-CAG AAA ACT AAG TGC CGG TG) e reverse ASW74 (5'-ATT CGG TAA GAG CTT GAC GC) foram utilizados para amplificar 541 pares de base da região N-terminal do gene da SeM, exclusivo de *S. equi*, como descrito por Kelly et al, 2006 e Libardoni et al, 2013. A detecção da amplificação do segmento indicou a presença de *S. equi*, enquanto sua ausência foi associada a *S. zooepidemicus*.

5.3 Análise através de MALDI TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight)

As culturas isoladas após cultivo foram submetidas à análise de proteínas ribossomais por espectrofotometria de massa pela técnica de MALDI TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) em equipamento da marca Biotype®. Após a avaliação das proteínas ribossomais realizada por essa técnica, o pico de massa de cada isolado foi

comparado com as outras amostras presentes no estudo e com os isolados presentes no banco de dados do sistema da Biotyper. O dendrograma foi construído com o programa estatístico Matlab 7.1 (The MathWorks Inc.), integrado ao programa MALDI Biotyper 3.1, com os parâmetros: medida de distância por correlação e ligação por média, sendo esta normalizada entre a distância 0-400 (concordância total, ou similares), 450-700 (concordância média ou levemente divergentes) e 750-1000 (sem concordância ou totalmente divergentes). A medida de distância foi definida em correlação e a ligação foi definida em média. Os isolados utilizadas do banco de dados para análise foram: *Streptococcus equi_ssp_equi* BKT 48398 11 NVU, *Streptococcus equi_ssp_equi* DSM 20561T DSM 2, *Streptococcus equi_ssp_zooepidemicus* ATCC 43079T THL, *Streptococcus equi_ssp_equi* BKT 1851 12 NVU, *Streptococcus equi_ssp_zooepidemicus* BKT 28062 10 NVU, *Streptococcus equi_ssp_zooepidemicus* BKT 17613 10 NVU, *Streptococcus equi_ssp_zooepidemicus* BKT 36582 NVU, *Streptococcus equi_ssp_zooepidemicus* BKT 7369 10 NVU.

5.4 Sequenciamento Sanger

As amostras positivas para *S. equi* que tiveram identificação confirmada pela técnica de PCR foram enviadas para sequenciamento sanger do gene da SeM. O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes foram marcados em termociclador LGC XP Cyclor. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação, diluídas em formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems), desnaturadas, resfriadas e eletroinjetadas no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 3 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set “Z”; Mobility File “KB_3500_POP7_BDTv3.mob”; BioLIMS Project “3500_Project1”; Run Module 1 “FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100”; e Analysis Module 1 “BC-3500SR_Seq_FASTA.saz”. Os arquivos resultantes do Data Collection (.ab1; eletroferogramas) foram convertidos em arquivos FASTA (.seq; texto) pelo Sequence Analysis Software v. 6 (Applied Biosystems) sob parâmetros padrões.

5.6 Análise do sequenciamento genético dos isolados

As sequências (fita direta e reversa) foram editadas e utilizadas para a criação de uma sequência consenso para cada amostra. O alinhamento foi realizado utilizando a opção Muscle do software BioEdit (versão 7.0.5.3; Hall, 1999), sendo utilizada como referência a sequência genômica da SeM (*KF859902.1 Streptococcus equi* cepa Blue, gene *sem*, *cds* completa, 1605 pb; GenBank). A região coberta corresponde às posições 36 a 577 da sequência de referência. Foram obtidos os resultados de similaridade, regiões conservadas e entropia. Para as regiões conservadas, considerou-se um mínimo de 45 nucleotídeos e uma entropia média máxima de 0,15.

A árvore filogenética das sequências de DNA foi construída utilizando o PhyML (versão 3.0; Guindon *et al.*, 2010), a seleção do modelo utilizou critérios baseados em verossimilhança (Lefort *et al.*, 2017), e foi adotada a análise de *bootstrap* clássico com 1000 repetições. A visualização da árvore filogenética e do dendrograma foi realizada no iTOL (versão 7.1; LETUNIC e BORK, 2024).

As sequências de aminoácidos previstas, para cada amostra, foram obtidas utilizando o software BioEdit, e a árvore filogenética foi construída no PhyML com o modelo LG (LE e GASCUEL, 2008), sendo mantidas as demais configurações conforme descritas anteriormente.

As sequências foram avaliadas quanto à variação alélica por meio da comparação com todos os alelos disponíveis (locus *seM*) no banco de dados do PubMLST (JOLLEY *et al.*, 2018), tanto para DNA (https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_szoepidemicus_seqdef&page=alleleQuery&locus=seM) quanto para os aminoácidos previstos (https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_szoepidemicus_seqdef&page=alleleQuery&locus=seM_peptide).

Para identificar sequências homólogas descritas na literatura, foram realizadas buscas BLASTn e BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool* para nucleotídeos, versão 2.16.1+). Cada sequência foi comparada com um banco de dados curado de sequências provenientes de

fontes publicadas. Foi aplicado um valor de corte de *E-value* igual a $1e-50$, e as 14 melhores correspondências foram selecionadas com base na similaridade de sequência.

5.5 Avaliação do perfil de sensibilidade a antibacterianos

Os isolados de *S. equi* foram semeados em ágar Todd Hewitt suplementado com 8% de sangue equino (EUCAST, 2023) e submetidos ao teste de disco-difusão com os seguintes antibacterianos: penicilina, ceftiofur, ampicilina, gentamicina, enrofloxacina, azitromicina, doxiciclina, tetraciclina, florfenicol, imipenem e sulfametoxazol-trimetoprim. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e interpretados com base nos pontos de corte em milimetragem estabelecidos pelos manuais de 2023 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

6. RESULTADOS

6.1 Análise bioquímica e por PCR

A análise bioquímica revelou que, dos 32 isolados, 22 (A01-A22) não fermentaram os sacarídeos testados, enquanto os demais (B01-B10) fermentaram lactose e sorbitol. Esses resultados foram confirmados pela análise do gene *SeM* via PCR, na qual os 22 isolados A01-A22 apresentaram amplificação positiva (sendo identificados como *S. equi*), e os 10 restantes (B01-B10) não amplificaram, sendo identificados como *S. zooepidemicus*.

6.2 Avaliação descritiva das amostras e distribuição geográfica

Após a confirmação da subespécie por PCR, as amostras foram organizadas em planilha (Tabela 01), contendo informações de identificação, subespécie, ano de coleta, município de origem e unidade federativa. As amostras A01, A06, A08 e A09 são provenientes de municípios do Rio de Janeiro que fazem fronteira com Minas Gerais, enquanto as demais têm origem dentro do estado. A maior distância entre os locais de coleta

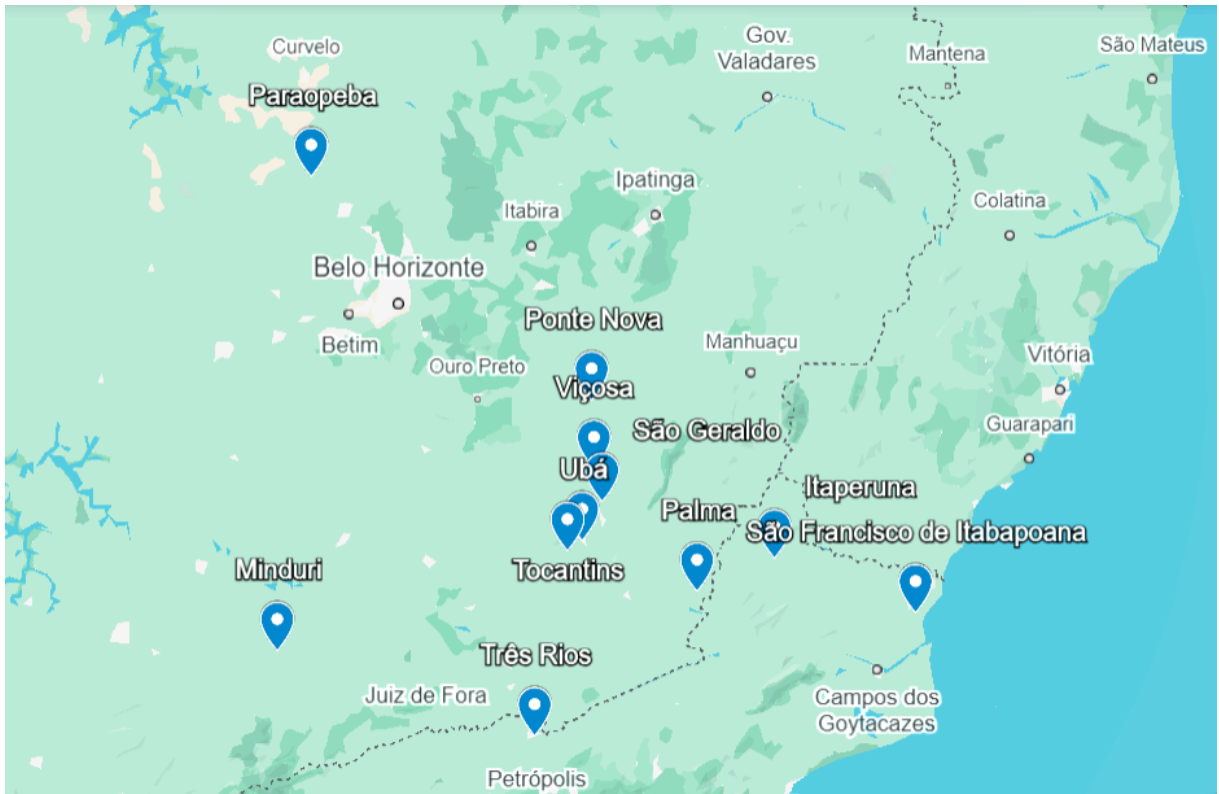
encontra-se em um raio de até 235 km do município de Viçosa, onde a pesquisa foi conduzida (Figura 01). Das 32 amostras analisadas, 31 foram provenientes de animais da raça Mangalarga Marchador (MM) e apenas uma obtida de um asinino (A19). As amostras foram coletadas em 21 propriedades distintas, com distribuição irregular entre elas.

Tabela 01. Distribuição das amostras de acordo com identificação, subespécie confirmada por PCR, ano de coleta, cidade de coleta, unidade federativa, raça do animal e propriedade.

Identificação	Resultado PCR	Ano	Cidade	UF	Propriedade
A01	S. equi	2016	Itaperuna	RJ	P1
A02	S. equi	2017	Tocantins	MG	P2
A03	S. equi	2019	Viçosa	MG	P3
A04	S. equi	2017	Paraopeba	MG	P4
A05	S. equi	2017	Paraopeba	MG	P4
A06	S. equi	2018	Três Rios	RJ	P5
A07	S. equi	2019	Palma	MG	P6
A08	S. equi	2021	São Francisco do Itabapoana	RJ	P7
A09	S. equi	2021	São Francisco do Itabapoana	RJ	P7
A10	S. equi	2023	Viçosa	MG	P8
A11	S. equi	2023	Viçosa	MG	P9
A12	S. equi	2023	São Geraldo	MG	P10
A13	S. equi	2023	São Geraldo	MG	P10

A14	S. equi	2023	São Geraldo	MG	P10
A15	S. equi	2023	São Geraldo	MG	P10
A16	S. equi	2023	São Geraldo	MG	P10
A17	S. equi	2023	São Geraldo	MG	P10
A18	S. equi	2023	Viçosa	MG	P11
A19	S. equi	2023	Viçosa	MG	P12
A20	S. equi	2023	Viçosa	MG	P13
A21	S. equi	2012	UBÁ	MG	P14
A22	S. equi	2015	Minduri	MG	P15
B01	S. zooepidemicus	2021	Viçosa	MG	P16
B02	S. zooepidemicus	2023	Viçosa	MG	P17
B03	S. zooepidemicus	2023	Ponte Nova	MG	P18
B04	S. zooepidemicus	2023	Ponte Nova	MG	P18
B05	S. zooepidemicus	2023	Ponte Nova	MG	P18
B06	S. zooepidemicus	2024	Viçosa	MG	P19
B07	S. zooepidemicus	2024	Viçosa	MG	P20
B08	S. zooepidemicus	2024	Viçosa	MG	P20
B09	S. zooepidemicus	2024	Viçosa	MG	P21
B10	S. zooepidemicus	2024	Viçosa	MG	P21

Figura 01. Mapa de localização das cidades onde houveram propriedades com coleta das amostras avaliadas na pesquisa. Os pontos azuis correspondem às cidades em que houve coleta de amostras.



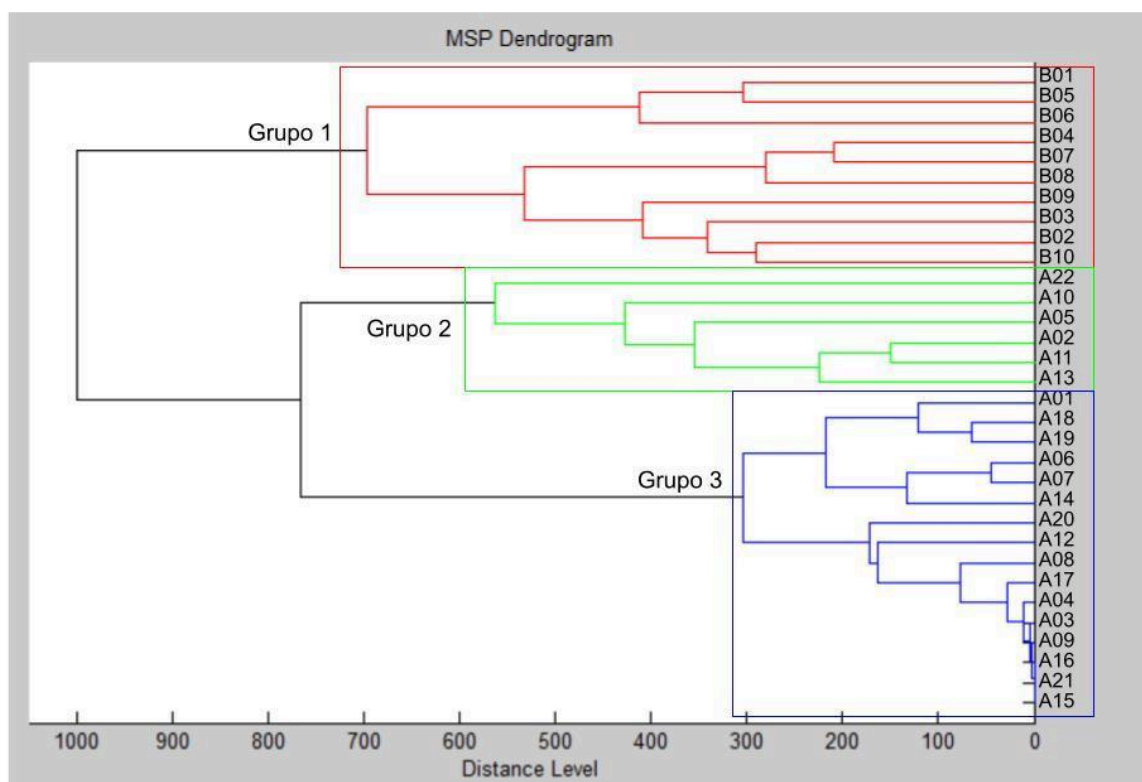
Fonte: Google Maps, 2024.

6.3 Análise MALDI TOF

A identificação das amostras a nível de espécie por MALDI TOF apresentou resultados concordantes com as análises bioquímicas e com a PCR, demonstrando alto grau de confiabilidade. As amostras B01 a B10 foram identificadas como *S. zooepidemicus* e as A01 a A22 foram identificadas como *S. equi*. Os resultados apresentaram alto grau de confiabilidade dado em Log Score, todos acima de 2.300. O grau de confiabilidade dado em Log Score mostra: Log Score * 3.000 a 2.300 – Confiável de espécie, 2.299 a 2.000 – Confiável de gênero e provável identificação de espécie, 1.999 a 1.700 – Provável identificação de gênero e Abaixo de 1.700 – Não há identificação confiável.

Ao se avaliar a proximidade proteica entre os isolados com base nos perfis de massa das proteínas ribossomais, os isolados foram agrupados em três clados principais, denominados Grupos 1, 2 e 3. O Grupo 1 foi composto exclusivamente por isolados de *S. zooepidemicus*, que demonstraram entre si alta similaridade proteica. Ainda assim, alguns isolados, como B01, B05 e B06, apresentaram discreta divergência das demais dentro do grupo (distância aproximada de 700). Da mesma forma, B04, B07 e B08 tiveram menor similaridade entre as proteínas quando comparadas aos isolados B09, B03, B02 e B10 (distância próxima de 650). Os isolados agrupados nos Grupos 2 e 3, embora todos identificados como *S. equi*, apresentaram divergência proteica mais significativa entre si, com distância média aproximada de 800 unidades. No interior do Grupo 2, a amostra A22 destacou-se por sua maior distância dos demais membros do grupo (cerca de 600). Já os isolados do Grupo 3 foram altamente semelhantes entre si, apresentando distanciamento inferior a 300 unidades. A distribuição dos isolados com base na análise de similaridade proteica está ilustrada no dendrograma da Figura 02.

Figura 02. Dendrograma representando a distribuição dos isolados de *Streptococcus equi* e *Streptococcus zooepidemicus* presentes no estudo com formação de grupos.

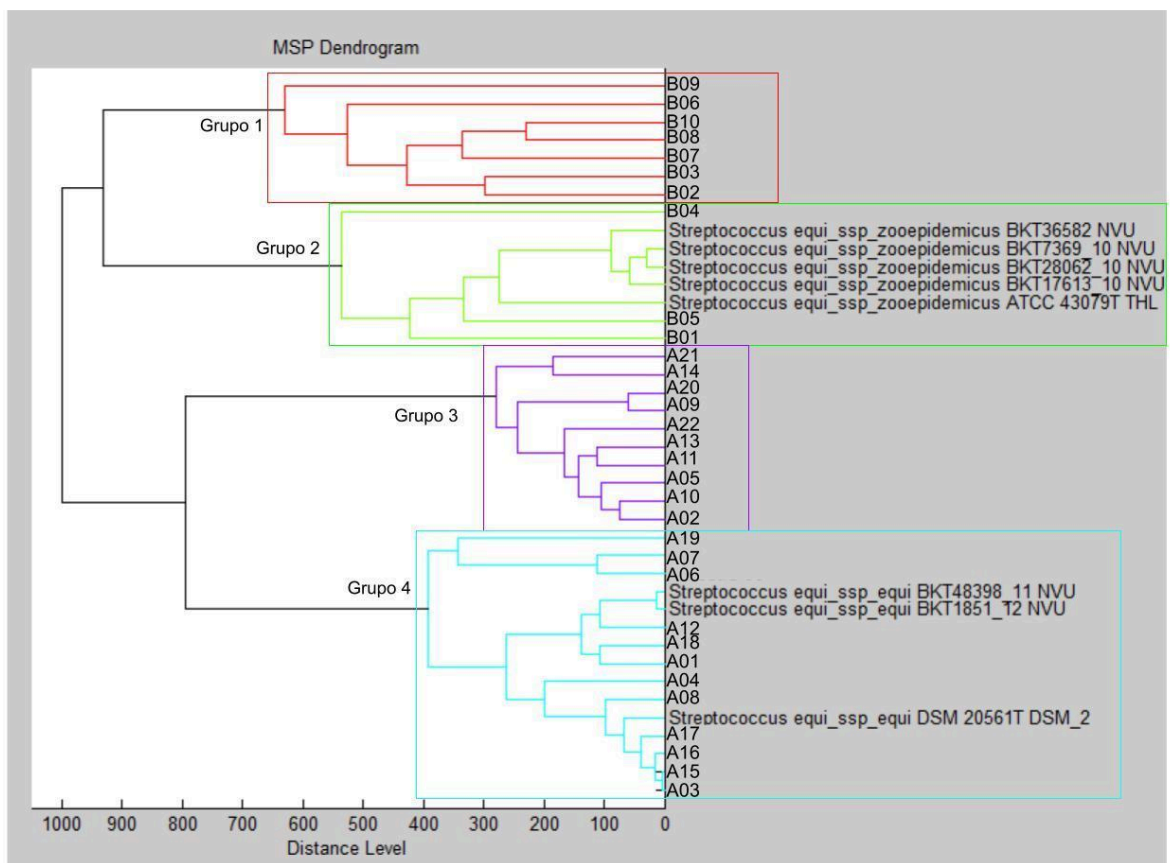


Interpretação da similaridade entre os isolados se dá pela distância: 0-400 (concordância total ou similares), 450-700 (concordância média ou levemente divergentes) e 750-1000 (sem concordância ou totalmente divergentes).

Quando os isolados foram comparados aos isolados presentes no banco de dados da plataforma Biotyper, a análise de agrupamento gerou um quarto grupo adicional. Com base nos perfis proteicos obtidos, observou-se que os isolados de *Streptococcus zooepidemicus* foram alocados nos grupos 1 e 2, com divergência proteica entre esses dois grupos (distanciamento próximo a 950). Três isolados apresentaram maior similaridade com os isolados de referência disponíveis no banco, enquanto os demais isolados apresentaram perfil proteico divergente. Quanto aos Grupos 3 e 4, compostos por isolados identificados como *Streptococcus equi*, também se observou divergência proteica entre eles (distanciamento próximo de 800). Os isolados do Grupo 4 mostraram elevada similaridade entre si e com os

isolados de referência, enquanto os do Grupo 3, embora homogêneos entre si, apresentaram divergência significativa em relação aos isolados de referência. A distribuição dos grupos e suas relações proteicas está ilustrada no dendrograma apresentado na Figura 03.

Figura 03. Dendrograma representando a distribuição dos isolados de *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus* e dos isolados de referência de ambas as subespécies disponíveis no banco de dados da Biotyper.



Interpretação da similaridade entre os isolados se dá pela distância: 0-400 (concordância total ou similares), 450-700 (concordância média ou levemente divergentes) e 750-1000 (sem concordância ou totalmente divergentes).

6.4 Análise do Sequenciamento Sanger

As sequências apresentaram bom alinhamento, sem detecção de lacunas ou regiões com baixa cobertura (Material suplementar 01). Os isolados apresentaram alta similaridade com a sequência de referência (94,8 a 97,0%). A similaridade entre os isolados foi ainda maior, variando de 97,3 a 100% (Material suplementar 02).

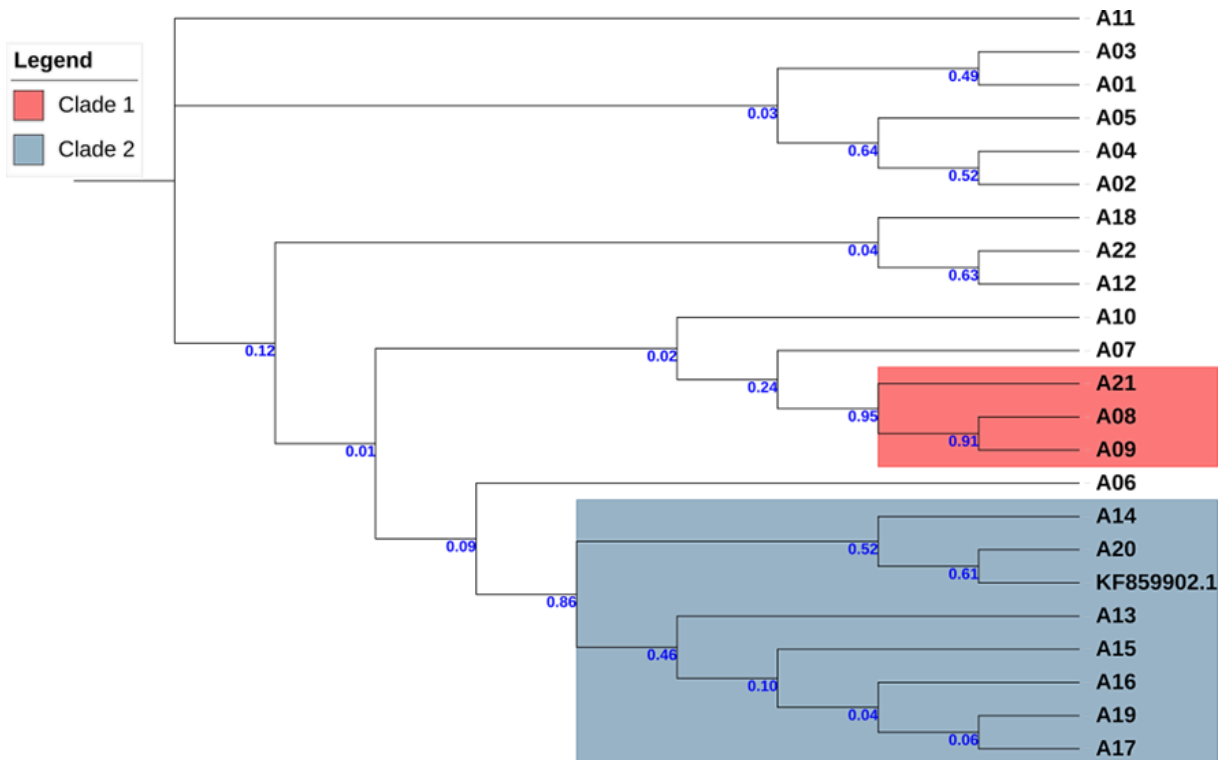
Três regiões conservadas foram identificadas com valores de entropia muito baixos (Tabela 02; Material suplementar 03). De forma geral, os valores de entropia observados nas sequências foram baixos, sugerindo baixa variabilidade. No entanto, foram identificadas duas posições com entropia moderada: posição 276 (correspondente à posição 311 na sequência de referência) e posição 331 (correspondente à posição 366 da referência) (Material Suplementar 04).

Tabela 02. Descrição das regiões conservadas do DNA do gene da SeM nos isolados de *Streptococcus equi* avaliadas.

Posição nas amostras	Posição na referência	Nucleotídeos (n)	Entropia média
14 – 133	49 – 168	120	0.0000
154 – 275	189 – 310	122	0.0000
332 – 530	367 – 565	199	0.0009

A árvore filogenética construída a partir das 22 isolados avaliados, juntamente com a sequência de referência, revelou padrões distintos de agrupamento (Material suplementar 05). A análise revelou alto suporte de *bootstrap* ($> 0,80$) para dois clados, apresentados no dendrograma da Figura 04. Um dos clados incluiu os isolados A08, A09 e A21 (*bootstrap* = 0,95). O outro clado, maior, foi formado pelos isolados KF859902.1 (referência), A14, A20, A13, A15, A16, A17 e A19, com *bootstrap* de 0,86.

Figura 04. Dendrograma das sequências de DNA com os isolados de *Streptococcus equi*. Valores em azul: valores de bootstrap ($\times 1000$ repetições), com valores decimais representando o suporte percentual.



Para o alinhamento das sequências preditas de aminoácidos, considerou-se apenas a região coberta da sequência de DNA, que corresponde aos resíduos de aminoácidos 17 a 188 da sequência de referência traduzida. Os isolados analisados apresentaram similaridade superior a 95% em relação à referência (Materiais suplementares 06 a 09). Apesar da alta conservação, algumas regiões com variabilidade moderada (entropia $> 0,50$) foram detectadas (Tabela 03).. Os resultados das buscas por similaridade utilizando BLASTp estão apresentados no Material Suplementar 10. A árvore filogenética da sequência predita de aminoácidos apresentou padrão semelhante ao observado nas análises de DNA (Material suplementar 11)

Tabela 03. Descrição das alterações de aminoácidos preditos nos isolados em comparação com a sequência de referência.

Resíduo na amostra	Resíduo na referência	Entropia	Descrição
88	104	0.6616	Asn → Ser nos isolados A08C, A09C, A21C, A02C, A04C, A05C, A18C, A12C, A22C, A07C, A03C, A01C, A06C, A10C e A11C
91	107	0.7365	Met → Thr nos isolados A08C, A09C e A21C Met → Ile nos isolados A02C, A04C e A05C
106	122	0.6616	Met → Ser nos isolados A08C, A09C, A21C, A02C, A04C, A05C, A18C, A12C, A22C, A07C, A03C, A02C, A06C, A10C, e A11C

Ao todo, foram identificadas 14 sequências homólogas por meio da análise BLASTn (Material suplementar 12), apresentando alta similaridade com os isolados analisados, com valores variando entre 98,65% e 100%. A melhor correspondência para todos os 22 isolados foi o acesso AF012927.1, correspondente ao gene da proteína SeM de *Streptococcus equi*, contendo a sequência completa do cds, com similaridade média de 99,61% (intervalo de 99,04% a 100%). Outros acessos, como MT094740.1, FM204883.1, LR134389.1, CP119575.1, MT094738.1 e MN094425.1, também estiveram consistentemente entre as quatorze melhores correspondências para todos os isolados avaliados (Material suplementar 13).

Nas sequências de DNA, foram identificados dois alelos (1 e 270) entre os 22 isolados de *Streptococcus equi* (Tabela 04) (KELLY et al, 2006). Sete isolados apresentaram

correspondência exata com o alelo 1, enquanto seis isolados mostraram correspondência exata e nove apresentaram correspondência parcial com o alelo 270. Em relação às sequências preditas de aminoácidos, foram identificados três alelos (1, 82 e 258) entre os 22 isolados avaliadas (Tabela 05). Dezenove isolados apresentaram correspondência exata com um dos alelos identificados, enquanto três isolados mostraram correspondência parcial com o alelo 258.

Tabela 04. Resumo das correspondências de sequências e diferenças alélicas no locus *SeM* em isolados de *Streptococcus equi* provenientes de cavalos. A em verde; G em preto; T em vermelho; C em azul.

Sequência	Match	Alelo	Extensão do alelo	Diferenças*
KF859902.1	Exato	28	327	-
A01	Exato	270	327	-
A02	Parcial	270	327	1 diferença encontrada: ²¹⁰ G → ²⁷⁴ A
A03	Exato	270	327	-
A04	Parcial	270	327	1 diferença encontrada: ²¹⁰ G → ²⁷⁴ A
A05	Parcial	270	327	1 diferença encontrada: ²¹⁰ G → ²⁷⁵ A
A06	Exato	270	327	-
A07	Exato	270	327	-
A08	Parcial	270	327	3 diferenças encontradas: ⁵⁸ A → ¹²³ G; ⁷⁷ G → ¹⁴² A; ²⁰⁹ T → ²⁷⁴ C
A09	Parcial	270	327	3 diferenças encontradas: ⁵⁸ A → ¹²³ G; ⁷⁷ G → ¹⁴² A; ²⁰⁹ T → ²⁷⁴ C
A10	Exato	270	327	-
A11	Exato	270	327	-

A12	Parcial	270	327	1 diferença encontrada: ²¹² A → ²⁷⁷ G
A13	Exato	1	327	-
A14	Exato	1	327	-
A15	Exato	1	327	-
A16	Exato	1	327	-
A17	Exato	1	327	-
A18	Parcial	270	327	1 diferença encontrada: ²¹⁷ T → ²⁸³ C
A19	Exato	1	327	-
A20	Exato	1	327	-
A21	Parcial	270	327	3 diferenças encontradas: ⁵⁸ A → ¹²⁵ G; ⁷⁷ G → ¹⁴⁴ A; ²⁰⁹ T → ²⁷⁶ C
A22	Parcial	270	327	1 diferença encontrada: ²¹² A → ²⁷⁷ G

* As informações à esquerda da seta indicam a identidade e a posição na sequência de referência, enquanto as informações à direita indicam a identidade e a posição correspondentes na sequência de consulta.

Tabela 05. Resumo das correspondências de sequências e diferenças alélicas em *SeM_peptide* em isolados de *Streptococcus equi* provenientes de cavalos.

Sequência	Match	Alelo	Extensão do alelo	Diferenças*
KF859902.1	Exato	28	109	-
A01	Exato	258, 82	109, 61	-
A02	Exato	82	61	-

A03	Exato	258, 82	109, 61	-
A04	Exato	82	61	-
A05	Exato	82	61	-
A06	Exato	258, 82	109, 61	-
A07	Exato	258, 82	109, 61	-
A08	Parcial	258	109	3 diferenças encontradas: $^{20}\text{S} \rightarrow ^{41}\text{G}; ^{26}\text{R}$ $\rightarrow ^{47}\text{K}; ^{70}\text{M} \rightarrow ^{91}\text{T}$
A09	Parcial	258	109	3 diferenças encontradas: $^{20}\text{S} \rightarrow ^{41}\text{G}; ^{26}\text{R}$ $\rightarrow ^{47}\text{K}; ^{70}\text{M} \rightarrow ^{91}\text{T}$
A10	Exato	258, 82	109, 61	-
A11	Exato	258, 82	109, 61	-
A12	Exato	82	61	-
A13	Exato	1, 82	109, 61	-
A14	Exato	1, 82	109, 61	-
A15	Exato	1, 82	109, 61	-
A16	Exato	1, 82	109, 61	-
A17	Exato	1, 82	109, 61	-
A18	Exato	82	61	-
A19	Exato	1, 82	109, 61	-
A20	Exato	1, 82	109, 61	-
A21	Parcial	258	109	3 diferenças encontradas: $^{20}\text{S} \rightarrow ^{41}\text{G}; ^{26}\text{R}$ $\rightarrow ^{47}\text{K}; ^{70}\text{M} \rightarrow ^{91}\text{T}$
A22	Exato	82	61	-

* As informações à esquerda da seta indicam a identidade e a posição na sequência de referência, e as informações à direita indicam a identidade e a posição correspondentes na sequência de consulta.

A árvore filogenética resultante da análise da proximidade genética entre os isolados do presente estudo (A01–A22), os isolados avaliadas no Rio Grande do Sul por Libardoni et al. (2012) e as 14 sequências homólogas com maior similaridade encontradas no GenBank está apresentada na Figura 05. Os isolados experimentais mantiveram a mesma distribuição entre si após o alinhamento, e os isolados do estudo de Libardoni et al. também se agruparam com maior proximidade entre elas. No entanto, algumas das sequências obtidas do GenBank se agruparam mais próximas dos isolados experimentais, enquanto outras apresentaram maior proximidade com os isolados descritas por Libardoni et al.

Figura 05. Árvore filogenética das sequências de DNA com isolados de *Streptococcus equi* avaliadas (em azul), isolados de Libardoni (2013) (em vermelho), isolado de referência KF859902.1 (em verde) e com sequências homólogas com similaridade superior a 98% disponíveis no GenBank (em preto).



*Valores em preto nos nós: valores de bootstrap ($\times 1000$ repetições), com valores decimais representando o suporte percentual. Valores em vermelho: comprimentos dos ramos (substituições por sítio), estimados com base na verossimilhança máxima utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos HKY85.

6.5 Perfil de sensibilidade a antibacterianos

De acordo com os pontos de corte estabelecidos pelos manuais de 2023 do CLSI e EUCAST, os isolados definidos como resistentes à enrofloxacina foram: A10, A11, A12, A13, A14, A17, A18, A19, A20 e A21. O restante das análises revelou resultados sensíveis a todos os antibacterianos avaliados.

7. DISCUSSÃO

A maioria dos isolados foi confirmada como *S. equi* (22 isolados), enquanto apenas 10 foram identificados como *S. zooepidemicus*, todos provenientes de animais com suspeita de adenite equina. Esse resultado evidencia a semelhança entre os sinais clínicos das doenças causadas por essas duas bactérias. Embora as infecções por *S. zooepidemicus* sejam mais frequentemente associadas ao trato respiratório inferior, como nos casos de broncopneumonias, a presença de febre, secreção nasal e linfadenomegalia são sinais que podem ocorrer em comum entre as infecções (BOYLE, 2023). Essa similaridade clínica ressalta a importância da confirmação laboratorial para o diagnóstico etiológico preciso, especialmente em contextos de surtos ou quando há necessidade de medidas de controle sanitário. Além disso, a coleta adequada de amostras é fundamental para resultados precisos, uma vez que *S. zooepidemicus* está presente nas vias aéreas superiores de equinos saudáveis, e sua detecção não necessariamente indica infecção. Já a identificação de *S. equi* é mais dificultada, pois sua liberação pode ser intermitente (HOLDEN et al, 2009; HARRIS et al, 2015). Por isso, o método recomendado para seu diagnóstico é o lavado de bolsa gutural ou o swab nasofaríngeo, embora em alguns casos ele possa ser detectado quando há liberação da bactéria na secreção nasal (BOYLE et al, 2018; JARAMILLO-MORALLES et al, 2022).

Dessa forma, o uso exclusivo de swab nasal pode levar a erros diagnósticos, como o subdiagnóstico de infecção por *S. equi*, tanto na avaliação clínica quanto experimental.

O resultado obtido por meio da técnica de MALDI-TOF foi idêntico ao verificado nas análises bioquímicas e de PCR, demonstrando que esse método é eficaz não apenas na identificação da espécie, mas também na diferenciação de subespécie de *Streptococcus*. O MALDI-TOF baseia-se na análise do peso molecular das proteínas ribossomais para determinar, de forma confiável, a espécie da bactéria avaliada formando picos de massa característicos de cada espécie. Conforme evidenciado pelos dados deste estudo, essa técnica pode oferecer um nível adicional de discriminação, permitindo a diferenciação entre *S. equi* e *S. zooepidemicus*. Resultados semelhantes já foram descritos na literatura (KUDIRKIENE et al., 2015; MANI et al., 2017), reforçando sua aplicabilidade em contextos clínicos e epidemiológicos. Além disso, o MALDI-TOF apresenta vantagens significativas em relação a outros métodos utilizados para diferenciação de subespécies, como o PCR e o sequenciamento genético, destacando-se pela maior praticidade e rapidez dos resultados, já sendo uma técnica frequentemente utilizada em hospitais humanos devido à sua agilidade (LI et al, 2022). Dessa forma, configura-se como uma alternativa promissora para o diagnóstico rápido e acurado de isolados de *Streptococcus* em medicina veterinária.

Além da identificação bacteriana, a análise por MALDI-TOF permitiu a construção de um dendrograma que agrupou os isolados com base nos perfis de massa de suas proteínas ribossomais. Essa abordagem possibilitou a comparação da similaridade entre os isolados e também a sua proximidade em relação a isolados previamente descritos na literatura e incluídas no banco de dados do equipamento. A partir do dendrograma, observou-se a formação de quatro grupos distintos quando os isolados foram comparados aos isolados de referência. No entanto, considerando que essa análise se baseia em características proteômicas, especificamente nas proteínas ribossomais, não é possível inferir, com segurança, relações de proximidade filogenética entre os grupos formados.

Quanto às características dos animais coletados, a predominância de animais da raça Mangalarga Marchador reflete a importância dessa raça na região avaliada. Originário de Minas Gerais, o Mangalarga Marchador é muito utilizado em torneios de marcha realizados no Sudeste e em outras regiões do país, o que favorece o trânsito de animais para eventos e a

comercialização entre haras e pequenos produtores. Embora a raça esteja presente em outras regiões, sua distribuição permanece concentrada no Sudeste, diferindo de raças como o Puro-Sangue Inglês e o Brasileiro de Hipismo, cujos animais são transportados por distâncias maiores para participar de modalidades esportivas como corridas e provas de salto. Características relacionadas ao tipo de criação podem exercer influência na disseminação de doenças e na dinâmica epidemiológica de genes bacterianos circulantes em populações específicas.

O sequenciamento do gene da SeM revelou alta similaridade entre os isolados e a sequência de referência, indicando a conservação da maior parte dos nucleotídeos como apresentado pelas três regiões com baixo valor de entropia citadas nos resultados. A entropia fornece uma medida da variabilidade em cada posição do alinhamento, de forma que valores mais baixos indicam maior conservação, enquanto valores mais altos sugerem maior variabilidade. A organização dos isolados com base na proximidade genética de seu gene da SeM gerou um uma árvore filogenética e um dendrograma que revelou dois clados com alto valor de *bootstrap* ($>0,086$). Entretanto, foi observado suporte inferior ($< 0,50$) em alguns nós, indicando incerteza no agrupamento. Para isolados muito semelhantes, os comprimentos dos ramos são tipicamente muito curtos. Quando as sequências são tão semelhantes, o algoritmo de construção da árvore pode não ter características suficientes para suportar robustamente os ramos com apenas diferenças mínimas, embora a topologia geral da árvore permaneça confiável.

O primeiro clado incluiu os isolados A08, A09 e A21. As duas primeiras foram obtidas durante um mesmo surto em um haras localizado em São Francisco de Itabapoana (RJ), em 2021, o que justifica a alta similaridade genética entre elas. A amostra A21, por sua vez, foi coletada no município de Ubá em 2012. Uma possível explicação para a proximidade genética observada entre esses isolados é o trânsito ou a comercialização de animais entre propriedades, o que pode ter favorecido a disseminação do isolado. O segundo clado compreendeu cinco isolados (A13 a A17) provenientes de um surto ocorrido em 2023, em um haras localizado no município de São Geraldo, além de dois isolados (A19 e A20) provenientes de Viçosa (MG), cidade vizinha.. Também foi incluída nesse grupo a amostra A06, coletada em Três Rios (RJ), município limítrofe ao estado de Minas Gerais, com coleta

realizada cinco anos antes das demais. A amostra de referência KF859902.1 foi igualmente alocada neste clado. A proximidade genética entre esses isolados pode, mais uma vez, ser explicada pelo constante intercâmbio de animais entre regiões, inclusive em eventos nacionais e internacionais.

O mesmo procedimento foi aplicado às sequências preditas de aminoácidos, por meio de alinhamento com a sequência de referência. A similaridade observada também foi elevada (>95%); no entanto, algumas substituições de resíduos de aminoácidos foram identificadas nos isolados analisados em relação à sequência de referência. Essa variação pode ter sido observada pois a SeM é um fator de virulência de *S. equi* associado à evasão da resposta imune, particularmente por sua capacidade de se ligar ao fibrinogênio equino e interferir na fagocitose (BOSCHWITZ e TIMONEY, 1994). Estudos anteriores demonstraram que essa proteína está sob forte pressão seletiva, especialmente em sua região N-terminal, possivelmente devido à ação da resposta imune adaptativa do hospedeiro, o que pode resultar em alta variabilidade entre isolados (KELLY et al, 2006). A organização das sequências preditas de aminoácidos em dendrograma e árvore filogenética resultou em uma distribuição equivalente à observada na análise das sequências de DNA. Esse resultado era esperado, uma vez que as sequências preditas de aminoácidos derivam diretamente das sequências genéticas, refletindo a mesma relação evolutiva entre os isolados.

A comparação com as sequências do gene da SeM disponíveis no GenBank revelou 14 sequências homólogas, definidas como aquelas com similaridade superior a 98,65%. A sequência de maior similaridade foi a de código de acesso AF012927.1, correspondente à sequência codificadora completa da proteína de ligação ao fibrinogênio (*fbp*) (também chamada de *SeM*) de *Streptococcus equi*, publicada por Meehan et al. (1998) e proveniente de um isolado obtido por um veterinário atuante na Holanda. As demais sequências altamente semelhantes referem-se a isolados originários de países como Egito, Reino Unido e Cazaquistão (HOLDEN et al, 2009; TARTOR et al, 2020; USSENOVA et al, 2025). Dentre as sequências homólogas identificadas, nenhuma corresponde aos isolados coletados no Brasil disponíveis no banco de dados. A maior similaridade com isolados de outros continentes, em comparação àqueles coletados no Brasil, sugere que os isolados deste estudo, assim como os de outras pesquisas nacionais, possam ter origens distintas. Esse achado evidencia a

diversidade nas rotas de disseminação de *S. equi* possivelmente associada às diferentes populações equinas e destaca a necessidade de mais estudos regionais e nacionais para o monitoramento epidemiológico dessa importante bactéria.

No entanto, apesar das sequências homólogas encontradas, trata-se de um gene sujeito a alta pressão de diversificação, conforme demonstrado por Kelly et al. (2006), cujo estudo abordou a subtipificação dos alelos do gene da SeM com base nas sequências de DNA e nos aminoácidos expressos pelas diferentes sequências. Essa subtipificação permite a diferenciação entre isolados, sendo útil em situações de suspeita de infecção por isolados vacinais atenuados, além de possibilitar o monitoramento epidemiológico de surtos da doença. De acordo com os alelos já descritos na literatura mundial, os resultados desse trabalho revelaram a presença de dois alelos distintos nas sequências de DNA analisadas: os alelos 1 e 270. O alelo 1 do gene da SeM já foi identificado em outros 16 isolados provenientes de surtos na Holanda, Reino Unido e Irlanda, indicando uma ampla distribuição geográfica desse perfil genético em diferentes países europeus (JOLLEY et al, 2018). Esse alelo correspondente ao isolado utilizado na formulação da vacina viva atenuada *Equilis StrepE vaccine* (KELLY et al, 2006), porém essa vacina não é disponível comercialmente no Brasil. Até o momento do desenvolvimento do presente trabalho, não há registros desse alelo em isolados provenientes de outro continente, que não a Europa, no banco de dados do PubMLST. O alelo 270, por sua vez, foi associado, no mesmo banco, a apenas um isolado, sem informação sobre sua localização geográfica (JOLLEY et al, 2018).

A subtipificação dos alelos também foi realizada com base nas sequências preditas de aminoácidos. Nessa análise, foram identificados três alelos distintos entre os isolados : 1, 82 e 258. Alguns isolados, como A01 e A03, apresentaram correspondência simultânea com dois alelos diferentes. Tal ocorrência decorre do fato de que os alelos apresentam comprimentos diferentes, o que permite o alinhamento integral de sequências mais curtas com múltiplos alelos. A correspondência entre alelos determinados por sequências de DNA e aqueles inferidos a partir de sequências preditas de aminoácidos pode não ser exata devido à presença de mutações sinônimas. Essas mutações alteram o DNA sem modificar a sequência de aminoácidos da proteína resultante, devido à redundância do código genético (OELSCHLAEGGER, 2024).

A identificação de apenas três variantes do alelo da SeM entre os isolados analisados sugere uma homogeneidade genética nessa população, especialmente quando comparada ao estudo de Libardoni (2013), que encontrou 15 alelos distintos em 47 isolados. Uma possível explicação para essa menor diversidade é o fato de a população avaliada no presente estudo ser composta majoritariamente por cavalos da raça Mangalarga Marchador, concentrados em uma área geográfica relativamente restrita (raio de 235 km), o que pode favorecer a circulação de genótipos semelhantes. Por outro lado, Libardoni (2013) incluiu animais de três raças diferentes (Crioulo, Puro Sangue Inglês e Brasileiro de Hipismo) com distintas finalidades zootécnicas, padrões de manejo e maior movimentação entre regiões, além de ter realizado a coleta em uma área geográfica consideravelmente maior. Outro fator que pode ter contribuído para essa homogeneidade, somando-se a essa hipótese, é o número limitado de isolados avaliados neste estudo.

No dendrograma que inclui os isolados do presente estudo, as sequências descritas por Libardoni et al. (2012) e as sequências homólogas do GenBank (Figura 09), observou-se um agrupamento majoritariamente condizente com os percentuais de similaridade obtidos na análise comparativa com o GenBank. No entanto, algumas sequências homólogas que apresentaram mais de 98% de similaridade com os isolados do presente estudo agruparam-se mais próximas dos isolados descritas por Libardoni et al., apesar de estas apresentarem menor similaridade percentual. Essa aparente inconsistência é explicada pelo fato de que a análise filogenética se baseia em modelos evolutivos de máxima verossimilhança (Lefort et al., 2017), leva em consideração as substituições específicas em cada posição da sequência, e não apenas o percentual geral de identidade. Assim, mesmo pequenas diferenças em regiões altamente conservadas podem influenciar significativamente o agrupamento das sequências. O agrupamento discrepante entre os isolados do presente estudo e as de Libardoni et al. (2012) reforça, mais uma vez, a distinção entre os perfis genéticos do gene da SeM circulantes nas populações de equinos do Rio Grande do Sul e da região de Minas Gerais avaliada.

A análise dos isolados no presente estudo foi realizada com base no sequenciamento Sanger apenas do gene da SeM, o que limita a abrangência das inferências sobre diversidade genética. Embora o gene da SeM desempenhe papel central na virulência da bactéria e seja um marcador amplamente utilizado em estudos epidemiológicos, ele representa apenas uma

fração do genoma bacteriano. Análises baseadas em sequenciamento genômico completo (WGS), embora exijam investimentos significativamente mais altos, são ideais para uma avaliação mais precisa da diversidade genética em contextos acadêmicos.

No Brasil, as vacinas contra a adenite equina são produzidas por poucos laboratórios e utilizam apenas bactérias inteiras inativadas, o que reduz a variedade de formulações disponíveis em comparação com outros países. A baixa eficácia da resposta vacinal frente ao *S. equi* já foi previamente discutida, com taxas de imunização inferiores a 50% (TIMONEY, 1993). Essa baixa resposta tem sido atribuída à natureza da resposta imune induzida, com produção insuficiente de anticorpos circulantes e estimulação inadequada da imunidade mucosal (SWEENEY, 1993). Em estudo conduzido por Morais et al. (2005), a reatividade cruzada de vacinas comerciais frente a isolados de campo foi avaliada, demonstrando baixa capacidade de proteção. Em contraste, vacinas autógenas elaboradas a partir de isolados de campo demonstraram maior efetividade, o que corrobora a relevância da diversidade genética do gene da SeM como possível fator limitante da eficácia das vacinas comerciais. Nesse contexto, as vacinas autógenas surgem como estratégia promissora, sobretudo quando elaboradas a partir de isolados regionais, alinhando-se melhor ao perfil epidemiológico local (MORAIS et al, 2005). Assim, o conhecimento sobre a diversidade genética proporcionado pelos resultados possibilitará em projeto futuro o desenvolvimento de vacinas autógenas com isolados regionais para administração em equídeos da população presente na região, tornando mais efetivo o manejo sanitário da doença.

Quanto ao perfil de resistência dos isolados, todos apresentaram sensibilidade aos principais antibacterianos recomendados para o tratamento da adenite equina, incluindo penicilina (primeira escolha), ceftiofur (utilizado em casos mais graves), além de macrolídeos e sulfadiazina-trimetoprim. De modo geral, não há relatos consistentes de resistência emergente em isolados de *S. equi* (BOYLE et al., 2018). No entanto, a resistência observada à enrofloxacin em alguns isolados está de acordo com dados da literatura que apontam o aumento da resistência a esse antibacteriano entre espécies do gênero *Streptococcus* (JOHNS e ADAMS, 2015). O teste de resistência contra Imipenem, um carbapenêmico presente na lista de antimicrobianos criticamente importantes para a medicina humana (WHO, 2019) foi realizado pois há o aumento do uso de antibióticos dessa natureza na medicina veterinária e o

relato de sua resistência em bactérias infectando equinos (ALI et al, 2021). Apesar do aumento do uso de carbapenêmicos por proprietários e tratadores de equinos observado na rotina clínica geral do Hospital Veterinário de Grandes Animais da UFV, não houve resistência por parte dos isolados avaliados. Ressalta-se que o uso de antibacterianos em casos de *S. equi* ainda é tema de debate. As recomendações mais recentes preconizam o uso restrito a quadros com complicações, como púrpura hemorrágica, empiema de bolsa gutural, garrotilho bastardo ou linfadenomegalia com risco de obstrução respiratória (BOYLE et al., 2018). Portanto, na maioria dos casos, não há necessidade de tratamento além do manejo adequado da água, alimentação e ambiente. Pode-se hipotetizar que a baixa mortalidade e a apresentação clínica branda da doença contribuam para o uso reduzido de antibacterianos por parte dos criadores de equinos, resultando em menor pressão seletiva sobre a bactéria e, conseqüentemente, em taxas reduzidas de resistência.

8. CONCLUSÃO

A diversidade genética e proteica dos isolados avaliados apresentou pequena variação entre o grupo avaliado, com a formação de dois clados com maior proximidade genética, indicando a manutenção de genes da proteína *SeM* na população de bactérias estudada. Os isolados avaliados apresentaram maior homogeneidade entre si do que outras populações previamente estudadas no Brasil, que apresentaram grande diversidade dentro do mesmo grupo. Além disso, os isolados avaliados possuíram maior proximidade genética com isolados de outros continentes do que os avaliados previamente no Brasil. A técnica de MALDI-TOF se apresenta como uma alternativa eficaz para a identificação de subespécies de *Streptococcus*, oferecendo resultados precisos e mais rápidos em comparação ao PCR, método mais empregado atualmente. Adicionalmente, os isolados avaliados demonstraram ampla sensibilidade aos principais antibacterianos utilizados na rotina clínica equina, apesar de haver resistência de alguns isolados à Enrofloxacina.

9. DIREÇÕES FUTURAS

Para uma melhor compreensão da diversidade genética dos isolados de *S. equi* em Minas Gerais, são necessários estudos com um número maior de isolados, além da análise do genoma bacteriano completo. Essas abordagens contribuirão para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes e protocolos de biossegurança ajustados à realidade local. Além disso, a avaliação dos sinais clínicos associados à infecção pelos distintos isolados também será importante para o melhor entendimento do potencial de virulência de determinados isolados em detrimento de outros de acordo com os genes circulantes em cada população, favorecendo grande aplicabilidade clínica para o atendimento dos equídeos da região.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, Hossam Elsheikh et al. Nocardioform placentitis: a continuing question. **AAEP Proceedings**. 2021.
- BOYLE, Ashley G. et al. Optimization of an in vitro assay to detect *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 3-4, p. 406-410, 2012.
- BOYLE, A. G. Strangles and its complications. **Equine Veterinary Education**, v. 29, n. 3, p. 149-157, 2017.
- BOYLE, A. G. et al. Streptococcus equi infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles—revised consensus statement. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 32, n. 2, p. 633-647, 2018.
- BOYLE, Ashley G. Streptococcus equi Subspecies equi. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 39, n. 1, p. 115-131, 2023.
- BOSCHWITZ, Jeffrey S.; TIMONEY, John F. Inhibition of C3 deposition on *Streptococcus equi* subsp. *equi* by M protein: a mechanism for survival in equine blood. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 8, p. 3515-3520, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013**. Altera a lista de doenças passíveis de medidas de defesa sanitária animal e estabelece a notificação obrigatória dessas doenças ao serviço veterinário oficial. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 25 set. 2013.

CHANTER, Neil et al. Streptococcus equi with truncated M-proteins isolated from outwardly healthy horses. *Microbiology*, v. 146, n. 6, p. 1361-1369, 2000.

CHHABRA, Dharvi et al. Strangles in equines: an overview. *Microbial pathogenesis*, v. 178, p. 106070, 2023.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 33rd ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI, 2023.

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 13.0, 2023. Disponível em: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Acesso em: 17 abr. 2025.

FARROW, J. A. E.; COLLINS, M. D. Taxonomic studies on streptococci of serological groups C, G and L and possibly related taxa. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 5, p. 483-493, 1984.

FONSECA, Joana D. et al. Antibiotic resistance in bacteria associated with equine respiratory disease in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 187, n. 5, p. 189-189, 2020.

GRANT, S. T.; EFSTRATIOU, A.; CHANTER, N. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. **Veterinary Record**, v. 133, p. 215-216, 1993.

GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>. Acesso em: 9 abr. 2025.

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

HARRINGTON, Dean J.; SUTCLIFFE, Iain C.; CHANTER, Neil. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p. 501-510, 2002.

HARRIS, S. R.; ROBINSON, C.; STEWARD, K. F.; WEBB, K. S.; PAILLOT, R.; PARKHILL, J.; HOLDEN, M. T. & WALLER, A. S. Genome specialization and decay of the strangles pathogen, *Streptococcus equi*, is driven by persistent infection. **Genome Research**, v. 25, p. 1360-1371, 2015.

HOLDEN, M. T. et al. Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 5, p. e1000346, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agropecuária: Equinos. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br>. Acesso em: 28 jul. 2024.

INTERNATIONAL COLLATING CENTRE. Equine surveillance. Disponível em: <https://equinesurveillance.org/iccview/>. Acesso em: 25 out. 2024.

JARAMILLO-MORALES, Camilo et al. *Streptococcus equi* culture prevalence, associated risk factors and antimicrobial susceptibility in a horse population from Colombia. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 111, p. 103890, 2022.

JAVED, R. et al. Molecular characterization of virulence genes of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in equines. **Veterinary World**, v. 9, n. 8, p. 875, 2016.

JOHNS, I. C.; ADAMS, E.-L. Trends in antimicrobial resistance in equine bacterial isolates: 1999–2012. **Veterinary Record**, v. 176, n. 13, p. 334-334, 2015.

JOLLEY, K. A.; BRAY, J. E.; MAIDEN, M. C. J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. **Wellcome Open Research**, v. 3, p. 124, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>. Acesso em: 9 abr. 2025.

KELLY, Charlotte et al. Sequence variation of the SeM gene of *Streptococcus equi* allows discrimination of the source of strangles outbreaks. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 2, p. 480-486, 2006.

KUDIRKIENE, Egle et al. Rapid and accurate identification of *Streptococcus equi* subspecies by MALDI-TOF MS. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 38, n. 5, p. 315-322, 2015.

KUWAMOTO, Yasushi; ANZAI, Toru; WADA, Ryuichi. Microplate sugar-fermentation assay distinguishes *Streptococcus equi* from other streptococci of Lancefield's group C. **Journal of equine science**, v. 12, n. 2, p. 47-49, 2001.

LE, S. Q.; GASCUEL, O. An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, v. 25, n. 7, p. 1307–1320, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>. Acesso em: 9 abr. 2025.

LEE, Hayoung et al. *Streptococcus equi*-derived extracellular vesicles as a vaccine candidate against *Streptococcus equi* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 259, p. 109165, 2021.

LEFORT, V.; LONGUEVILLE, J. E.; GASCUEL, O. SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution*, v. 34, n. 9, p. 2422–2424, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>. Acesso em: 9 abr. 2025.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, v. 52, n. W1, p. W78–W82, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>. Acesso em: 9 abr. 2025.

LI, Dandan et al. MALDI-TOF mass spectrometry in clinical analysis and research. *ACS measurement science au*, v. 2, n. 5, p. 385-404, 2022.

LIBARDONI, Felipe et al. Diversity of seM in *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from strangles outbreaks. **Veterinary microbiology**, v. 162, n. 2-4, p. 663-669, 2013.

LIBARDONI, Felipe et al. Prevalence of *Streptococcus equi* subsp. *equi* in horses and associated risk factors in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Research in Veterinary Science*, v. 104, p. 53-57, 2016.

LINDAHL, S. et al. Comparison of sampling sites and laboratory diagnostic tests for *S. equi* subsp. *equi* in horses from confirmed strangles outbreaks. ***Journal of Veterinary Internal Medicine***, v. 27, n. 3, p. 542-547, 2013.

MANI, Rinosh J.; THACHIL, Anil J.; RAMACHANDRAN, Akhilesh. Discrimination of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. ***Journal of Veterinary Diagnostic Investigation***, v. 29, n. 5, p. 622-627, 2017.

MITCHELL, Catriona et al. Globetrotting strangles: the unbridled national and international transmission of *Streptococcus equi* between horses. ***Microbial genomics***, v. 7, n. 3, p. 000528, 2021.

MEEHAN, Mary; NOWLAN, Peter; OWEN, Peter. Affinity purification and characterization of a fibrinogen-binding protein complex which protects mice against lethal challenge with *Streptococcus equi* subsp. *equi*. *Microbiology*, v. 144, n. 4, p. 993-1003, 1998.

MORAES, Carina Martins de. **Caracterização fenotípica e estimativa da reatividade cruzada de cepas de *Streptococcus equi* isoladas de equinos da região Sul do Rio Grande do Sul**. 2005. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

MORRIS, Ellen Ruth A. et al. Comparison of whole genome sequences of *Streptococcus equi* subsp. *equi* from an outbreak in Texas with isolates from within the region, Kentucky, USA, and other countries. ***Veterinary microbiology***, v. 243, p. 108638, 2020.

NEWTON, J. R. *et al.* Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*. *Veterinary Record*, Londres, v. 140, p. 84-90, 1997.

NEWTON, Richard; WALLER, Andrew; KING, Alasdair. Investigation of suspected adverse reactions following strangles vaccination in horses. ***The Veterinary Record***, v. 156, n. 9, p. 291, 2005.

OELSCHLAEGER, Peter. Molecular mechanisms and the significance of synonymous mutations. **Biomolecules**, v. 14, n. 1, p. 132, 2024.

POPESCU, Gabriel-Adrian; FUEREA, Raluca; BENEA, Elisabeta. Meningitis due to an unusual human pathogen: *Streptococcus equi* subspecies *equi*. **Southern Medical Journal**, v. 99, n. 2, p. 190-191, 2006

RAMEY, D. Does early antibiotic use in horses with 'strangles' cause metastatic *Streptococcus equi* bacterial infections?. *Equine Veterinary Education*, v. 19, n. 1, p. 14-15, 2007.

RUFFUS, J. **De medicina equorum**. 1251. Disponível em: <http://wellcomelibrary.org/player/b19689755>. Acesso em: 25 out. 2024.

SCHUTZ, J. W. The *Streptococcus* of strangles. **The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 1, p. 191-208, 1888.

SINGHAL, Neelja et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 791, 2015.

SOLLEYSSEL, J. **Le parfait maréchal**. Paris: Gervais Clousier, 1664.

SWEENEY, C.R. *Streptococcus equi*. In: SMITH, B.P. *Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais*. Editora Manole LTDA, São Paulo, p.531-533, 1993.

TARTOR, Yasmine H. et al. Novel *Streptococcus equi* strains causing strangles outbreaks in Arabian horses in Egypt. *Transboundary and emerging diseases*, v. 67, n. 6, p. 2455-2466, 2020.

TIMONEY, J.F.; MUKHATAR, M.M. The protective M proteins of the equine group C streptococci. *Veterinary Microbiology* n. 37, p. 389-395, 1993.

TIMONEY, John F.; ARTIUSHIN, Sergey C.; BOSCHWITZ, Jeffrey S. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-like proteins SeM and SzPSe. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3600-3605, 1997.

TIMONEY, John. The pathogenic equine streptococci. **Veterinary Research**, v. 35, n. 4, p. 397-409, 2004. DOI: 10.1051/vetres:2004025.

USSENOVA, Zhanerke et al. International Journal of Veterinary Science. Int J Vet Sci, v. 14, n. 1, p. 146-153, 2025.

WALLER, Andrew S. New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 30, n. 3, p. 591-607, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2019 WHO AWaRe Classification Database of Antibiotics for evaluation and monitoring of use. Geneva: WHO, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHOEMPIAU2019.11>. Acesso em: 12 jun. 2025.

11. MATERIAL SUPLEMENTAR

Material suplementar presente no drive:

[Material Suplementar](#)