

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS**



**DETECCION DE *Streptococcus suis* EN LECHONES DE DISTINTAS  
EIDADES EN EXPLOTACIONES PORCINAS DE TIPO INTENSIVO**

**LINA MARIA PEREZ JUNCO**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar al título de**

**MAGISTER EN CIENCIAS BIOLOGICAS**

**Bogotá, D.C.  
2010**

**DETECCION DE *Streptococcus suis* EN LECHONES DE DISTINTAS  
EIDADES EN EXPLOTACIONES PORCINAS DE TIPO INTENSIVO**

**LINA MARIA PEREZ JUNCO**

**JOSÉ DARÍO MOGOLLÓN. DMV, MS, Ph.D  
DIRECTOR**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Bogotá, D.C.**

**2010**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**DETECCION DE *Streptococcus suis* EN LECHONES DE DISTINTAS  
EDADES EN EXPLOTACIONES PORCINAS DE TIPO INTENSIVO**

**LINA MARIA PEREZ JUNCO**

**APROBADO**

---

**José Darío Mogollón. MS, Ph.D**  
**Médico Veterinario**  
**Director**

---

**María Antonia Rincón MSc Ph.D (c)**  
**Médico Veterinario**  
**Jurado**

---

**Fernando Ariza Ph.D**  
**Médico Veterinario**  
**Jurado**

---

**Hugo Diez MSc Ph.D**  
**Bacteriólogo**  
**Jurado**

**DETECCION DE *Streptococcus suis* EN LECHONES DE DISTINTAS  
EDADES EN EXPLOTACIONES PORCINAS DE TIPO INTENSIVO**

**LINA MARIA PEREZ JUNCO**

**APROBADO**

---

**Ingrid Schuler, Ph.D**  
**Decana Académica**

---

**Manuel Antonio Franco MD Ph.D**  
**Director de Posgrado**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, a mi familia por su formación y apoyo.

Al Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario del I.C.A, en especial al personal profesional y técnico de los Laboratorios de Biología Molecular, Medicina Porcina y Bacteriología, por su valiosa colaboración en la realización de este estudio.

A la Pontificia Universidad Javeriana, por haberme formado a nivel académico y espiritual.

Por otra parte, quiero agradecer a mi director de tesis al Dr. José Dario Mogollón por su paciencia, apoyo y orientación.

Igualmente quiero extender mi agradecimiento al Dr. Ricardo Piñeros por su colaboración.

Y a Dios por su voluntad de que este estudio llegara a buen término.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION .....	1
JUSTIFICACION.....	5
CAPITULO 1 .....	10
1. REVISION DE LITERATURA .....	10
1.1. Streptococcus suis.....	11
1.1.1 Historia.....	11
1.1.2 Etiología .....	12
1.1.2.1 Características generales de <i>Streptococcus suis</i> .....	12
1.1.3 Factores de virulencia.....	16
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	22
1.3 PATOGENIA.....	25
1.4 MANIFESTACIONES CLINICAS Y LESIONES .....	31
1.5 DIAGNOSTICO .....	33
1.5.1 Métodos bacteriológicos.....	33
1.5.2 Métodos serológicos.....	35
1.5.3 Diagnóstico molecular .....	37
1.6 ERIC- PCR: Secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias .....	40
1.7 INFECCION EN HUMANOS .....	43
1.7.1 Síntomas clínicos.....	43
1.7.2 Epidemiología.....	44
1.8 TRATAMIENTO Y PREVENCION.....	45
2. OBJETIVOS .....	52
3. RESULTADOS .....	53
CAPITULO 2.....	53
Desarrollo y evaluación de la técnica de PCR múltiple y ERIC-PCR para la detección y genotipificación de <i>Streptococcus suis</i> y <i>S. suis</i> serotipo 2 .....	53
CAPITULO 3.....	68

Detección de <i>Streptococcus suis</i> en una explotación porcina de tipo intensivo por medio de técnicas moleculares.....	68
4. DISCUSION .....	80
5. CONCLUSIONES.....	92
6. RECOMENDACIONES .....	94
BIBLIOGRAFIA.....	95
ANEXOS .....	110



## INDICE DE TABLAS

Pág.

- Pg. 36**    **Tabla 1.** Efecto de la temperatura y desinfectantes sobre la supervivencia de *S. suis*.
- Pg. 46**    **Tabla 2.** Perfiles bioquímicos de *S. suis*.

## INDICE DE FIGURAS

Pág.

- Pg. 27**    **Figura 1.** Diagramas circulares y comparación *in silico* de dos genomas de *S. suis*.
- Pg. 43**    **Figura 2.** Patogénesis de la meningitis causada por *S. suis*.

## INDICE DE ANEXOS

Pág.

- Pg. 104**    **Anexo 1.** Análisis bioinformático de los primers usados en el estudio.

## RESUMEN

*Streptococcus suis* es un agente patógeno importante en cerdos. Causa una serie de procesos patológicos que han adquirido gran importancia en la producción porcina; esta bacteria también puede ser aislada a partir del tracto respiratorio superior de cerdos clínicamente sanos. Para la vigilancia y control de esta enfermedad se requiere de métodos de identificación y caracterización adecuados, que puedan ser útiles para establecer relaciones de similitud entre las cepas aisladas y detectar así, el origen de los brotes epidémicos, permitiendo realizar un seguimiento comparable dentro y entre granjas. En la primera parte de este trabajo se desarrollaron y evaluaron dos técnicas moleculares para la detección y genotipificación de *Streptococcus suis* en cerdos. La PCR múltiple está basada en la amplificación de un fragmento del gen que codifica para el 16S rRNA de *S. suis* y en la amplificación del gen *cps2J* de *S. suis* serotipo 2 y 1/2. La ERIC-PCR es una técnica de tipificación molecular basada en la detección de secuencias intergénicas consenso repetitivas de Enterobacterias (ERIC).

En la segunda parte se realizó un estudio piloto donde se buscó demostrar la presencia de *S. suis* en una granja porcina comercial mediante la aplicación de las técnicas de PCR múltiple, ERIC-PCR y cultivo bacteriológico de muestras tomadas a partir de cerdas y lechones clínicamente sanos. En total se evaluaron 200 muestras. El 62.5% de las muestras fueron positivas por PCR para *S. suis*. No se obtuvo ningún aislamiento de *S. suis* por lo tanto no fue posible realizar la caracterización molecular mediante ERIC-PCR. Estos resultados muestran que la PCR es un método más sensible que el cultivo bacteriológico y que es una herramienta útil para detectar animales portadores en una explotación. Las dos técnicas moleculares desarrolladas son herramientas útiles para la identificación y caracterización de cepas de *S. suis* en diagnóstico y en estudios epidemiológicos, facilitando el diseño e implementación de programas de control y erradicación.

## ABSTRACT

*Streptococcus suis* is an important pathogen in pigs. It causes a number of pathological processes that have become important in swine production; this bacteria can also be isolated from the upper respiratory tract of clinically healthy piglets. For surveillance and disease control appropriate identification and characterization methods are required, which may be useful to establish relations of similarity between strains and thus demonstrate the origin of disease outbreaks, which allow to carry out comparable studies within and between farms. In the first part of this work were developed and evaluated two molecular techniques for detection and genotyping of *Streptococcus suis* in pigs. The multiplex PCR is based on the amplification of a fragment of the gene coding for 16S rRNA of *S. suis* and on the amplification of the *cps2J* gene of *S. suis* serotypes 2 and ½. The ERIC-PCR is a molecular typing technique based on the detection of repetitive intergenic sequences of Enterobacteriaceae consensus (ERIC).

In the second part a preliminary study was accomplished which aimed to demonstrate the presence of *S. suis* in a commercial pig farm by applying the techniques of multiplex PCR, ERIC-PCR and bacteriological culture of samples taken from clinically healthy sows and piglets . A total 200 samples were evaluated. The 62.5% of the samples were positive by PCR for *S. suis*. None isolated *S. suis* was obtained, therefore it was not possible to perform the molecular characterization by ERIC-PCR. These results show that PCR is more sensitive than bacterial culture and is a useful tool for detecting carrier animals in a swine farm. These two molecular techniques developed are useful tools for the identification and characterization of strains of *S. suis* in diagnosis and epidemiological studies, facilitating the design and implementation of control and preventing programs.

## INTRODUCCION

Las infecciones causadas por *Streptococcus suis* han adquirido en los últimos años una gran importancia para las explotaciones porcinas de tipo intensivo. Estos procesos patológicos se pueden presentar bajo numerosas formas clínicas como: septicemia, meningitis, artritis, procesos neumónicos e incluso muerte súbita, con tasas de morbilidad relativamente bajas o moderadas si se consideran aisladamente, pero que al estar presentes en forma simultánea en la mayoría de las explotaciones porcinas, pueden determinar unas pérdidas económicas relevantes en su conjunto.

Según los antígenos presentes en la cápsula de *S. suis*, se pueden diferenciar hasta 33 serotipos , siendo el serotipo 2 el más frecuentemente aislado, sin que se deba descartar la importancia de otros serotipos, al haberse comprobado una amplia diversificación genética según los países y regiones. Desde un punto de vista epidemiológico, una de las características fundamentales de los estreptococos, y más concretamente de *S. suis*, es su localización en tonsilas y cavidad nasal de los cerdos, que podrían actuar como reservorios de la enfermedad en calidad de portadores. Así pues, el reconocimiento de estos portadores resultaría de gran importancia para establecer programas de control.

Algunas características de *S. suis*, como su ubicuidad y diversidad de serotipos, así como los numerosos e importantes vacíos existentes en el conocimiento de su epidemiología y patogenicidad, han condicionado sin duda que las medidas correctivas y de control aplicadas contra la enfermedad no hayan sido totalmente satisfactorias.

La importancia económica que supone la presencia de *S. suis* en las explotaciones porcinas, junto con su relevancia sanitaria, hacen que un estudio en profundidad de aspectos que puedan estar relacionados con su transmisión, la interacción agente infeccioso-hospedador y los factores de

virulencia, sean objetivos prioritarios en los trabajos actuales de investigación a nivel mundial.

Las cepas de *Streptococcus suis* serotipo 2 en lechones constituyen una causa importante de pérdidas económicas para los productores. El *S. suis* tipo 2 es el serotipo más virulento y está asociado con meningitis, artritis, septicemia y neumonía en lechones de 2 a 12 semanas de edad, además constituye un serio riesgo para la salud humana.

La identificación del *S. suis* se basa en rasgos fenotípicos, tales como morfología, pruebas bioquímicas y serológicas a partir de muestras obtenidas de tonsilas, pulmón e incluso cerebro de animales afectados, de donde es posible aislar cepas de diferente grado de virulencia, las cuales no se pueden diferenciar entre sí por los métodos tradicionales.

El éxito de los programas de vigilancia y control de esta enfermedad depende, entre otras medidas, de la identificación, caracterización, posible rastreo y seguimiento en campo de las fuentes de diseminación de esta bacteria. Debido a esto se ha intensificado la necesidad de contar con métodos rápidos y precisos capaces de efectuar estos estudios.

En este sentido, las técnicas de biología molecular permiten una caracterización más profunda de las variantes y una evaluación más precisa del grado de parentesco que la que se obtiene a partir de técnicas serológicas o bacteriológicas. Estas comparaciones entre cepas dentro o entre granjas conforman la base para estudios de epidemiología molecular los cuales permiten, inclusive revelar posibles patrones de evolución de los diferentes serotipos así como el origen de cepas responsables por brotes recientes.

En los últimos años, el uso de técnicas moleculares como la huella genómica, han demostrado ser métodos valiosos en estudios epidemiológicos, puesto que han permitido identificar cepas dentro de un mismo serotipo. Además, permitieron establecer la relación clonal de

microorganismos aislados en diferentes períodos de tiempo o diferentes regiones geográficas.

El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre varios aislados de una misma especie. Esta información es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multirresistentes, porque permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva.

La aplicación de técnicas moleculares en epidemiología ha contribuido a un mejor conocimiento de la organización clonal de las poblaciones bacterianas y, por consiguiente, permite un mejor seguimiento de las epidemias. La amplificación de secuencias ERIC (secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias) mediante PCR (ERIC-PCR) es una técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias gramnegativas y grampositivas. Los patrones de ADN que se obtienen con la ERIC-PCR suelen ser menos complejos que los generados mediante otras técnicas. La técnica de ERIC-PCR se caracteriza por su simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 h) y su relativo bajo costo.

Debido a lo anterior, el propósito de este estudio es aislar, detectar y genotipificar cepas de *Streptococcus suis* serotipo 2 a partir de muestras provenientes de animales clínicamente sanos de granjas porcinas intensivas, mediante el desarrollo y aplicación de las técnicas de PCR múltiple, ERIC-PCR y cultivo bacteriológico para detectar animales portadores y lograr caracterizar cepas virulentas de *S. suis* serotipo 2 presentes dentro de una granja; y así establecer las posibles relaciones epidemiológicas entre diferentes aislamientos.

Aplicando esta metodología se espera obtener datos útiles e importantes para el estudio de la historia natural de la enfermedad causada por *Streptococcus suis* en nuestro medio.

Adicionalmente, la información generada puede ser de importancia para complementar estudios sobre diseños de vacunas de nueva generación. El uso coordinado de información antigénica, genética y epidemiológica permite obtener un mejor sistema de evaluación de riesgo y endemismo de la patología ocasionada por *Streptococcus suis*, posibilitando analizar la extensión de los cambios y eventualmente evaluar la inmunogenicidad de las cepas utilizadas en la formulación de vacunas, representando una importante contribución al establecimiento de mejores estrategias para la vigilancia y el control de la enfermedad causada por *Streptococcus suis*.

## JUSTIFICACION

*Streptococcus suis* es un patógeno importante para la industria porcina, es agente causal de meningitis, septicemia, artritis y muerte súbita de cerdos jóvenes. Además, *Streptococcus suis* puede aislarse a partir de cerdos sanos, los cuales actúan como fuente de transmisión dentro de las granjas.

Esta bacteria es también un agente zoonótico responsable de meningitis, septicemia, artritis y endocarditis en seres humanos. La mayoría de los casos reportados han implicado individuos que han tenido exposición ocupacional a cerdos infectados como: veterinarios, trabajadores de plantas de beneficio y productores.

Se han identificado 35 serotipos capsulares de *S. suis* (tipos 1/2 y del 1 al 34). Los serotipos 2, 1/2, 9, 7 y 3 son usualmente aislados de cerdos muertos o enfermos, principalmente a partir de casos de meningitis, artritis y septicemia. Aunque el serotipo 2 es considerado como el serotipo más virulento y por lo tanto es el tipo que presenta la más alta prevalencia en la mayoría de los países.

Debido a la falta de suficiente conocimiento sobre la epidemiología de la enfermedad y a la falta de bacterinas efectivas y técnicas diagnósticas sensibles, se ha hecho difícil implementar un programa de prevención y control de la enfermedad causada por *Streptococcus suis*. La diversidad serotípica y genotípica que presenta esta bacteria dificulta la elaboración de una vacuna polivalente que sea eficiente en la prevención de los cuadros clínicos de enfermedad.

Esta bacteria al ser un colonizador temprano de los lechones en lactancia, no se elimina por la práctica del destete precoz. Por tanto, en granjas con un alto status sanitario, donde se ha reducido o eliminado otras infecciones en base a esta práctica (generalmente producidas por bacterias o



virus "colonizadores tardíos"), pueden producir enfermedad con variadas pérdidas, que en general son proporcionales a la existencia de factores de manejo adversos como: densidad poblacional por encima de la estándar para las diversas categorías, inadecuada temperatura, humedad o ventilación, imbalances nutricionales, etc.

La mayoría de los cerdos son portadores inaparentes de múltiples serotipos de *Streptococcus suis* en el tracto respiratorio superior y las hembras pueden albergar diferentes serotipos en su mucosa vaginal. Los animales portadores asintomáticos por lo tanto representan una fuente potencial de infección para otros cerdos dentro de una explotación o para los seres humanos.

Debido a su gran variación antigénica, no se ha desarrollado una prueba serológica para el diagnóstico de portadores inaparentes. Por otra parte sería contraindicado, debido a que gran parte de los animales son portadores inaparentes de serotipos no patógenos. Por tanto la prueba tendría que ser muy específica para serotipos y aún genotipos relacionados a virulencia, lo que por el momento no ha sido alcanzado.

Según el último informe técnico del ICA de Información y Vigilancia Epidemiológica (Colombia Sanidad Animal 2006), durante el año 2006 las pérdidas económicas ocasionadas por mortalidad de animales como consecuencia de las enfermedades notificables bajo programas de control oficial y otras condiciones patológicas registradas, se estimaron en \$3.439.321.504, de los cuales el 7% correspondió a la especie porcina, es decir, \$240.752.505. Según este informe, 190 cerdos murieron en el transcurso del año 2006 debido a estreptococosis por un valor total de \$42.801.490. No obstante, revelan una aparente subnotificación o diagnóstico del número de casos reales que mueren en el campo.

Lo anterior, muestra el impacto que presenta la enfermedad causada por *S suis* en el país. Desafortunadamente, hasta el momento se cuenta con poca información sobre la epidemiología de esta enfermedad y no se le ha

dado la suficiente importancia y atención que merece esta patología que afecta al cerdo en todas las etapas de producción.

Las cepas de *S. suis* son identificadas y clasificadas usualmente por sus características morfológicas, bioquímicas y serológicas. La clasificación serológica está basada en la presencia de polisacáridos antigénicos específicos; estos métodos de tipificación serológica son muy laboriosos y consumen mucho tiempo y pueden realizarse sólo con colonias aisladas. La tipificación se realiza mediante diferentes tipos de pruebas de aglutinación. En estas pruebas, colonias de *S. suis* aisladas y bioquímicamente caracterizadas se aglutinan con un panel de 35 antisueros policlonales.

Esta bacteria puede ser aislada a partir de muestras tonsilares por técnicas microbiológicas tradicionales; sin embargo, las tonsilas pueden ser también colonizadas por cepas no virulentas de *Streptococcus suis* y otras especies estreptococales, las cuales son difíciles de distinguir según la morfología de sus colonias. Debido a esto otras técnicas han sido desarrolladas como el aislamiento serotipo-específico utilizando medios selectivos y diferenciales y técnicas de separación inmunomagnética, pero estos métodos son bastante laboriosos, consumen mucho tiempo y tienen baja sensibilidad.

Otro inconveniente que existe al momento de diagnosticar una enfermedad causada por *S. suis*, es que muchas veces las lesiones histopatológicas no sugieren resultados contundentes y se puede confundir con otras patologías ocasionadas por otros agentes, como el virus de la Peste Porcina Clásica, el virus de Aujeszky y *Haemophilus parasuis*, los cuales producen una sintomatología nerviosa similar al de *S. suis*. Adicionalmente, en muchos casos no se obtiene un aislamiento exitoso de la bacteria, debido a que las muestras que ingresan al laboratorio provienen de animales que han sido anteriormente medicados; lo que en últimas dificulta un diagnóstico definitivo.

Actualmente, existen técnicas bacteriológicas rutinarias para detectar *S. suis*, sin embargo comparada con estos métodos bacteriológicos, la prueba de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) es mucho más rápida y sensible. En este momento, el diagnóstico de esta enfermedad en el país se lleva a cabo básicamente por sintomatología clínica, lesiones y métodos bacteriológicos e histopatología. No obstante, hasta el presente en el país se han realizado pocos estudios sobre la epidemiología y dinámica de la enfermedad en campo.

Todo esto hace urgente un mayor esfuerzo en la optimización y regularización de la manipulación de los animales en este sector de la industria; pero además, se requiere un mayor interés en la investigación que tenga como finalidad un mejor conocimiento de esta infección así como la obtención de vacunas y medicamentos eficaces en su control.

Por lo anterior, se hace necesario implementar otro tipo de herramientas capaces de dar resultados más rápidos, precisos y específicos como lo son las técnicas moleculares, las cuales detectan el ADN bacteriano, evitando muchos de los inconvenientes anteriormente mencionados.

La epidemiología molecular permite reconocer características genéticas de las bacterias no reveladas por las técnicas de laboratorio convencionales. En las últimas décadas, las ciencias básicas lograron un importante desarrollo tecnológico que ha posibilitado esa epidemiología molecular. Esta ha proporcionado una nueva visión, no adquirida por las técnicas fenotípicas, sobre las características biológicas de *Streptococcus suis* y su comportamiento dinámico.

Por esta razón, este trabajo busca desarrollar y aplicar técnicas moleculares con el fin de detectar animales portadores y determinar la relación clonal que existe entre diferentes aislamientos correspondientes a *Streptococcus suis* serotipo 2, mediante el análisis de huellas genómicas generadas por la técnica de ERIC – PCR . Como se mencionó anteriormente el serotipo 2 es el serotipo más virulento, de todos los serotipos, éste es el

que presenta mayor prevalencia en todos los países y se ha encontrado con mayor frecuencia asociado a brotes ocurridos en las explotaciones porcinas de todo el mundo.

En general, el análisis de estas huellas genómicas ayudan a distinguir aislamientos individuales de *S. suis*, establecer el origen de la infección en una piara determinada, monitorear la cinética de un brote, asegurar que la cepa correcta este incluida en una vacuna y a demostrar la diversidad o variabilidad genética que existe entre cepas de *S. suis*, aún perteneciendo a un mismo serotipo.

En conclusión, el desarrollo y aplicación de este tipo de técnicas moleculares dentro de estudios epidemiológicos daría finalmente una aproximación de la situación actual en Colombia de esta enfermedad causada por *Streptococcus suis*.

## **CAPITULO 1**

### **1. REVISION DE LITERATURA**

## 1.1. *Streptococcus suis*

### 1.1.1 Historia

Nuevos estreptococos alfa-hemolíticos a partir de infecciones septicémicas en cerdos fueron primero caracterizados bioquímicamente y serológicamente por de Moor entre 1956 y 1963 como nuevos grupos Lancefield R, S, RS, y T (37). En Inglaterra, Elliot en 1966 sugirió que el grupo S de de Moor era similar a su *Streptococcus* PM y que ambos pertenecían al grupo D de Lancefield; él propuso el nombre de *Streptococcus suis* tipo capsular 1 (43). En 1975, Windsor y Elliot aislaron otro estreptococo porcino el cual correspondió al grupo R de de Moor y fue nombrado *S. suis* tipo 2 (139).

El tipo 1 fue asociado con meningitis en lechones, mientras que el tipo 2 estaba relacionado con procesos patológicos a lo largo de toda la vida productiva del cerdo. Aislamientos reaccionantes con los antisueros tipo 1 y 2 fueron catalogados como tipo capsular ½ (originalmente grupo RS). Aislamientos de estreptococos pertenecientes al grupo T obtenidos a partir de hisopos tonsilares, vaginales y prepuciales fueron reportados por Clifton-Hadley en 1984 (32). La cepa de referencia del grupo T fue designada como *S. suis* tipo capsular 15 en 1989 (53).

Entre 1983 y 1995 se describieron los restantes 32 serotipos (65, 97). La mayoría de estas cepas de referencia son originadas de cerdos enfermos; el tipo capsular 14 fue un aislamiento humano, los tipos capsulares 17, 18, 19 y 21 fueron aislados de cerdos clínicamente sanos, los tipos capsulares 20 y 31 fueron obtenidos de terneros y el tipo 33 de un cordero enfermo (53,65).

La determinación oficial de *S. suis* como una nueva especie bacteriana se realizó en el año de 1987 por Kilpper-Balz y Schleifer. Esta especie reveló ser genéticamente distinta y no mostró relación alguna con otras especies estreptococales examinadas (14).

La diversidad genética entre miembros de la especie de *S. suis* es importante y debería tenerse en cuenta en el diagnóstico, vigilancia y control de la enfermedad.

Reportes iniciales de infecciones de *S. suis* fueron publicados por Jansen y Van Dorssen en Los Países Bajos en 1951 y por Field y colaboradores en 1954 en Inglaterra (71,45). Desde entonces, *S. suis* ha sido reportado en todos los países donde la industria porcina es importante y por más de una década, infecciones asociadas con este microorganismo han sido observadas en explotaciones porcinas intensivas tradicionales y modernas.

## **1.1.2 Etiología**

### **1.1.2.1 Características generales de *Streptococcus suis*.**

*S. suis* es una bacteria Gram-positiva perteneciente a la familia *Streptococcaceae*, es anaerobia facultativa, inmóvil, cocoide u ovoide y se observa como células individuales, en pares o en cadenas (54). De acuerdo con los polisacáridos capsulares, 35 serotipos han sido identificados (tipos 1–34 y el 1/2) (53,65). Pero se ha demostrado que los serotipos 32 y 34 son *Streptococcus orisratti* (68). En la actualidad se clasifica taxonómicamente según el Bergey's Manual of determinative Bacteriology de 1994 dentro del grupo 17 que incluye los cocos gram positivos no formadores de endosporas donde se establecen tres géneros *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Lactococcus*, quedando así estos géneros separados mediante estudios basados en la homología del ADN (121).

Desde el punto de vista serológico se admite la clasificación propuesta por Lancefield en 1933 basada en los antígenos de naturaleza polisacáridica presente en la pared celular denominado “poliósido C” o “sustancia C”, reconociéndose en la actualidad hasta un total de 24 serogrupos distintos denominados de la A a la H y de la K a la Z. La especie *S.suis* está incluida

en los grupos R,S,T y D de Lancefield, siendo el serogrupo R el más frecuente (55.8%), resulta muy representativo para la mayoría de los investigadores el serogrupo D (28%) y también puede reaccionar frente a los grupos S (3.6%) y T (11.7%) pero siempre con frecuencias de presentación inferiores (121).

Se ha podido comprobar a lo largo de todos los estudios realizados como el serotipo 2 es el más frecuentemente implicado tanto en procesos clínicos en cerdos como en portadores tonsilares, representando aproximadamente el 60% de los aislamientos y puede estar relacionado con todas las formas clínicas descritas. Además de estar comúnmente asociado a enfermedades en cerdos también lo está en seres humanos y es el serotipo reportado con mayor frecuencia en todo el mundo (35,141). A excepción de dos casos de infecciones humanas con *S. suis* causados por el tipo 1 y un caso de septicemia causado por el tipo 14, todas las otras infecciones en humanos de *S. suis* se atribuyen al tipo 2 (76,138).

Sin embargo, se debe tener en cuenta que existen otros serotipos que tienen también una importante representación en granjas porcinas como los serotipos 1, 1/2, 3,8,9,14 y 15 dentro de los más significativos (121).

El hábitat natural de *S. suis* es el tracto respiratorio superior, particularmente las tonsilas y cavidades nasales, así como el tracto genital y digestivo de los cerdos (55,103). *S. suis* tipo 2 coloniza las tonsilas palatinas de cerdos clínicamente enfermos y aparentemente sanos, y se transmite usualmente vía nasal u oral (8). Los portadores de *S. suis* son fuente de infección para otros cerdos y juegan un papel importante en la transmisión de estas bacterias en las piaras (66, 78).

*S. suis* tipo 2 es resistente a varias condiciones ambientales. Puede sobrevivir por 10 minutos a 60°C, 2 h a 50°C y 6 semanas en carcasas a 10°C (27). A 0°C, éste organismo puede sobrevivir por 1 mes en polvo y por 3 meses en heces, mientras que a 25°C, éste puede sobrevivir por 24 h en



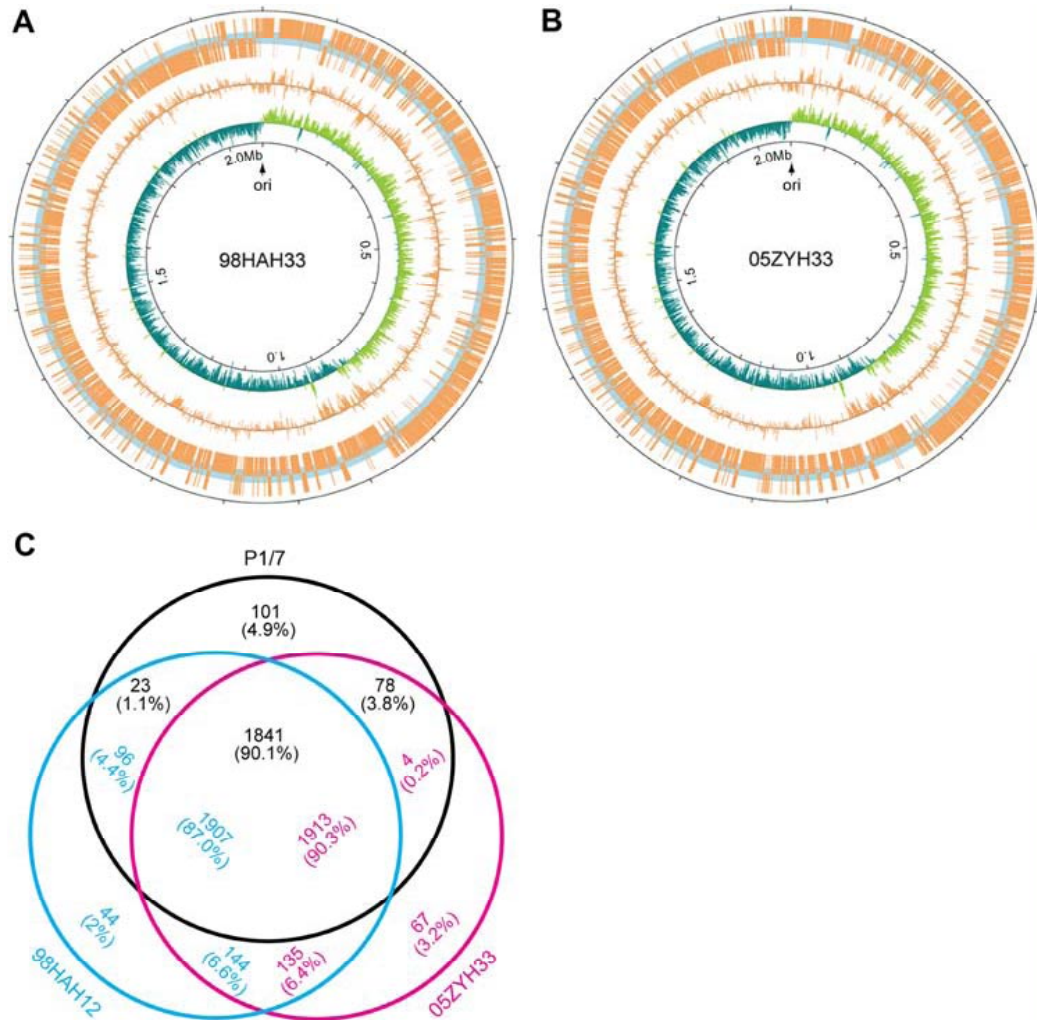
polvo y por 8 días en heces. Sin embargo, *S. suis* tipo 2 se puede eliminar fácilmente con hipoclorito de sodio al 5% (31, 78).

*S. suis* es sensible a los antibióticos, incluyendo la penicilina, ceftriaxone, cefalosporina, ampicilina, y amoxicilina. La penicilina G es comúnmente usada para tratar o controlar infecciones causadas por *S. suis*. Sin embargo, cepas resistentes a la penicilina se han aislado (56,98), y cepas altamente resistentes a otros antibióticos de uso general han sido también reportadas (1).

El genoma de *S. suis* contiene alrededor de 2'095.000 bp con un contenido de G + C de 41%, una región codificante del 86% y 2253 genes (90). Aunque las funciones del 20 al 30% de los genes son desconocidas, muchos genes que pueden jugar un papel en la patogénesis de la infección de *S. suis* han sido estudiados, incluyendo la producción de polisacárido, transporte capsular, factores de restricción de hierro, suilisina, proteínas asociadas a la virulencia, varias enzimas, sistema arginina desaminasa y proteínas de unión IgG (62,70,108,140,148).

Se conoce el genoma completo de 6 diferentes aislados: las cepas 05ZYH33 (NC\_009442) y 98HAH33 (NC\_009443), aisladas de pacientes humanos infectados, la cepa P1/7 (NC\_012925) aislada de un cerdo con cuadro septicémico, la cepa BM407 (NC\_012926), la cepa SC84 (NC\_012924) y la cepa GZ1 (CP000837). Estas 3 últimas secuencias fueron reportadas en el año 2009 (90). (Ver Fig. 1).

Estudios sobre los factores de virulencia de *S. suis* están comenzando a revelar el mecanismo de esta patogénesis bacteriana. La virulencia de *S. suis* difiere entre serotipos y entre las diferentes cepas del mismo serotipo. La mayoría de estudios sobre la virulencia de *S. suis* se han hecho con el serotipo 2. Varios factores o candidatos de la virulencia se han descrito, incluyendo la cápsula (56,108), proteína liberada por la muramidasa y factor proteico extracelular (140, 42), suilisina y adhesinas.



**Fig. 1. Diagramas circulares y comparación *in silico* de dos genomas de *S. suis*.** (A) Mapa del genoma de la cepa 98HAH12. (B) Mapa del genoma de la cepa 05ZYH33. (C) Comparación de los genes de 98HAH12, 05ZYH33 y P1/7 usando FASTA3. Los números en las intersecciones indican los genes compartidos por 2 o 3 cepas.

Imagen tomada de: Chen C, Tang J, Dong W, Wang C, Feng Y, et al (2007) A Glimpse of Streptococcal Toxic Shock Syndrome from Comparative Genomics of *S. suis* 2 Chinese Isolates. PLoS ONE 2(3): e315

### 1.1.3 Factores de virulencia

La mayoría de los estudios existentes sobre los factores de virulencia de *S. suis* han sido realizados con cepas del serotipo 2. Aunque hay cierta confusión en la descripción de la virulencia, los investigadores están de acuerdo al menos en un aspecto: la existencia de cepas virulentas y no virulentas de *S. suis* serotipo 2 (58).

Actualmente, hace falta realizar más estudios sobre modelos de infección experimental para *S. suis*. Diferentes estudios han designado cepas de campo como virulentas y no virulentas basados en la condición clínica del animal del cual fueron aisladas (clínicamente enfermos o animales sanos), en la presencia de proteínas relacionadas con virulencia, en diferentes modelos de infección experimentales: murino y cerdos libres de patógenos específicos (72). De hecho, existen muchas discrepancias en la literatura.

Por ejemplo, Okwumabua *et al.* (93) mencionó que una cepa de campo de Minnesota (DH5) era avirulenta para cerdos, mientras que Staats *et al.* (113) consideró que la misma cepa era altamente virulenta para la especie porcina. Esta cepa originalmente se aisló del cerebro de un cerdo durante un brote de meningitis causada por *Streptococcus suis* que se presentó en una explotación; considerándose como la cepa epidémica causante del problema en dicha granja (89).

Controversialmente, esta misma cepa fue considerada avirulenta por Galina *et al.* 3 años después (49). Igualmente, la cepa de referencia S735 del serotipo 2 fue considerada altamente virulenta (23) o débilmente virulenta (127) después de que dos grupos de investigación independientes realizaran infecciones experimentales. Finalmente el modelo de ratón de la infección correlacionó bien (72) o no del todo (128) con el modelo porcino.

Desde que resultados de infecciones experimentales de *S. suis* en porcinos pueden basarse, entre otras consideraciones, en el estado inmunológico de los animales, la ruta de infección, el tamaño del inóculo y la presencia de *S. suis* como habitantes normales del tracto respiratorio

superior, se debe tomar precaución en el momento de usar los términos virulento y avirulento para llegar a conclusiones definitivas.

En el caso de la cepa 89-1591 incluida en el estudio de Rasmussen *et al.* (100), los autores claramente establecieron que el perfil atípico de ribotipo obtenido con esta cepa está probablemente más relacionado con su origen geográfico (única cepa norteamericana) que por la falta de virulencia. Resultados similares han sido reportados por Beaudoin *et al.* (12) y Chatellier *et al.* (28).

A pesar del hecho de que el conocimiento sobre los factores de virulencia es limitado, los candidatos más importantes en *S. suis* son los polisacáridos capsulares (CPS), las proteínas relacionadas con la virulencia, tales como la proteína liberada por la muramidasa y el factor proteico celular, la hemolisina (suilisina) y las adhesinas (55).

El polisacárido capsular de *S. suis* serotipo 2 es hasta ahora el único factor crítico probado de virulencia, basado en estudios con mutantes isogénicos no encapsulados obtenidos por mutagénesis insercional. La ausencia de CPS correlacionó con fagocitosis aumentada e hidrofobicidad utilizando fagocitos murinos y porcinos. Además, mutantes no encapsulados mostraron ser no virulentos en ratones y en dos diferentes modelos porcinos de infección (23, 111).

La cápsula del *S. suis* tipo 2 está compuesta de ramnosa, galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico, éste último parece que aumenta su capacidad invasiva en el encéfalo (9). El ácido siálico puede también conferir protección frente a la ruta alterna del complemento y protege a la bacteria de la fagocitosis (60,112).

Además otros estudios han demostrado que el espesor de la cápsula juega un papel muy importante en la virulencia puesto que las cepas de *S. suis* tipo 2 aisladas de animales enfermos poseen una cápsula más gruesa que la de los aislamientos obtenidos a partir de animales sanos (60).

A pesar del hecho de que el CPS parece, basado en estudios mutacionales isogénicos, ser un factor importante de virulencia, la mayoría de cepas no virulentas son encapsuladas, indicando que son esenciales otros factores de virulencia. Adicionalmente, cepas virulentas y no virulentas poseen una cápsula de tamaño similar con concentraciones similares de ácido siálico. Este último componente ha sido ya relacionado con virulencia por otros agentes bacterianos de meningitis (25).

La resistencia a la clarificación por la circulación sanguínea no se basa sólo en la presencia del CPS, puesto que una cepa no virulenta encapsulada es eliminada de la circulación dentro de 48 horas, mientras que una cepa virulenta puede permanecer en números relativamente altos en la sangre por más de 5 días (observaciones no publicadas). Anticuerpos en contra del material capsular sólo protege parcialmente frente a la infección y animales convalecientes producen bajos niveles de estos anticuerpos (24).

Fuera del polisacárido capsular, algunas proteínas extracelulares y de pared celular han sido asociadas con la virulencia de *S. suis*. Han sido reportados en cepas del serotipo 2 dos proteínas, una proteína liberada por la muramidasa (MRP) y un factor de proteína extracelular (EF), originalmente asociados a cepas virulentas (99). Además, cepas productoras de MRP y variantes más grandes de EF (EF\*) fueron aisladas de seres humanos, pero no fueron virulentas para los cerdos.

Los mutantes isogénicos deficientes en ambas proteínas parecieron ser tan virulentos como la cepa salvaje después de realizar infecciones experimentales en cerdos recién nacidos libres de patógenos. Resultados similares fueron obtenidos con mutantes MRP-EF isogénicos de *S. suis* tipo 1. Se ha sugerido que la virulencia de *S. suis* es un proceso multifactorial en el cual funciones particulares pueden ser ejecutadas por factores alternativos. Es posible también que la síntesis de estas proteínas pueda estar sólo coincidentalmente asociada a la virulencia más no ser factores de virulencia *per se*.

Sin embargo, esta asociación de MRP y EF con la virulencia se observa en cepas de ciertos países pero no en las de otros. Por ejemplo, la mayoría de cepas norteamericanas aisladas de casos agudos de septicemia y/o meningitis (de origen porcino o humano) fueron MRP y/o EF negativas (55). Sorpresivamente, después de su análisis por ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), las pocas cepas MRP y EF positivas fueron incluidas en el mismo grupo que las cepas europeas que compartieron el mismo fenotipo (28).

Parece existir una cierta asociación de estas proteínas (especialmente la proteína EF) con la virulencia y la mayoría de aislamientos que poseen estos factores son virulentos. Sin embargo, la ausencia de una o más de estas proteínas no puede estar necesariamente asociada con la carencia de virulencia. De nuevo, desde que el término de “virulencia” está débilmente definido para *S. suis*, es posible también que bajo condiciones estandarizadas, cepas MRP + EF+ sean potencialmente más virulentas que cepas MRP- y EF-.

Recientemente Silva *et al.* (107) a través de la generación de una técnica de PCR-Multiplex informan sobre el perfil génico de *Streptococcus suis* que más frecuentemente se asoció a virulencia y determinaron que el 45% de los aislamientos invasivos de *Streptococcus suis* estudiados pertenecían a 2 genotipos determinados que eran: cps2/mrp+/epf+/sly+ y cps9/mrp\*/epf-/sly+, o sea, pertenecientes a los serotipos capsulares 2 ó 9, expresando la proteína MRP o una variante de ella (MRP\*), expresando o no la proteína extracelular EF y expresando la suilisina (SLY) (107).

*S. suis* también produce una hemolisina (suilisina), una toxina tiol-activada, la cual puede jugar un papel muy importante en la virulencia. Esta proteína pertenece a la familia de toxinas conocidas como toxinas ligadas antigénicamente al colesterol (61, 70).

Se debe mencionar que el gen que codifican la suilisina ha sido secuenciado, revelando una similitud relativamente alta con la pneumolisina,

una toxina producida por *Streptococcus pneumoniae*, un patógeno humano. A pesar del hecho de que los anticuerpos en contra de la suilisina parecen proteger frente a la infección, el papel de esta toxina como un factor de virulencia es todavía muy controversial. Un mutante definido por reemplazo alélico del gen de la hemolisina de un aislamiento europeo de *S. suis* tipo 2 se generó y caracterizó recientemente. A diferencia de su cepa parental, ésta no es hemolítica ni citotóxica para macrófagos, avirulento en un modelo de infección murino, pero sólo levemente atenuado en un modelo porcino de infección sistémica (2).

Igual que para MRP y EF, la mayoría de cepas europeas son suilisina positivas, mientras que una producción variable de esta proteína ha sido observada con las cepas norteamericanas (55). Sin embargo, desde que se atribuyó cierto papel en la patogénesis de la infección a la suilisina, esta toxina podría estar asociada con la alta virulencia de cepas del serotipo 2. Ninguna cepa del serotipo 2 no virulenta y suilisina positiva ha sido reportada.

También se han descrito proteínas de *S. suis* que juegan un papel como adhesinas. Se encontró que *S. suis* reconoce una secuencia de un disacárido presente en la trihexosilseramida, GbO<sub>3</sub> (un glicolípido neutral que pertenece a los antígenos del grupo sanguíneo P) (63). Esta especificidad de unión es responsable de las propiedades de la hemaglutinación de *S. suis*.

La adhesina de 18 KDa ha sido purificada y está presente en todas las cepas que se han examinado. Esta adhesina se clasificó en dos grupos : P<sub>N</sub> y P<sub>O</sub>, basado en diferencias en su especificidad de unión. El tipo P<sub>O</sub> fue inhibido por galactosa solamente, mientras que el tipo P<sub>N</sub> fue inhibido por galactosa y N-acetilgalactosamina. Además la adhesina purificada no sólo mostró ser altamente inmunogénica sino que también indujo actividad bactericida en ratones.

Otro factor importante en la virulencia del *S. suis* son los plásmidos. Estos plásmidos son de gran importancia clínica, no solo debido a que

pueden transportar genes para la resistencia a los medicamentos y a metales pesados, para factores de virulencia y producción de toxinas, sino también porque muchos de ellos median la transferencia genética que conduce a la aparición de cepas bacterianas con nuevas combinaciones de resistencia a los antibióticos, antígenos y mecanismos de virulencia.

El análisis de los plásmidos demuestra que estas moléculas son importantes para diferenciar cepas que corresponden al mismo serotipo. Así, los plásmidos juegan un papel epidemiológico importante para la determinación del origen de los brotes de la enfermedad o para investigar la diseminación de un agente infeccioso en la población.

Cantin *et al.* (22), aislaron plásmidos de *S. suis* obtenidos de animales enfermos en Québec y el oeste de Canadá y de casos humanos en Europa. En general el perfil de plásmidos era muy similar, encontrando que el 60% de los plásmidos identificados tenían un peso molecular que variaba entre 1,5 – 35 kilo bases (Kb). Una banda de cerca de 5 Kb se encontró presente en la mayoría de los aislamientos de *S. suis* tipo 2. En 1999 fue reportada la secuencia completa del plásmido *PSSU1*, con un tamaño de 4975 bp, con un contenido de G+C de 36%, una región codificante del 75% y contiene 6 marcos abiertos de lectura (116).

Finalmente, la presencia de MRP, EF y de suilisina en las cepas aisladas representa una potencial virulencia. Por el contrario, la ausencia de una o más de estas proteínas en aislamientos de animales afectados no puede ser automáticamente asociada la falta de virulencia. Es posible que cepas virulentas MRP-, EF- y suilisina negativas sean comparativamente menos virulentas que cepas MRP+, EF+ y suilisina positivas.

Los estudios realizados de los factores de virulencia de *S. suis* (121), concretamente de las proteínas MRP, EF y Suilisina han demostrado que existen diferencias en cuanto a la producción de estas proteínas asociadas a la virulencia entre cepas obtenidas a partir de brotes clínicos de aquellas cepas que se obtienen a partir de portadores tonsilares. En un estudio



realizado en España, se logró determinar que el 80% de cepas que presentaron el perfil MRP+, EF+,Sui+ pertenecían al serotipo 2. Este hecho puede explicar que la causa de que el serotipo 2 sea aislado en la mayoría de los brotes clínicos diagnosticados en todos los países, se deba posiblemente a la mayor capacidad de este serotipo de producir proteínas consideradas factores de virulencia (121).

Infecciones experimentales con un modelo bien estandarizado utilizando cepas representativas de ambos grupos son necesarias para confirmar lo anterior. Cepas virulentas pueden también ser aisladas de animales sanos y la enfermedad clínica puede algunas veces ser consecuencia de la alteración del balance inmune debido a diferentes causas, tales como otras enfermedades infecciosas, manejo y estrés. Así, el enigma de los factores de virulencia y/o marcadores para cepas virulentas del serotipo 2 no se ha resuelto aún. La falta de conocimiento de los factores de virulencia para los otros serotipos es aún más marcada.

## **1.2 EPIDEMIOLOGIA**

*Streptococcus suis* es una bacteria que se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo y está adaptada a cerdos domésticos, pero también se recupera ocasionalmente de cerdos salvajes, caballos, perros y gatos (39,112). *S.suis* tipo 2 coloniza las tonsilas palatinas de cerdos clínicamente enfermos y aparentemente sanos (8). Los animales portadores asintomáticos por lo tanto representan una fuente potencial de infección para otros cerdos dentro de una explotación o para los seres humanos.

Los lechones son más susceptibles, pero la infección puede ocurrir a cualquier edad (112). Factores predisponentes son encontrados en cerdos criados en condiciones sub-óptimas (por ej. alojamiento con ventilación inadecuada). La situación puede ser más grave si los cerdos son criados bajo condiciones que causen estrés y por lo tanto una supresión inmune (112).

Se han descrito procesos causados por esta especie en todos los países con un sector porcino desarrollado, siendo, por ejemplo, considerada como una enfermedad emergente dentro de la Unión Europea. Debido a que esta enfermedad no es de declaración obligatoria, los datos sobre la prevalencia de *S. suis* son tan sólo parciales, aunque todo parece indicar que es muy alta.

*S. suis* puede afectar a prácticamente todas las fases de la producción del cerdo, desde el nacimiento hasta que alcanza el peso adecuado para ser enviado al matadero, aunque la susceptibilidad suele ir disminuyendo con el tiempo tras el destete. La mayoría de los procesos por *S. suis* se producen después del destete, entre las 3 y las 12 semanas de vida, con una mayor incidencia alrededor de las 6-8 semanas (58).

En la mayoría de los brotes, el número de animales afectados es bajo, y tan sólo se encuentran incidencias elevadas cuando el proceso es concomitante con otra enfermedad infecciosa o parasitaria o en explotaciones con deficiencias de higiene y manejo graves. Con un tratamiento apropiado, la tasa de mortalidad es normalmente baja (0-5 %), pero ésta puede llegar hasta el 20 % si éste no se instaure a tiempo o si el antibiótico de elección es inadecuado (33).

La transmisión en y/o entre explotaciones se debe principalmente a los animales portadores sanos, estando todavía por determinar la importancia del medio externo como reservorio de esta enfermedad, aunque se considera que moscas, roedores, aves y hombre, pueden jugar un papel importante en la transmisión de la enfermedad, a lo que contribuye la supervivencia de *S. suis* en el medio ambiente, pese a que no se trata de una bacteria especialmente resistente (58,59). Para evaluar la supervivencia de *S. suis* en el medio ambiente, Clifton-Hadley y MR Enright (31) evaluaron la viabilidad de *Streptococcus suis* serotipo 2 a diferentes temperaturas y en diferentes materiales, obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla 1. Efecto de la temperatura y desinfectantes sobre la supervivencia de *S. suis*.**

<b>MATERIAL</b>	<b>Temperatura</b>	<b>VIABILIDAD</b>
<b>Polvo</b>	0°C	54 días
	9°C	25 días
	22-25°C	< 24 horas
<b>Heces</b>	0°C	104 días
	9°C	10 días
	22-25°C	8 días
<b>Cadáveres en descomposición</b>	4°C	6 semanas
	22-25°C	12 días
<b>Agua</b>	4°C	1-2 semanas
<b>Cualquier tipo (sin materia orgánica)</b>	desinfectantes	< 1 minuto

Estos resultados soportan la importancia de seguir estrictos protocolos de limpieza y desinfección dentro de las explotaciones para evitar la circulación e infección de los animales con *S. suis*. La mayoría de los animales son portadores inaparentes de *S. suis* en sus tonsilas, pudiendo aparecer en un mismo cerdo varios serotipos diferentes de esta bacteria, aunque se ha demostrado mediante estudios epidemiológicos que existe una marcada tendencia a que en una población cerrada de cerdos, sólo una cepa de *S. suis* cause mortalidad. Esta discriminación tan precisa ha sido posible debido al empleo de técnicas moleculares como la Electroforesis de campo pulsado que permite diferenciar cepas dentro de un mismo serotipo (15, 130,136). La razón por la que una determinada cepa predomina en una explotación no está clara, pero podría estar relacionada con un incremento en la virulencia o a una mayor capacidad de colonización del cerdo, aunque

no se puede menospreciar la influencia de determinados tipos de manejo en la difusión y permanencia de una cepa en una explotación.

### 1.3 PATOGENIA

*S. suis* puede penetrar en el organismo por vía transcutánea (a través de cortes y abrasiones), oral y nasal, en cuyo caso accederá a las criptas de las tonsilas donde permanece viable durante periodos de tiempo prolongados. Los animales infectados pueden desarrollar la enfermedad de forma rápida o actuar como portadores tonsilares y desarrollar la enfermedad posteriormente (a medida que la inmunidad maternal disminuye), en general asociada a situaciones de estrés (67).

*S. suis* coloniza muy pronto las vías respiratorias altas del cerdo, considerándose que tras los primeros 5 días de vida del animal este hecho ya ha tenido lugar. Los lechones se infectan mayoritariamente en el momento del parto, cuando contactan o aspiran secreciones vaginales contaminadas. La transmisión vertical de *S. suis* se ha demostrado por la determinación de los serotipos aislados tanto en la madre como en la camada, aunque este método no es definitivo ya que no puede discriminar hasta el grado de cepa.

Debemos recordar que *S. suis* es, principalmente, un patógeno con predilección por el sistema nervioso. Los mecanismos que permiten la diseminación intraorgánica de *S. suis* están todavía poco claros. Los posibles pasos en la patogénesis son la entrada de la bacteria en sangre desde las tonsilas vía vasos sanguíneos o linfáticos eferentes, fagocitosis de la bacteria por monocitos circulantes, transporte de la bacteria al líquido cerebroespinal vía plexos coroideos y estimulación de la producción de citoquinas por la línea monocitos/macrófagos que, en el caso de procesos meningíticos, conduce a un infiltrado inflamatorio y a una mayor permeabilidad que aumenta la presión intracraneal, dañando neuronas y contribuyendo a los signos de enfermedad nerviosa (58).

Las cepas virulentas del *Streptococcus suis* tipo 2 tienen la habilidad de pasar la barrera hematoencefálica y llegar al líquido cefalorraquídeo en macrófagos. Una de las rutas obvias al cerebro y a las articulaciones puede ser por el flujo sanguíneo; se ha demostrado que en ausencia de opsoninas específicas, el *Streptococcus suis* tipo 2 puede ser fagocitado pero no destruido por los monocitos, los cuales migran a las superficies serosas, a las articulaciones y a través de los plexos coroides para convertirse en macrófagos locales.

Existen diversos grados de virulencia entre cepas de un mismo serotipo de *S. suis*. Los factores de virulencia se han relacionado con constituyentes de la cápsula y pared celular de esta bacteria y por la secreción de sustancias tóxicas (18). Parece clara la relación de tres proteínas con la virulencia de las cepas de *S. suis* tipo 2 [Muramidase Released Protein (MRP), Factor Externo (EF) y suilisina (hemolisina)]. En estudios realizados en España, se ha observado que el 36.5 % de las cepas de *S. suis* aisladas de casos clínicos tenían capacidad para producir estas tres proteínas, perteneciendo el 80% de ellas al serotipo 2, lo que explicaría la mayor prevalencia de *S. suis* tipo 2 en los casos de meningitis estreptocócicas (108).

Por otro lado, las cepas aisladas de portadores tonsilares poseen, generalmente, una menor capacidad de producción de estas proteínas consideradas como factores de patogenicidad (más del 50 % no producen ninguna de las tres proteínas). En cualquier caso, como no todas las cepas aisladas de casos clínicos poseen estos factores extracelulares, se asume que estas cepas poseen otros factores de virulencia. Entre ellas podrían estar factores de unión como la proteína de unión a IgG, una adhesina o una proteína de unión a albúmina. Estas proteínas teóricamente podrían participar en el establecimiento de la infección, aunque su papel sigue sin estar claro, no pareciendo ser esenciales en la patogenia de la infección por *S. suis* (108).

## - Patogénesis de la meningitis

La patogénesis de la infección de *S. suis* no es del todo clara. Los lechones se infectan durante el parto (transmisión vertical de la infección). Ellos también adquieren la bacteria debido al contacto cercano con cerdas, heces y estructuras o materiales contaminados (paredes, piso, etc.).

Las razones que pueden explicar porque bacterias virulentas de *S. suis* colonizan exitosamente sólo algunos lechones y no a otros son poco conocidas. La infección de cerdos neonatos puede también ocurrir vía respiratoria de cerda a lechón y entre lechones, a menos que esto sea menos probablemente en ausencia de signos clínicos. Los animales colonizados albergarán la bacteria en sus tonsilas; algunos animales sólo serán portadores sanos y nunca desarrollarán la enfermedad, mientras que otros presentarán bacteremia, algunas veces septicemia y finalmente, meningitis. Por esto, en estos casos, la bacteria debería viajar a través del torrente sanguíneo y alcanzar el sistema nervioso central (SNC) (55).

No se conoce como el microorganismo atraviesa la barrera de la mucosa para llegar a la sangre. De hecho, muy pocos estudios existen sobre las interacciones entre *S. suis* y las células epiteliales. Se ha reportado recientemente que cepas virulentas de *S. suis* pueden invadir a una cierta extensión, en una línea celular epitelial de origen humano y sólo cepas suilisina-positivas fueron citotóxicas para estas células (91). La citotoxicidad (pero no invasión celular) para las células epiteliales fue confirmada utilizando células de origen porcino (77).

Una vez en circulación, es controversial la manera como la bacteria viaja a través del torrente sanguíneo (diseminación). Una teoría sugiere la toma de la bacteria por los monocitos (en ausencia de anticuerpos específicos), sobrevivencia intracelular e invasión del SNC por la teoría del "caballo de Troya". Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados durante la última década sugieren que la bacteria puede también usar otros mecanismos durante la diseminación (58).

Primero, aunque se observó cierto nivel de fagocitosis, la mayoría de las bacterias permanecen de manera extracelular. De hecho, el número de monocitos que contienen la bacteria en cerdos bacterémicos es baja (menos del 2%). Además, como se ha dicho anteriormente, el polisacárido capsular le confiere propiedades antifagocíticas a *S. suis* y los mutantes no encapsulados fueron fácilmente fagocitados y destruidos. Por lo tanto, es posible que bacterias extracelulares de *S. suis* también viajen libremente en circulación (55).

Finalmente, un nivel relativamente alto de adhesión (sin fagocitosis) de *S. suis* a células fagocíticas ha sido recientemente observado, el cual puede también sugerir que la bacteria puede unirse pero no ser ingerida por macrófagos, siendo responsable de la bacteremia persistente e infección diseminada (una teoría “modificada” del caballo de Troya) (observaciones no publicadas) (58).

Otro enigma es como la bacteria atraviesa la barrera hematoencefálica al espacio subaracnoide. Si la teoría del “caballo de Troya” (o el caballo de Troya modificado) fuera correcta, la bacteria llegaría a la barrera hematoencefálica dentro o asociada a la superficie de monocitos. Como el SNC es considerado como un órgano inmunoprivilegiado, la circulación normal de monocitos al SNC es aún controversial. Sin embargo, es aceptado que el estado inmunoprivilegiado del cerebro no es absoluto y la permeabilidad de algunas células inmunes podría ser modificada como una adaptación al microambiente específico local (58).

Como se mencionó anteriormente, también es posible que *S. suis* interaccione directamente con células de la barrera hematoencefálica como bacteria libre. Esta barrera, responsable de mantener la homeóstasis bioquímica dentro del SNC se caracteriza por la presencia de uniones estrechas y regula el tráfico celular de fluidos y macromoléculas a ambos lados de la capa.

Existen dos clases de células presentes en dichas uniones estrechas: las células endoteliales microvasculares cerebrales (CEMC) y las células epiteliales que forman el plexo coroide. Es generalmente aceptado que las interacciones bacterianas con estas células endoteliales microvasculares cerebrales son principalmente caracterizadas por adherencia bacteriana específica con la consecuente invasión, toxicidad y/o aumento de permeabilidad. Ensayos de invasión realizados con CEMC demostraron que, a diferencia de otros patógenos, *S. suis* serotipo 2 podía adherirse pero no invadir este tipo de células (26).

Es posible que la adherencia de *S. suis* a CEMC juegue un papel importante en la patogénesis de la infección y que, después de la adherencia de *S. suis* a CEMC, la bacteria secreta factores tóxicos los cuales afectarían las células endoteliales. Tales factores podrían aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo cual conduciría al desarrollo del edema cerebral, presión intracraneal aumentada y bloqueo del flujo sanguíneo característico de la meningitis bacteriana (55).

Por lo tanto algunas veces se han observado hallazgos histopatológicos indicando necrosis de paredes de los vasos en asociación con agregados celulares inflamatorios. El endotelio vascular estaba inflamado y algunas veces el lumen se encontraba ocluido, demostrando la invasión celular inflamatoria de las meninges. Es importante mencionar la hipótesis de que las cepas suilisina-positivas y suilisina-negativas usan diferentes formas de inducir enfermedad. De hecho, la patogénesis de la infección puede ser diferente dependiendo de la cepa. Por ejemplo, se ha mostrado recientemente que la suilisina puede dañar a las CEMC lo cual podría contribuir a una permeabilidad aumentada de la barrera hematoencefálica (58).

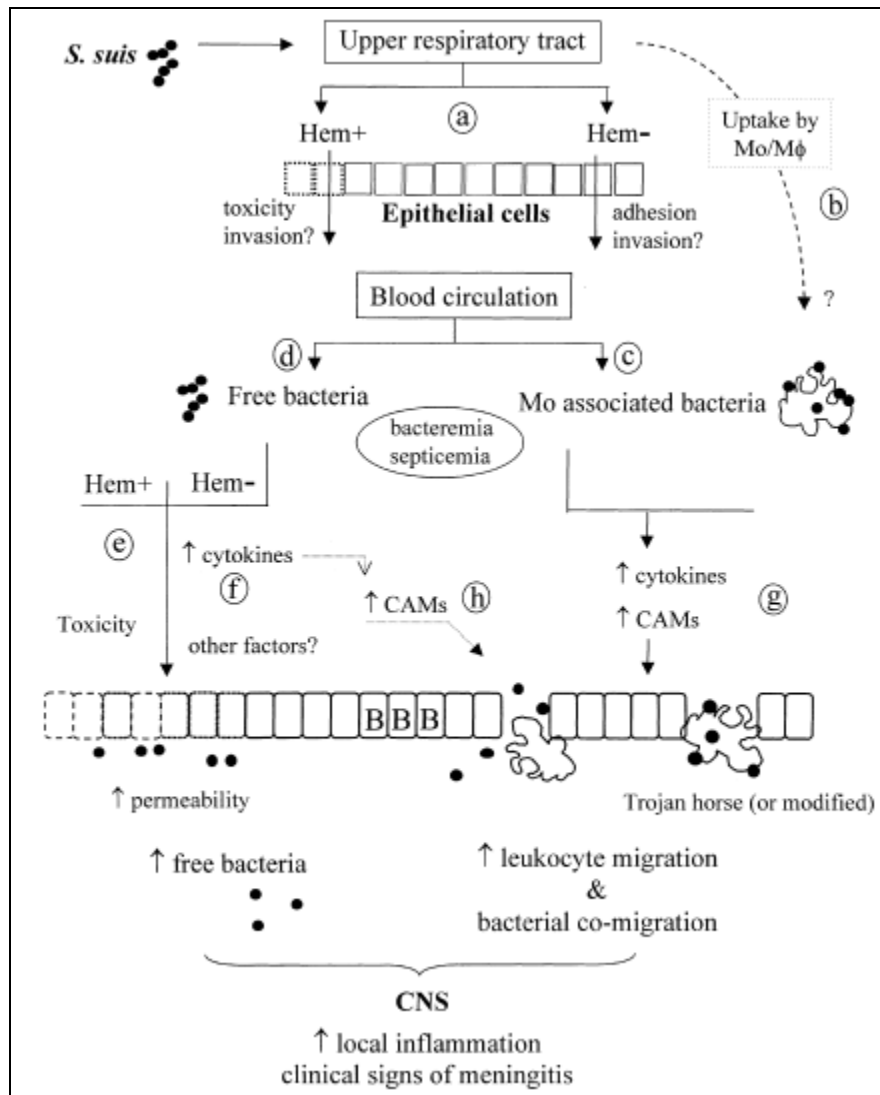
De otro lado, es posible que la adhesión de cepas suilisina-negativas a CEMC pueda tener otras consecuencias diferentes a dañar directamente a las células. Un mecanismo puede ser la estimulación de la producción de



citoquinas a través de la adherencia bacteriana con una alteración resultante de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Los trabajos recientes muestran que *S. suis* es capaz de interactuar no sólo con monocitos/macrófagos sino que también induce la liberación de muchas citoquinas proinflamatorias y quimoquinas (por ej. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquinas (IL-6, IL-1, IL-8) y proteína quimiotáctica de los monocitos-1. El papel de las citoquinas en el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica o en el ingreso de la bacteria al SNC en infecciones de *S.suis* está actualmente en estudio (58).

Por otro lado, interacciones de la bacteria con células epiteliales polarizadas del plexo coroide (el otro componente importante de la barrera hematoencefálica) puede ser la consecuencia de la presión de bacteremia constante de alto grado. De hecho, la alteración del epitelio coroide se ha descrito durante la meningitis natural o inducida experimentalmente por *S. suis*. Respecto a esto, la bacteria puede usar también algunos de los mecanismos anteriormente mencionados para CEMC de atravesar la barrera hematoencefálica al plexo coroide.



**Fig. 2. Patogénesis de la meningitis causada por *S. suis*.**

(Imagen tomada de: M. Gottschalk, M. Segura. Veterinary Microbiology. 76 (2000) 259-272.)

## 1.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y LESIONES

Las formas clínicas producidas por *S. suis* en la especie porcina pueden ser muy variables y se asocian fundamentalmente a trastornos nerviosos, reproductivos, artritis, septicemias, problemas respiratorios y formación de abscesos. Las más frecuentes son sin duda la forma nerviosa y septicémica ocupando en conjunto casi un 80% de los casos diagnosticados (49.4% forma nerviosa y 31.8% forma septicémica) (121).

En los procesos producidos por *S. suis* que cursan con formas nerviosas, es constante la presentación inicial de un síndrome febril más o menos intenso seguido de la aparición rápida de signos nerviosos. Dentro de las lesiones se puede encontrar una clara congestión, tanto en cerebro como en meninges, con aspecto brillante de toda la masa encefálica, consecuencia del edema cerebral. Microscópicamente, se puede observar un infiltrado rico en elementos celulares, principalmente de polimorfonucleares neutrófilos (34).

Los cuadros septicémicos cursan normalmente de forma asintomática observándose muerte súbita de lechones lactantes o tras el destete, produciéndose la muerte de los lechones entre las 24 y 48 horas de iniciarse el proceso (112). Desde el punto de vista lesional, macroscópicamente el cadáver muestra enrojecimiento de la piel con congestión y hemorragias en los órganos parenquimatosos. Microscópicamente, se observa una congestión generalizada, principalmente en órganos parenquimatosos (34).

Una de las formas clásicas de presentación de la enfermedad debida a estreptococos son los cuadros de artritis, cursando con un engrosamiento de las articulaciones y láminas articulares, presentando nódulos duros a la palpación y un aumento del líquido sinovial (31, 121).

Existen muchas descripciones de las lesiones patológicas e histopatológicas presentadas en cerdos infectados con *S. suis* (112). Las lesiones macroscópicas más comunes son: congestión de las meninges, nódulos linfáticos y pulmones; y el hallazgo histopatológico más frecuente está dentro del plexo coroide. En el sistema nervioso central pueden observarse lesiones asociadas con meningitis y coroiditis, incluyendo edema de las leptomeninges y la dura madre, vasos sanguíneos meníngeos hiperémicos y una cantidad aumentada de fluido cerebroespinal (CSF).

La lesión histopatológica más característica de la meningitis aguda causada por *S. suis* es un infiltrado neutrofílico difuso. También ha sido reportada una cantidad aumentada de CSF también ha sido reportada en

casos humanos de meningitis mediante punción lumbar (85,105). En necropsias realizadas a pacientes muertos por causa de síndrome de shock séptico o meningitis, Zhu *et al.* (150) reportaron lesiones macroscópicas como: hemorragia diseminada, especialmente en estómago y glándulas adrenales congestión leptomeníngea, edema cerebral, hiperemia de miocardio, coagulación intravascular diseminada y septicemia. Adicionalmente también se observó degeneración o necrosis de hepatocitos y células renales en los cerdos afectados. Las características patológicas de los órganos de cerdos enfermos y de pacientes fueron similares (150).

Si bien las formas de presentación de la enfermedad más típicas son las anteriormente descritas, en los últimos años se ha observado un incremento de la implicación de *S. suis* en los procesos respiratorios (44). No obstante la importancia de los estreptococos en este tipo de trastornos resulta aún controvertida debido a su frecuente asociación a otros agentes tanto víricos como bacterianos (49).

Otras patologías en las que pueden estar implicados los estreptococos son los trastornos de la reproducción. Según observaciones hechas, estos trastornos se han relacionado con repeticiones de celo, tanto regulares como irregulares, abortos, normalmente a final de la gestación, con la expulsión de camadas completas y sin momificar y presentando los fetos abundante líquido serohemorrágico en cavidad torácica y abdominal (121).

## **1.5 DIAGNOSTICO**

### **1.5.1 Métodos bacteriológicos**

*S. suis* tiene la capacidad de crecer en condiciones anaeróbicas y aeróbicas, pero no puede crecer en solución de NaCl al 6.5% (73). Las colonias de *S. suis* son pequeñas (diámetro de 0.5–1 mm), grisáceas o transparentes y levemente mucoides. La mayoría de las cepas de *S. suis* producen zonas estrechas de  $\alpha$ - hemólisis en placas de agar con sangre de

cordero. *S. suis* tipo 2 produce  $\alpha$ - hemólisis en las placas de agar con sangre de cordero y  $\beta$ -hemólisis en placas de agar con sangre de caballo (112).

La identificación presuntiva basada en cuatro pruebas bioquímicas (Voges-Proskauer, salicina, trealosa, y NaCl al 6.5%) pueden ser acertadas para casi todos los tipos capsulares de *S. suis* (67, 120). Sin embargo, las características bioquímicas son tan variables que la identificación es a menudo difícil y puede requerir una combinación de reacciones bioquímicas, seguidas por una serotipificación confirmativa (42,150). La identificación bioquímica de *S suis* se puede realizar con un mínimo de pruebas cuando se dispone de la serotipificación (67,120). Devriese *et al.* (39) sugirió el uso de sólo dos pruebas para aislados porcinos: amilasa positivo y Voges-Proskauer (acetoína) negativo. En la siguiente tabla se encuentran los diferentes perfiles bioquímicos de *S. suis*, útiles para su identificación.

**Tabla 2. Perfiles bioquímicos de *S. suis*.** (Kilpper-Balz y Schleifer ,1987).

<i>Prueba bioquímica</i>	<i>Perfil bioquímico</i>	<i>Prueba bioquímica</i>	<i>Perfil bioquímico</i>
D- Glucosa	+	Melibiosa	v
Sacarosa	+	Hialuronidasa	v
Lactosa	+	Arginina	+
Maltosa	+	Almidón	+
Salicina	+	Glucógeno	+
Trealosa	+	Reacción VP	-
Inulina	+	Alk-Fosfatasa	-
L-Arabinosa	-	$\alpha$ -Galactosidasa	+
D- Manitol	-	$\beta$ -Glucoronidasa	+
D- Sorbitol	-	Leucina-Arilamidasa	+
Glicerina	-	$\beta$ -Galactosidasa	v
Melecitosa	-	Optoquina	Resistente
D-Ribosa	-	6.5 % NaCl	-
Rafinosa	v		

+: Positivo    -: Negativo    v: Variable    VP: Voges-Proskauer

El diagnóstico presuntivo de una infección por *S. suis* se basa generalmente en signos clínicos, edad de los animales y lesiones macroscópicas. La confirmación se logra mediante el aislamiento del agente infeccioso y observando lesiones microscópicas en tejidos afectados. Cuando sea posible se recomienda, la recolección de más de una colonia  $\alpha$ -hemolítica a partir de diferentes tejidos del mismo animal o de diferentes animales de la misma piara, porque pueden estar presentes múltiples cepas y serotipos de *S. suis*.

Debido a que *S. suis* puede recuperarse de tejido pulmonar sano, es aconsejable tratar de aislar la bacteria de tejidos diferentes a pulmón en casos septicémicos. En casos respiratorios el aislamiento de otros agentes infecciosos como *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuroneumoniae* o *Arcanobacterium pyogenes* son frecuentes, sin embargo algunas veces se obtienen también cultivos puros de *S. suis*. (49,66).

### **1.5.2 Métodos serológicos**

La serotipificación es aún una parte importante del diagnóstico rutinario. Esta puede ser realizada mediante diferentes técnicas, pero muchos laboratorios han adoptado la técnica de coaglutinación. Debido a que la mayoría de los aislamientos tipificables pertenecen a los tipos capsulares del 1-8 y  $\frac{1}{2}$ ., es recomendable para los laboratorios de diagnósticos usar solamente antisueros correspondientes a dichos serotipos y enviar los aislados no tipificables a laboratorios de referencia (55, 67).

La serotipificación es un método basado en los antígenos polisacáridos capsulares utilizando 1 o más de las siguientes técnicas: reacción capsular (53,65,97), precipitación capilar (53) o pruebas de coaglutinación (87). Es un procedimiento de detección e identificación de microorganismos basado en las características de las moléculas que se encuentran en la superficie de las bacterias. Para ello se utilizan anticuerpos

que se unen específicamente a antígenos capsulares, esta reacción produce la aglutinación.

En la prueba de coagulación en placa, se mezcla una suspensión bacteriana con un antisuero, el cual contiene anticuerpos específicos contra determinantes antígenos capsulares de *S. suis*, se hace luego oscilar la placa durante unos minutos y se observa la aparición de aglutinación. Los anticuerpos contra los antígenos de la bacteria forman un entrecruzamiento de los microorganismos, que resulta en un precipitado granular compacto que se forma lentamente.

Adicionalmente, se han desarrollado otras técnicas: un método de inmunocaptura y técnicas de anticuerpos fluorescentes (36,96). Este método de inmunocaptura básicamente es una técnica inmunomagnética diseñada para aislar de una manera selectiva *Streptococcus suis* serotipo 2 y ½ (54); es una técnica muy sensible y permite aislar la bacteria a partir de muestras que contienen un bajo número de este microorganismo y bastantes contaminantes. Además permite recuperar la bacteria viable, lo cual facilita la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana, virulencia y estudios moleculares epidemiológicos.

Diferentes técnicas serológicas para la detección de anticuerpos contra *S. suis* también han sido evaluadas; por ejemplo se ha utilizado una prueba de ELISA indirecta de antígeno completo (102) y una ELISA indirecta utilizando como antígeno polisacárido capsular purificado. Los estudios previos han demostrado que la ELISA basada en antígenos capsulares purificados tuvo la mejor especificidad (38). Sin embargo, se han detectado reacciones cruzadas con otros serotipos, al igual que animales infectados que desarrollan bajos títulos de anticuerpos en contra de la cápsula. Es importante aclarar que la serología es más útil en estudios de vacunación o como herramienta de vigilancia en explotaciones porcinas de alto estatus sanitario que como una herramienta diagnóstica.

### 1.5.3 Diagnóstico molecular

La PCR es una técnica rápida usada para detectar serotipos específicos o cepas de *S. suis* en animales portadores, o para identificar cepas obtenidas de cerdos infectados o sanos, o aún para el diagnóstico clínico de seres humanos enfermos o estudios epidemiológicos.

Una prueba de PCR basada en la región 16S ribosomal (rRNA) se ha empleado previamente para identificar cepas de *S. suis* (19,99). Un procedimiento de PCR basado en un fragmento de 688 pb dentro del gen glutamato deshidrogenasa (*gdh*) de *S. suis* tipo 2 eficientemente amplifica un fragmento de todas las cepas de *S. suis* probadas (92). También se desarrolló una PCR múltiple para este propósito de diferenciación de cepas (143). Otra PCR tipo 2-específica se ha establecido para detectar de *S. suis* de tipo 2 en humanos infectados (84).

Los análisis filogenéticos de 35 serotipos basados en las secuencias del gen 16S rRNA y una región viable del gen de la chaperonina 60 revelaron que los serotipos 32 y 34 eran distantes de otros serotipos (20,27) y fueron identificados como *Streptococcus orisratti* (68). Los métodos moleculares como RFLP (93), huella genética (88), electroforesis de campo pulsado (15, 130) y tipificación de secuencia multilocus (75) se han usado para estudiar la diversidad genética de cepas de *S. suis.*, las relaciones clonales entre cepas y la patogenicidad de clones particulares.

En cualquier caso, muchos de los métodos moleculares para la clasificación e identificación de cepas están basados en la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleándose básicamente dos tipos de aproximaciones:

La primera implica la amplificación de uno o pocos fragmentos de ADN específicos, tales como partes del operón de rRNA, seguido de un análisis de restricción (ARDRA). Los nuevos fragmentos, producto del análisis de restricción, son resueltos en geles de electroforesis generando un patrón de bandas de restricción de ácidos nucleicos característicos para cada cepa.



Además la información obtenida de la secuencia del ADN sobre una región o gen en particular ha permitido la amplificación de fragmentos específicos de ADN que sirven para diagnosticar géneros, especies o cepas.

La segunda técnica hace uso de oligonucleótidos que actúan a modo de cebadores o primers inespecíficos para la amplificación de numerosos fragmentos diferentes de ADN genómico. Cuando estos fragmentos son separados electroforéticamente por tamaño, los patrones de bandas resultantes generan una “huella dactilar” específica para cada grupo de microorganismos (132).

Dentro de este tipo de protocolos se pueden diferenciar técnicas en función de los cebadores empleados, como cebadores cortos de secuencia arbitraria (RAPDs), o cebadores más largos en combinación con temperaturas de alineamiento más bajas (AP-PCR); o bien basados en la presencia natural de elementos repetitivos de ADN distribuidos por el genoma de gran parte de las bacterias, utilizándolas como molde para la amplificación del DNA genómico (rep-PCR). El uso de tres familias de secuencias repetitivas cuya función exacta es desconocida: secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP), secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias (ERIC) y el elemento BOX (131).

Todas estas técnicas, basadas en el uso de la técnica PCR, permiten la amplificación selectiva de las distintas regiones genómicas localizadas entre ellas y que al resolverse electroforéticamente generan la huella dactilar del microorganismo, pudiendo detectarse diferencias genéticas incluso entre cepas de la misma especie bacteriana (131).

De esta manera se ha conseguido visualizar la huella dactilar de un microorganismo, de la misma manera que se usa un código de barras en los comercios. A partir de este momento, para localizar la presencia de una determinada especie o cepa, o bien para agrupar distintos microorganismos relacionados, sólo habrá que visualizar la huella dactilar o genómica de cada microorganismo (104).

Estudios previos (88,89) han demostrado la utilidad de estas técnicas moleculares de tipificación como la huella genómica, para estudiar la epidemiología de la infección de *Streptococcus suis* dentro de una explotación. Mogollón *et al.* (88) encontró que el análisis por medio de enzimas de restricción de *S. suis* genera marcadores epidemiológicos que posibilitan el estudio de los patrones de transmisión de este microorganismo y la relación que existe entre cepas epidémicas y otras cepas presentes dentro de una explotación porcina.

Por otro lado, Beaudoin *et al.* (12) confirmó la diversidad genética que existe entre aislamientos de *S. suis* serotipo 2 y explicó que aunque los aislamientos obtenidos a partir de animales clínicamente sanos fueron muy heterogéneos, no fue el caso para la mayoría de aislados obtenidos de casos septicémicos.

Los métodos de tipificación se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos (basados en características fisiológicas o bioquímicas) y genotípicos (basados en el estudio del ADN). Los métodos fenotípicos de tipificación son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos. Ello se debe a que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el ambiente y, por tanto, es susceptible de modificarse cuando las condiciones ambientales varían. El extraordinario avance de la biología molecular en los últimos años ha permitido desarrollar nuevos métodos genotípicos de tipificación.

El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre varios aislados de una misma especie. Esta información es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multirresistentes, porque permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva (83).

La rep-PCR es una técnica molecular de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas o repetitivas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias y algunas bacterias gram-positivas y hongos (131). Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias rep, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN. Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) son algunas de las secuencias rep que más se han utilizado en estudios epidemiológicos de brotes infecciosos (134).

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que han supuesto un importante avance en el estudio de las enfermedades infecciosas. En resumen, existen diversas técnicas moleculares basadas en la PCR que son muy útiles como método inicial de tipificación para estudiar la relación clonal entre aislados de una misma especie. La elección de la técnica depende de factores de tipo técnico (rapidez, poca laboriosidad, fácil interpretación y con un elevado poder de discriminación y reproducibilidad) y económico (bajo costo).

### **1.6 ERIC- PCR: Secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias**

Esta técnica está basada en la existencia de un elemento de ADN intergénico repetido a lo largo del genoma de muchas bacterias. Este elemento fue descrito por primera vez en *Escherichia coli* y fue denominado Consenso intergénico repetitivo enterobacteriano. (ERIC) (131). Una secuencia consenso de estos elementos repetitivos fue usada para diseñar primers que han sido utilizados en muchas especies bacterianas desde

entonces (132). Estos primers se usan para amplificar por PCR, fragmentos del genoma entre cada elemento repetitivo, generando un patrón diferente para cada cepa. Las diferentes bandas obtenidas son separadas por electroforesis en agarosa y visualizadas bajo luz ultravioleta después de realizar la tinción del ADN.

Hasta el presente se han descrito distintas familias de elementos repetitivos intercalados en el genoma de las eubacterias; dentro de estos se encuentran los elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP), secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias (ERIC) y el elemento BOX (126,131,133). Los datos de secuencias para los elementos REP y ERIC fueron descritos inicialmente en bacterias entéricas gram negativas y filos relacionados (69,131), mientras que el elemento BOX se ha definido únicamente en la bacteria gram positiva *Streptococcus pneumoniae*.

Las secuencias REP fueron primero descritas como secuencias regulatorias dentro de regiones no traducidas de operones debido a su naturaleza palindrómica y habilidad para formar estructuras estables tipo horquilla en ARN transcrito. Inicialmente, una secuencia consenso fue formulada por alineamiento múltiple de secuencias “REP-like” en *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (69). Esta secuencia consenso REP de 38 bp contiene 6 posiciones totalmente degeneradas, incluyendo un loop variable de 5 bp entre cada lado del segmento conservado del palíndromo.

Por otro lado, los elementos ERIC de 126 pb contienen una repetición central invertida conservada y están localizados en regiones extragénicas; las secuencias nucleotídicas ERIC son altamente conservadas pero su localización cromosomal difiere entre especies. Estas secuencias no parecen estar relacionadas a las secuencias consenso REP (106). Además, ambas secuencias (ERIC y REP) pueden ser transcritas a ARN y se dispersan a través de ARN intermedios.

Este alto grado de conservación evolutiva que presentan las secuencias ERIC se debe probablemente a dos mecanismos, el primero,

hace referencia a que la selección natural puede restringir la variación en estas secuencias debido a que ellos representan sitios importantes de interacciones con ADN y el segundo, es que estas secuencias pueden propagarse así mismas como ADN “egoísta” por conversión genética (131).

Se han propuesto múltiples funciones para estos elementos dispersos REP altamente conservados, como su participación en la terminación de la transcripción, estabilidad del mRNA y organización del dominio cromosomal *in vivo*, pero hasta el momento su papel funcional no es del todo claro (131).

A pesar del hecho que datos de secuenciación de ADN e hibridación sugieren que estos elementos REP, ERIC y BOX tienen distribución restringida a nivel de especie, REP-PCR está siendo usada además en análisis filogenéticos y diferenciación de cepas bacterianas pertenecientes a una misma especie. Este método se ha aplicado a diversos géneros bacterianos, incluyendo *Rhizobium sp.*, *Frankia sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Legionella sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Neisseria sp.* (52). Igualmente, otros reportes han sido publicados en donde utilizan REP-PCR para identificar cepas de hongos de los géneros *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* y *Candida albicans*.

Se han utilizado en técnicas de PCR primers consenso para cada uno de estos elementos, diseñados para amplificar regiones entre elementos repetitivos vecinos. Esta metodología, denominada REP-PCR, genera determinados patrones de huella genómica que posibilitan la diferenciación de especies y cepas bacterianas (131). Las secuencias ERIC, REP y BOX constituyen diferentes clases de elementos procarióticos dispersos repetitivos. Aunque poco se conoce acerca de su función, su ubicuidad sugiere que ellos están involucrados en aspectos importantes de la vida microbiana (13).

La ERIC-PCR está diseñada para caracterizar aislamientos bacterianos por genotipificación. No se requiere tener información genética previa para aplicar esta técnica a nuevas bacterias y permite diferenciar

cepas bacterianas de una manera rápida siendo una herramienta útil para fines epidemiológicos (47).

## **1.7 INFECCION EN HUMANOS**

*Streptococcus suis* es un patógeno importante asociado a una amplia gama de enfermedades en cerdos, incluyendo meningitis, septicemia, pulmonía, endocarditis y artritis. *S. suis* puede ser transmitido a los seres humanos por contacto directo. El primer caso humano de *S. suis* fue reportado en Dinamarca en 1968 (9). La infección humana con *S. suis* se ha convertido en una zoonosis seria y ha sido reportada en muchos países con producción porcina intensiva. Más de 200 casos fueron reportados por todo el mundo antes del 2005, la mayor parte de ellos en países y regiones europeas y asiáticas (51, 146).

### **1.7.1 Síntomas clínicos**

Las infecciones humanas con *S. suis* con frecuencia se manifiestan como meningitis purulenta, pero existen reportes de shock séptico, con falla multiorgánica, endocarditis, neumonía, artritis y peritonitis (41). Se han observado diferencias en los síntomas clínicos presentados entre pacientes infectados con *S. suis*. Entre los síntomas que aparecen en la forma aguda de la meningitis se encuentran, fiebre alta, dolor de cabeza, escalofrío, náuseas, vómito y vértigo, seguidos por uno o más de los siguientes: pérdida de la audición, ataxia cerebelosa, coma, petequia, dolor articular, periférico y parálisis facial, rigidez nuchal, mialgia severa, equimosis, rabdomiolisis (46, 84, 105, 117, 149).

En la forma aguda de shock séptico tóxico, además de fiebre alta, escalofrío, dolor de cabeza, vómito, vértigo y dolor abdominal; otros síntomas se han observado, como: hipotensión, taquicardia, disfunción hepática, hemorragia subcutánea, coagulación intravascular diseminada, falla renal aguda y síndrome de distrés respiratorio agudo. La pérdida de la audición

es la secuela más común que se presenta después de la recuperación de una meningitis aguda, mientras que un paciente con shock séptico con frecuencia muere (41).

### **1.7.2 Epidemiología**

La infección humana es principalmente causada por contacto directo con cerdos portadores, cerdos enfermos, o productos derivados contaminados con *S. suis* a través de heridas en la piel o en mucosa bucal y por cavidad nasal (48, 146).

Por lo tanto la infección humana ocurre usualmente en aquellas personas que poseen trabajos relacionados con cerdos o producción porcina en general, tales como granjeros productores, empleados de plantas de sacrificio y veterinarios (9, 85, 48, 119, 135). La tasa de infección estimada de estas personas es 1500 veces más alta que la de la población general (9). Individuos inmunosuprimidos, incluyendo aquellos a los que se les ha practicado esplenectomía poseen mayor riesgo de infectarse, casos humanos en tales individuos han sido reportados (48, 10, 50, 118). En ciertos casos, algunos cazadores se han infectado cuando han entrado en contacto con cerdos salvajes (85).

*S. suis* usualmente no causa brotes de infecciones en humanos. Los casos esporádicos se han reportado en muchos países que posee una industria porcina intensiva, después del primer caso descrito en Dinamarca en 1968 (9).

A la fecha, la mayoría de casos de infección en humanos han ocurrido en el norte de Europa y Asia. El número total de casos en el mundo está alrededor de 400. China, Tailandia y los Países Bajos son responsables del 69%, 11% y 8% del total de casos reportados, respectivamente.

Dos grandes brotes de infección en humanos fueron reportados en regiones rurales de la provincia de Jiangsu durante el verano de los años

1998 y 1999, con 25 casos reportados, 14 de los cuales murieron de síndrome de shock séptico y meningitis (64, 137). En julio del 2005, el brote más grande de *S. suis* en humanos ocurrió en la provincia de Sichuan en China. Este brote causó 204 infecciones humanas y 38 muertes debido a la falta de tratamiento apropiado y oportuno. Casos esporádicos fueron reportados al mismo tiempo en otras provincias y regiones del país, incluyendo 4 (una muerte) en la provincia de Guangdong y 10 en Hong Kong. Las causas de los dos brotes en la provincia de Jiangsu como en la provincia de Sichuan en el 2005 han sido descritas por diferentes grupos (119, 145, 134).

Después de un detallado análisis epidemiológico, se concluyó que estos brotes estuvieron cercanamente relacionados a un brote grande de infección con *S. suis* presentado en cerdos, debido a que todos los 233 casos humanos ocurrieron en las regiones endémicas donde se presentó esta infección porcina y se estimó que aproximadamente 80000 cerdos estaban infectados por *S. suis* en esta provincia en ese tiempo (108,138, 147).

## **1.8 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN**

La elección del mejor agente antimicrobiano en contra de la infección causada por *Streptococcus suis* está basada en diferentes criterios como: la susceptibilidad del microorganismo, el tipo de infección y el modo de administración.

El pronto reconocimiento de los síntomas clínicos de la meningitis estreptococal seguida por un tratamiento parenteral inmediato de los cerdos afectados con un antibiótico apropiado es el mejor método para maximizar la supervivencia de los cerdos. Los cerdos en etapas tempranas de la meningitis pueden ser difíciles de detectar, por lo que se debería chequear grupos 2 a 3 veces diariamente. Según datos obtenidos de estudios del



tratamiento de la meningitis en niños causada por *S. pneumoniae*, se recomienda realizar una terapia adyuntiva con agentes antiinflamatorios en cerdos afectados con meningitis (121).

La recuperación después del tratamiento es variable y no es raro que algunos cerdos se reinfecten con *S. suis* después del tratamiento. La sensibilidad o susceptibilidad antimicrobiana entre aislamientos de *S. suis* es extremadamente variable; por lo tanto realizar pruebas de sensibilidad antimicrobiana de este microorganismo aislado de líquido cefalorraquídeo es esencial para determinar el antibiótico más apropiado para usar en la granja. Se ha observado una resistencia aumentada de *S. suis* a la penicilina en todo el mundo; así, el uso de este antibiótico no es recomendado como tratamiento, a menos que, pruebas de sensibilidad muestren lo contrario (122).

Usando el método de Kirby-Bauer, diferentes autores han reportado un alto grado de resistencia de aislamientos de *S. suis* a algunos antibióticos como la tetraciclina, clindamicina, eritromicina, kanamicina, neomicina y estreptomina. Otro reportes han mencionado que los agentes antimicrobianos más activos in Vitro en contra de *S. suis* fueron: enrofloxacin y ceftiofur. Mientras que otros estudios demostraron que el porcentaje de sensibilidad a amoxicilina y ampicilina estuvo alrededor del 90% (126). Igualmente, se obtuvieron excelentes resultados cuando se inyectaron lechones en etapas tempranas de la enfermedad con penicilina y dexametasona (127). Tarradas y colaboradores concluyeron que Trimetoprim-sulfametoxazol es una droga alternativa que puede ser utilizada en la quimioprevención y tratamiento de la infección con *Streptococcus suis* (126).

En general, los beta-lactámicos son los antibióticos de elección utilizados para eliminar este patógeno. Sin embargo, no todos los miembros de esta familia son igualmente activos. La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) demostró que un gran número de aislamientos, son

moderadamente susceptibles a la penicilina. En otros estudios, el tratamiento con ceftiofur fue el único régimen que redujo significativamente la mortalidad, el aislamiento de *S. suis* de tejidos en el momento de la necropsia y la severidad de las lesiones macroscópicas (59).

El tratamiento puede también administrarse de manera oral en el agua de beber o en comida. En el caso, de medicar con penicilinas se recomienda administrarse en el agua de consumo de los cerdos para evitar la interferencia con la absorción debido a la digestión. Se han obtenido buenos resultados con Ampicilina, para el cual, *S. suis* ha mostrado en general una alta sensibilidad. La amoxicilina tiene ventajas sobre las penicilinas naturales; su biodisponibilidad es similar, pero su clarificación corporal es más baja que la de la penicilina V, así, se obtienen concentraciones séricas más altas.

Finalmente, es importante tener en cuenta, que debido al método de diseminación de la enfermedad, debe iniciarse el tratamiento rápidamente. Cualquiera que sea el método de medicación utilizado, es primordial que el tratamiento tenga una duración de al menos 5 días (7).

En general, *S. suis* es un ejemplo de infección emergente asociada con la intensificación de la industria porcina. Múltiples factores predisponentes están involucrados, entre ellos están: el estatus sanitario de la explotación (como infecciones concomitantes e inmunosupresión), el grado de virulencia de las cepas de *S. suis* implicadas y la calidad del ambiente y del manejo. Al igual que con otros agentes patógenos, la optimización del manejo y ambiente son esenciales para controlar la enfermedad. La limpieza y desinfección del ambiente reducirán el número de *S. suis* al los que los cerdos están expuestos (4).

La sobrepoblación, poca ventilación, fluctuaciones de temperatura excesivas y mezcla de cerdos de diferentes edades parecen ser los factores de estrés más importantes involucrados en el desarrollo de infecciones con *S. suis* en cerdos susceptibles. Prácticas de manejo como el flujo de cerdos todo dentro/todo fuera ayudan a reducir la incidencia de la enfermedad (59).

El destete temprano ha sido utilizado para mejorar el estatus sanitario de cerdos y eliminar algunos organismos infecciosos. Actualmente, es aceptado que aunque el destete precoz puede funcionar controlando enfermedades como: neumonía y disentería porcina, su capacidad para reducir o eliminar colonizadores tempranos como: *S. suis*, *Haemophilus parasuis* y *Actinobacillus suis*, es cuestionable (30,59).

#### - **Vacunación**

Hasta el momento, la mayoría de las vacunas usadas en cerdos en contra de las infecciones con *Streptococcus suis* han sido bacterinas autógenas y sus resultados han sido inconsistentes (21,93). Las razones exactas de la falla de la vacuna son aún desconocidas, pero como posibles explicaciones están: la interferencia con anticuerpos maternos, degradación de antígenos protectivos o disminución de antigenicidad de la bacteria causada por inactivación por calor o formalina, inmunogenicidad débil de la bacteria encapsulada, producción de anticuerpos contra antígenos no asociados con factores de virulencia y ausencia de algunas cepas o serotipos involucrados en los procesos patológicos. Reams, *et al.* (92) mencionaron que la presencia de múltiples serotipos en una misma explotación puede ser causa de una pobre respuesta a la vacunación.

Algunas cepas de *S. suis* actúan como patógenos primarios causando condiciones como: septicemia, meningitis o artritis pero la mayoría de aislamientos son patógenos oportunistas o patógenos pulmonares secundarios, los cuales sin embargo deberían ser tomados en cuenta en un programa de vacunación (101).

Diferentes tipos de vacunas han sido o están actualmente bajo investigación (21,58). Las bacterinas de células completas parecen no ser buenos inmunógenos y las fallas de las vacunas son comunes. De hecho, no se han reportado ensayos de campo controlados de la eficacia de vacunas de células completas y su efectividad es cuestionable. Uno de los problemas

a los que se enfrentan los investigadores es la falta de buenos modelos experimentales de infección. Se ha mostrado que después de dos dosis de una vacuna autógena, no hay un aumento estadísticamente significativo de títulos de anticuerpos medidos mediante una prueba de ELISA (17).

Estudios de protección pasiva mostraron que ningunos de los sueros de lechones vacunados fueron protectivos en ratones retados con una cepa virulenta. De otro lado, el suero obtenido de cerdos hiperinmunizados (la misma vacuna con dos inoculaciones intravenosas por semana durante 4 semanas), mostraron altos niveles de anticuerpos y protección pasiva. Lo anterior muestra que la bacterina no es un buen inmunógeno y se necesitan de muchas dosis para conferir altos títulos de anticuerpos y protección (58).

Vacunas vivas atenuadas, como mutantes de *S. suis* sensibles a la temperatura y estreptomycin- dependientes generaron protección a varios niveles en ratones; aunque, la tasa de reversión de estos mutantes representan un riesgo difícil de evaluar. También han sido probadas vacunas vivas preparadas con cepas avirulentas. Se obtuvo protección en ratones y/o cerdos después de la inoculación de *S. suis* serotipo 2 vivo. Debido a que las cepas vivas de *S. suis* parecen inducir una protección similar a la producida por cepas virulentas vivas, se sugirió que los factores inmunogénicos importantes podrían ser diferentes a los factores de virulencia.

Otros estudios han mostrado que diferentes proteínas extracelulares o de la pared celular de *S. suis* serotipo 2 pudieron inducir una buena protección. Sin embargo, algunas de estas proteínas las cuales presentan un buen potencial inmunogénico, como la MRP de 136 Kd, no están presentes en todas las cepas virulentas (58).

Además se han probado vacunas en contra de proteínas extracelulares en cerdos por Jacobs *et al.* (70). Una fue hecha con suilisina purificada y la otra contenía en su mayoría proteínas extracelulares producidas por *S. suis*, particularmente EF. Con este estudio se logró

obtener una completa protección con la suilisina purificada y sólo una protección parcial con el EF.

Las bacterinas comerciales de *S. suis* están disponibles y pueden contener más de 5 diferentes tipos capsulares de *S. suis*. Los estudios realizados en ratones han mostrado que las vacunas fueron eficaces en prevenir la enfermedad causada por los tipos capsulares de *S. suis* que están contenidos en la vacuna, pero no presentaron protección cruzada frente a serotipos heterólogos. Las bacterinas autógenas se usan ampliamente en los Estados Unidos; sin embargo, su eficacia no ha sido probada en ensayos controlados (73).

Cuando una bacterina autógena cepa-específica fue producida y usada como una única dosis en cerdos de 4 días, no fue posible obtener una buena protección de los cerdos después de retarlos de forma intravenosa con *S. suis* a los 14 días de edad. Sin embargo la vacunación de cerdas pre-parto protegió a los lechones destetos frente a los síntomas clínicos de meningitis después de un vigoroso reto intravenoso con *S. suis* a los 14 días de edad (6).

Varios factores se deben tener en cuenta cuando se considera utilizar una vacuna autógena en una explotación. El factor más crítico es elegir el aislamiento correcto para incluir en la vacuna. Es importante, incluir en la preparación del producto autógeno las cepas responsables causantes de enfermedad; esto es crítico, en el caso de *S. suis* ya que cepas patogénicas y no patogénicas existen en el cerdo.

En general, sólo aislados sistémicos se deben considerar (en especial aislamientos provenientes de muestras de cerebro y/o articulaciones de cerdos clínicamente infectados). Es recomendable que los aislados respiratorios sean excluidos, debido al hecho de que estas cepas de sitios respiratorios tienden a ser genéticamente diferentes a las cepas recuperadas de sitios sistémicos (124).

Las vacunas vivas atenuadas de *S. suis* permanecen aún en fase experimental. Busque *et al*, reportaron que más del 80% de cerdos de 4 semanas que fueron vacunados intramuscularmente 2 a 3 veces con una cepa viva avirulenta de *S. suis* serotipo 2 fueron protegidos frente a la estreptococosis clínica después de una inoculación con *S. suis* serotipo 2. Por otro lado, Torremorell y colaboradores vacunaron experimentalmente lechones lactantes con hisopados nasales o tonsilares con una cepa virulenta de *S. suis* endémica a una granja y no lograron detectar diferencias estadísticamente significativas en el número de muertes y cerdos afectados clínicamente con meningitis o problemas en sus articulaciones entre grupos vacunados y no vacunados (125).

En conclusión, considerando los resultados obtenidos con las diferentes vacunas estudiadas, se hace evidente la necesidad de seguir realizando estudios experimentales y a nivel de campo para desarrollar una vacuna que sea eficiente previniendo y controlando la infección causada por *Streptococcus suis* en explotaciones porcinas, conociendo y entendiendo de una mejor manera la patogénesis y factores de virulencia de este microorganismo. Además, se deben realizar estudios epidemiológicos dentro de cada explotación si se determina utilizar una vacuna autógena. Estos estudios son útiles para identificar la presencia de cepas patogénicas, cuales son predominantes y para establecer la persistencia de estas cepas en el tiempo.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo general:

- Detectar y genotipificar cepas de *Streptococcus suis* en cerdas madres y lechones asintomáticos de distintas edades en explotaciones porcinas intensivas, mediante el desarrollo y aplicación de las técnicas moleculares de PCR múltiple, ERIC-PCR y cultivo microbiológico.

### Objetivos específicos:

- Desarrollar y optimizar una técnica de PCR múltiple para detectar la especie de *Streptococcus suis* y los serotipos 2 y 1/2 a partir de muestras de campo y cultivos puros de cepas de referencia o de campo.
- Desarrollar la técnica de ERIC-PCR para la genotipificación molecular de cepas de *S. suis*.
- Aislar cepas de *S. suis* a partir de muestras provenientes de lechones sanos de distintas edades.
- Establecer la posible relación clonal existente entre las cepas aisladas de *Streptococcus suis* serotipo 2 analizando los patrones de ADN obtenidos en la huella genómica por medio de la técnica de ERIC-PCR.
- Contribuir al conocimiento de la epidemiología de la enfermedad en el país.

### **3. RESULTADOS**

#### **CAPITULO 2**

**Desarrollo y evaluación de la técnica de PCR múltiple y ERIC-PCR para la detección y genotipificación de *Streptococcus suis* y *S. suis* serotipo 2**



## Desarrollo y evaluación de la técnica de PCR múltiple y ERIC-PCR para la detección y genotipificación de *Streptococcus suis* y *S. suis* serotipo 2

### RESUMEN

Se desarrollaron y evaluaron dos técnicas moleculares para la detección y genotipificación de *Streptococcus suis* en cerdos. La PCR múltiple está basada en la amplificación de un fragmento del gen que codifica para el 16S rRNA (16S rDNA) de *S. suis* y en la amplificación del gen *cps2J* el cual codifica para la biosíntesis capsular de *S. suis* serotipo 2 y ½. La ERIC-PCR es una técnica de tipificación molecular basada en la detección de elementos repetitivos del genoma bacteriano denominados secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias. Para el desarrollo y estandarización de las técnicas se emplearon cepas de referencia de 7 serotipos de *S. suis* y cepas de otras especies bacterianas presentes en cerdos. Los resultados de este estudio mostraron que ambas técnicas son herramientas útiles para la identificación y caracterización de cepas de *S. suis* en diagnóstico y en eventuales estudios epidemiológicos para conocer la dinámica de la enfermedad, facilitando el diseño e implementación de programas de control y prevención.

---

### INTRODUCCION

*Streptococcus suis* es un agente patógeno importante en los sistemas de producción porcina al causar una serie de procesos patológicos que han adquirido gran importancia en los últimos tiempos, sobre todo en los países de explotación industrial, donde afectan de forma significativa la producción intensiva, debido a la alteración de los parámetros productivos y, especialmente, por los costos derivados de las medidas de control necesarias para mitigar el impacto de estos procesos (4,5).

*S. suis* puede ser aislado a partir de cerdos clínicamente enfermos y aparentemente sanos. Los portadores de *S. suis* son fuente de infección para otros cerdos y juegan un papel importante en la transmisión de estas bacterias en las granjas (4). Esta bacteria es también un agente zoonótico responsable de meningitis, septicemia, artritis y endocarditis en humanos (6).

De acuerdo con los polisacáridos capsulares, se han identificado 33 serotipos (5). El Serotipo 2 está más comúnmente asociado a enfermedades en cerdos y seres humanos y es el serotipo reportado con mayor frecuencia en todo el mundo. Aunque el serotipo 2 es considerado el más virulento en la

mayoría de los países, otras cepas virulentas pertenecientes a otros serotipos también pueden causar enfermedad en cerdos (4).

Por lo general, las cepas de *S. suis* son identificadas y clasificadas por sus características morfológicas, bioquímicas y serológicas mediante técnicas microbiológicas y serológicas tradicionales, sin embargo estos métodos son laboriosos, demorados y tienen baja sensibilidad. Los métodos moleculares son ensayos alternativos más sencillos, rápidos y sensibles que complementan los ya usados métodos microbiológicos tradicionales (14, 22).

Las herramientas moleculares para la tipificación de aislamientos han demostrado ser muy importantes en el estudio de la epidemiología de las enfermedades infecciosas. La amplificación de elementos genéticos repetitivos usando el método de ERIC-PCR (amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias) ha sido descrito previamente para la caracterización de aislamientos de *Streptococcus suis* (11,15,16).

El objetivo de este trabajo fue estandarizar una PCR múltiple y una ERIC-PCR para detectar y genotipificar cepas de *Streptococcus suis* y *S. suis* serotipo 2 y ½ en cerdos. En este estudio se describe una PCR múltiple (m-PCR) basada en la amplificación de un fragmento del gen que codifica para el 16S rRNA (16S rDNA) de *S. suis* y en la amplificación del gen *cps2J* el cual codifica para la biosíntesis capsular de *S. suis* serotipo 2 y ½ y una ERIC-PCR para caracterizar cepas de *S. suis* mediante su huella genómica.

La disponibilidad y aplicación de estas técnicas permite contribuir al conocimiento epidemiológico de la enfermedad en los sistemas de producción del país.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Cepas bacterianas**

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se encuentran listadas en la Tabla 1. Las cepas de referencia de *S. suis* y de otras especies bacterianas fueron utilizadas en los ensayos de sensibilidad y especificidad y como controles positivos para el desarrollo de la prueba.

Las cepas de *Streptococcus suis* fueron cultivadas en caldo Todd-Hewitt (Código 249240, BD) y en base de agar Columbia (Código 21112, BD) suplementado con 6% de sangre de cordero e incubadas por 24 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Las 2 cepas de referencia de *S. suis* serotipo 2 (ATCC 700794 y 87555) fueron serotipificadas con antisuero serotipo-específico mediante la técnica de aglutinación en placa (18). Las demás especies bacterianas fueron cultivadas en base de agar Columbia (Código 21112, BD) suplementado con 6% de sangre de cordero e incubadas a 37°C durante 24 horas, posteriormente las colonias fueron sembradas en caldo BHI (Código CM225, OXOID); las colonias de *A. pleuropneumoniae* se sembraron en caldo PPLO (Difco) con Vitox® (OXOID).

Finalmente se hicieron las suspensiones bacterianas de cada microorganismo tomando colonias de los cultivos y llevándolas a un tubo eppendorf con agua grado molecular para luego realizar la extracción del ADN bacteriano.

**Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en el desarrollo de la PCR Múltiple para *S. suis***

Especie	Cepa (s)
<i>Streptococcus suis</i> serotipo 1	ATCC 702644
<i>Streptococcus suis</i> serotipo 2	ATCC 700794, 87555 <sup>a</sup>
<i>Streptococcus suis</i> serotipo 4	6407 <sup>b</sup>
<i>Streptococcus suis</i> serotipo 5	11538
<i>Streptococcus suis</i> serotipo 6	2524
<i>Streptococcus suis</i> serotipo 7	8074
<i>Streptococcus suis</i> serotipo 8	14636
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Cepa de campo <sup>c</sup>
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Cepa de campo
<i>Haemophilus parasuis</i>	Cepa de campo
<i>Escherichia coli</i>	Cepa de campo
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCIMB 12702
<i>Streptococcus sp.</i>	Cepa de campo

<sup>a</sup> Universidad de Montreal. Canadá.

<sup>b</sup> Universidad de Minnesota. U.S.A.

<sup>c</sup> Cepas de campo aisladas en Colombia

### Extracción y purificación del ADN bacteriano

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 200 µl de cultivo bacteriano de *Streptococcus suis* y de las demás especies, usando el kit comercial *Qiamp Tissue kit* (QIAGEN Inc. Valencia, California) de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes.

La medición de la concentración de ADN se hizo mediante espectrofotometría utilizando un biofotómetro (ThermoScientific, Nanodrop 1000), a una absorbancia de  $A_{260}$  (El biofotómetro calcula la concentración de ADN en µl/ml corrigiendo con  $A_{320}$  y  $A_{230}$ ) mientras que la pureza del ADN fue determinada por la relación:  $A_{260}/A_{280}=1.6-1.9$ . El ADN fue cuantificado por espectrofotometría para conocer la cantidad a utilizar en la m-PCR y poder determinar la sensibilidad.

### Amplificación del ADN

Los cebadores que se utilizaron en esta PCR múltiple fueron descritos previamente (7,14). El producto de 318 pb, específico para *S. suis* se obtuvo con el primer sentido 16S-195(s) y el primer antisentido 16S-489(as2) (7) (Tabla. 2), definidos sobre la secuencia 16S rADN (AF009477) (7). El segundo par de cebadores (primers) detecta los serotipos 2 y ½, está basado en el locus de la biosíntesis del polisacárido capsular (*cps*) (AF118389); está compuesto por un primer sentido CPS2JF y un primer antisentido CPS2JR, los cuales amplifican un fragmento de 671 pb (14) (Tabla. 2). Después de realizar el análisis *in silico* de diferentes variables químicas y estructurales de ambos juegos de primers utilizando los programas PRIMER3 y NCBI/Primer-Blast, se observó que la temperatura de anillaje del primer reverse estaba un poco desfasada con respecto al forward, por lo tanto la secuencia de éste se acortó a CPS2JF 5'- ACGCAAGGAATTACGGTATC-3', para disminuir su temperatura melting (Tm).

Como template para la m-PCR se utilizó 2 µl (10 ng) de ADN cromosomal purificado de las cepas bacterianas. La mezcla de reacción contenía: 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM de nucleótidos, 0.04 U/µl de ADN Taq Polimerasa (GoTaq Flexi Promega) y 0.4 µM de cada uno de los cebadores 16S y 0.75 µM de los cebadores CPS2J en un volumen total de 25 µl. Como control negativo de la reacción se utilizó agua ultrapura en reemplazo del ADN bacteriano; igualmente se manejó un control de extracción. Las muestras fueron amplificadas en un termociclador de BioRad (DNA Engine Dyad, USA). El procedimiento de la reacción consistió de una denaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de amplificación a 95°C por 1 minutos, 56°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y luego de una extensión final a 72°C por 5 minutos.

**Tabla 2. Cebadores utilizados en la PCR múltiple para *S. suis*.**

Gen	Primer	Secuencia (5' →3')	Posición	Producto (bp)
<i>cps2</i>	CPS2JF	ACGCAAGGAATTACGGTATC	13794 -13813	671
	CPS2JR	GAGTATCTAAAGAATGCCTATTG	14465 -14443	
16S rDNA	16S-195(s)	CAGTATTTACCGCATGGTAGATAT	172-195	318
	16S-489(as2)	GTAAGATACCGTCAAGTGAGAA	490-469	

#### **Determinación de la sensibilidad de la PCR**

Para determinar la concentración mínima de ADN bacteriano de *S. suis* que puede detectar la PCR múltiple basada en los cebadores 16S-195 (s), 16S-489 (as), CPS2JF y CPS2JR, se utilizó un cultivo de la cepa de referencia ATCC 700794 de *Streptococcus suis* serotipo 2. Después de extraer el ADN, se realizaron ocho diluciones seriadas con base 10 en agua ultrapura a un volumen final de 100 µl, iniciando con 30 ng/µl de ADN. Estas diluciones se sometieron a los procesos de extracción y cuantificación de ADN, amplificación y análisis descritos previamente.

La preparación de las muestras se realizó por triplicado, la PCR múltiple se desarrolló simultáneamente con todos los extractos de ADN, empleando los mismos equipos y los mismos reactivos.

#### **Infección experimental de muestras tisulares**

El objetivo fue demostrar que la PCR múltiple permitía detectar ADN bacteriano de *Streptococcus suis* en muestras tisulares.

La sensibilidad de la PCR fue evaluada usando 8 diluciones en base 10 de un cultivo de la cepa de referencia ATCC 700794 de *Streptococcus suis* serotipo 2, partiendo de una concentración de  $9 \times 10^8$  UFC/ml (calculada con el patrón de turbidez de Mc Farland). Luego, se infectó una porción de tonsila porcina (1 cm<sup>2</sup>) con cada dilución (1 ml) tratando de simular la infección de campo; el tejido fue previamente evaluado por cultivo microbiológico y PCR para establecer que era negativo.

Posteriormente, se realizó la extracción de ADN, seguida de la reacción de m-PCR y la visualización de los productos de amplificación, tal como se describió previamente.

#### **Determinación de la especificidad de la PCR**

La especificidad de la PCR múltiple fue analizada utilizando cepas de referencia de *Streptococcus suis* de diferentes serotipos (1,2,4,5,6,7 y 8) al igual que otras especies bacterianas pertenecientes a otros géneros. Las cepas utilizadas se encuentran listadas en la Tabla 1.

### **Desarrollo y evaluación de la técnica de ERIC-PCR para la caracterización molecular de *Streptococcus suis***

Para realizar la genotipificación de los aislamientos de *Streptococcus suis* serotipo 2 se desarrolló y evaluó la técnica de ERIC-PCR. Este método se realizó según la descripción de Oliveira *et al.* (11) y Torremorell *et al.* (15) con modificaciones menores usando los cebadores: ERIC1R-5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' y ERIC2 5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' (19).

La técnica fue desarrollada con cepas de referencia de *Streptococcus suis* de diferentes serotipos (1,2,4,5,6,7 y 8).

Para obtener patrones de bandas reproducibles y comparables, la cantidad de ADN que se usó siempre para cada reacción fue de 50 ng. La amplificación del ADN extraído se llevó a cabo en un termociclador de BioRad (DNA Engine Dyad, USA). Cada muestra fue sometida a un ciclo inicial de denaturación a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C, 40°C por 2 minutos y 72°C por 2 minutos y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Igualmente se incluyeron un control negativo y otro de extracción en cada reacción de amplificación.

Los ensayos de amplificación se realizaron por triplicado y fueron considerados reproducibles cuando se obtuvieron perfiles genómicos idénticos en 3 montajes separados.

### **Análisis de los productos de amplificación**

Después de la amplificación una alícuota de 10µ de cada uno de los productos de reacción de las dos técnicas de PCR, incluyendo muestras y controles, fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE (90mM Tris, 90mM de borato, 2.5mM de EDTA pH 8) teñido con bromuro de etidio.

Se siguieron los siguientes parámetros para la ERIC-PCR: tiempo de corrido de 75 minutos y un voltaje constante de 75 V; mientras que las condiciones de la electroforesis para la PCR múltiple fueron: tiempo de corrido de 60 minutos y un voltaje constante de 100 V. Finalmente, los geles fueron analizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

### **Análisis de los patrones electroforéticos**

Para el análisis de los patrones de las bandas obtenidas con la técnica de ERIC-PCR se utilizó el software Quantity One v. 4.6.8 (Bio-Rad, CA, USA). Los patrones de banda producidos por la ERIC-PCR fueron considerando el número de bandas y su intensidad. Para el agrupamiento de los perfiles se usó el algoritmo UPGMA (siglas de unweighted to pair group method with arithmetic means) (17).

Se consideraron como un genotipo aquellos aislamientos cuyos perfiles se agruparon en un *cluster*, los cuales presentaron una similitud superior al 75%. Finalmente, se construyó un dendograma para obtener información sobre la relación que existe entre las diferentes cepas de *Streptococcus suis* con base en los datos obtenidos de la huella genómica utilizando el programa Quantity One® v. 4.6.8 (Bio-Rad Laboratories).

## **RESULTADOS**

En este estudio se desarrollaron 2 técnicas moleculares: una PCR múltiple (m-PCR) para la detección de la especie *Streptococcus suis* y *S. suis* serotipo 2 y ½ y una técnica de tipificación molecular, basada en secuencias intergénicas consenso repetitivas de Enterobacterias (ERIC-PCR).

La PCR múltiple permitió la detección de la especie *Streptococcus suis* y *S. suis* serotipo 2 y 1/2 (Fig 1). Se obtuvo un fragmento de 318 pb específico para la especie de *S. suis*, este producto de amplificación se observó en todas las cepas de referencia de los 6 serotipos de *S. suis* utilizadas en el desarrollo de la técnica. Igualmente, los primers CPS2J diseñados sobre la secuencia del locus de la biosíntesis del polisacárido capsular (*cps*)

amplificaron una banda de 671 pb, en cepas pertenecientes al serotipo 2 de *S. suis*

### **Sensibilidad y especificidad de la PCR múltiple**

En cuanto a la sensibilidad de la PCR múltiple se observaron los productos de amplificación característicos de 318 pb y 671 pb para la especie de *Streptococcus suis* y *S. suis* serotipo 2 respectivamente, los cuales fueron detectados hasta la dilución  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  (Fig. 2 y Fig. 3). Se encontró la presencia de una banda tenue de 671 pb de *S. suis* serotipo 2 hasta la dilución  $10^{-4}$  que correspondió a una concentración de ADN de 24.8 pg. Por otro lado, el límite de detección de la PCR para la detección del gen *16SrARN* de *S. suis* fue de 0.96 pg de ADN (Dilución  $10^{-5}$ ).

En cuanto a la especificidad de esta PCR múltiple, los primers para la especie de *Streptococcus suis*, al igual que para *S. suis* serotipo 2, resultaron específicos para los serotipos pertenecientes a esta especie bacteriana y no se observaron productos de amplificación en otras especies bacterianas. Lo anterior demostró que la especificidad *in vitro* de la prueba fue de 100%.

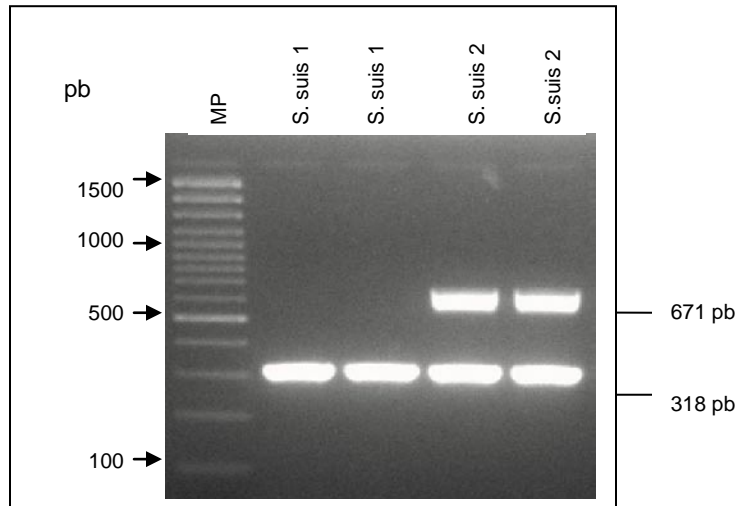
### **ERIC-PCR. Tipificación molecular de *Streptococcus suis***

La figura 4 muestra los perfiles o patrones de banda obtenidos con las cepas de referencia de 7 serotipos de *Streptococcus suis* mediante la técnica de ERIC-PCR. La combinación de los primers ERIC1R y ERIC2 generaron distintos productos de amplificación; las bandas obtenidas presentaron un tamaño entre 100 pb y 1000 pb.

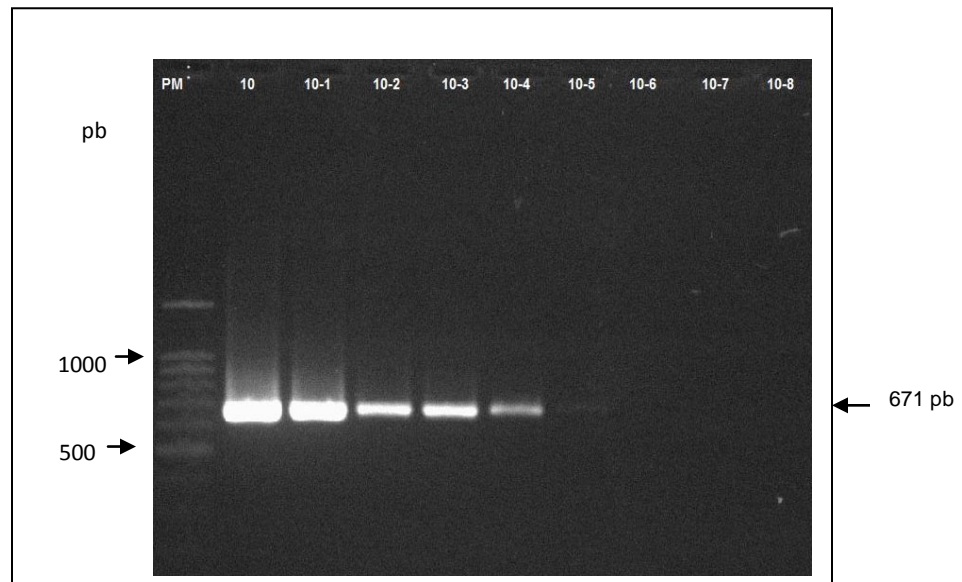
Dos bandas con peso molecular de aproximadamente 500 pb y 700 pb estuvieron presentes en los perfiles de las dos cepas de *S. suis* serotipo 2 evaluadas, mientras que una banda común con un tamaño de 120 pb fue identificada en los serotipos 1,4,5,6 y 7.

Se observaron diferentes perfiles de ADN (genotipos) para los distintos serotipos de *Streptococcus suis*. Los serotipos 1 y 6 presentaron el menor número de bandas, 2 y 3 respectivamente con pesos moleculares de 100 pb, 200 pb y 550 pb, de otro lado *S. suis* ATCC 700794 serotipo 2 (Fig. 4, Carril 4) presentó el número más alto de bandas.

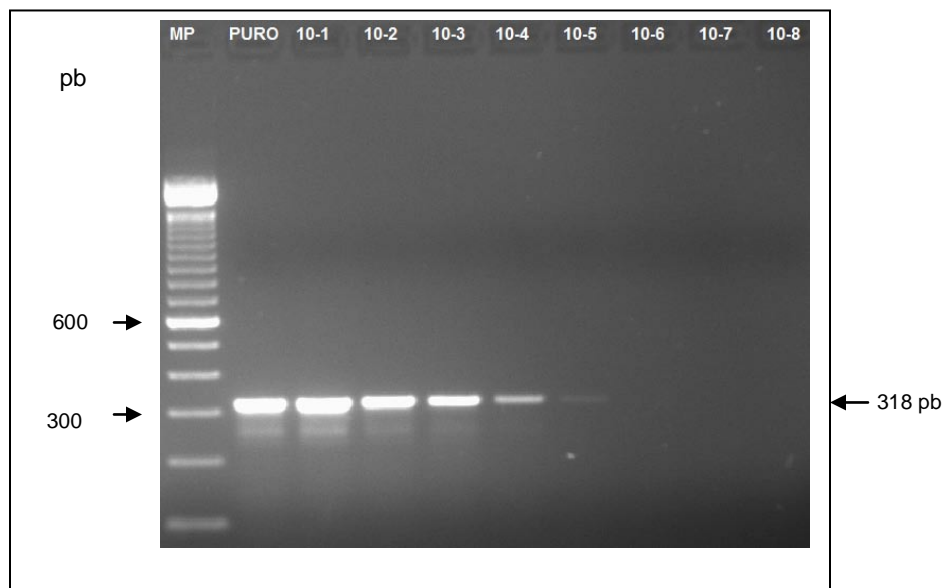
Para visualizar la relación genética que existe entre las cepas de los distintos serotipos de *S. suis* empleados en el desarrollo de la técnica de ERIC-PCR, se efectuó un análisis de los patrones de las bandas obtenidas con el software Quantity One v. 4.6.8 (Bio-Rad, CA, USA) (Fig. 5).



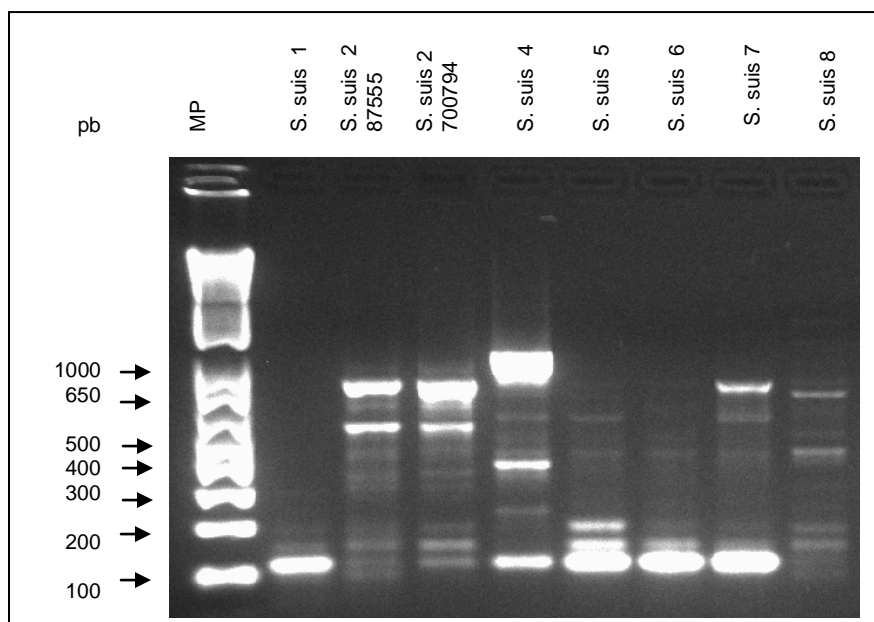
**Figura 1. PCR múltiple para la detección del gen *16SrARN* y *cps2J* de *Streptococcus suis* serotipo 2.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% con los productos de amplificación obtenidos con ADN cromosomal de *S. suis*. Carril 1: Marcador de peso de 100pb (Promega); Carriles 2,3: *S. suis* serotipo 1 (ATCC 702644), Carril 4: *S. suis* serotipo 2 (ATCC 700794), Carril 5: *S. suis* serotipo 2 (87555).



**Figura 2. Evaluación del límite de detección de la PCR para la detección del gen *cps2J* de *S. suis* serotipo 2.** Carril 1: Marcador de peso de 100pb (Promega); Carriles 2-10: Productos de amplificación obtenidos a partir de diluciones seriadas de ADN de *S. suis* serotipo 2 (ATCC 700794).

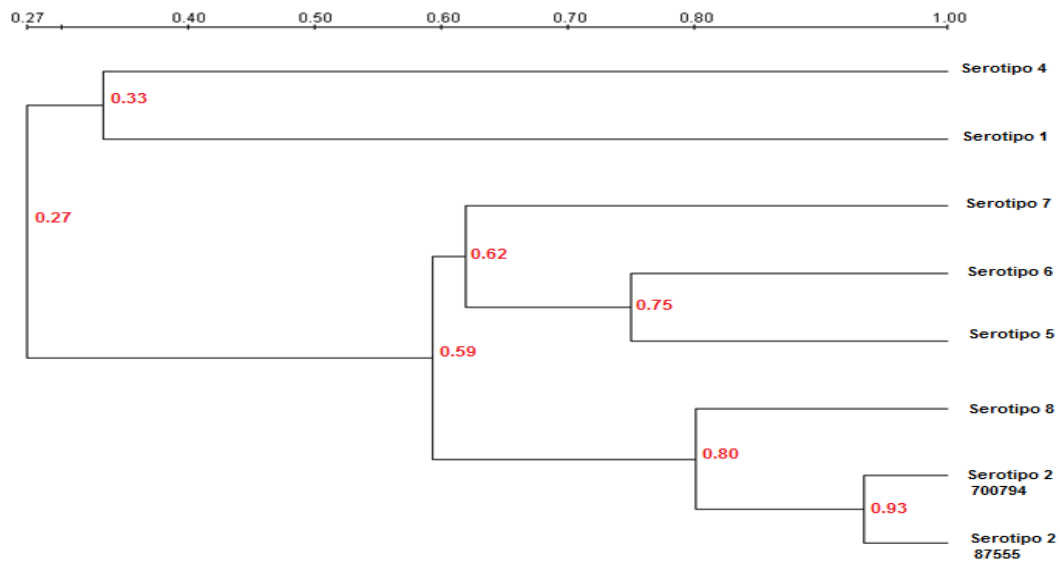


**Figura 3. Evaluación del límite de detección de la PCR para la detección del gen 16SrARN de *S. suis*.** Carril 1: Marcador de peso de 100pb (Invitrogen); Carriles 2-10: Productos de amplificación obtenidos a partir de diluciones seriadas de ADN de *S. suis* serotipo 2 (ATCC 700794).



**Figura 4. Perfiles obtenidos mediante ERIC-PCR de diferentes serotipos de *Streptococcus suis*.** Carril 1: Marcador de peso de 1 kb (Invitrogen), Carril 2: Serotipo 1 (702644), Carril 3: Serotipo 2 (87555), Carril 4: Serotipo 2 (ATCC 700794), Carril 5: Serotipo 4 (6407), Carril 6: Serotipo 5 (11538), Carril 7: Serotipo 6 (2524), Carril 8: Serotipo 7 (8074), Carril 9: Serotipo 8 (14636).





**Figura 5. Dendrograma obtenido mediante ERIC-PCR a partir de ADN cromosomal de diferentes serotipos de *S. suis*.** Calculado con el programa Quantity One v. 4.6.8, usando el método de los promedios no ponderados (UPGMA).

## DISCUSION

En esta investigación, se estandarizó y desarrolló la técnica de PCR múltiple (m-PCR) basada en la amplificación de un fragmento del gen que codifica para el 16S rRNA (16S rDNA) de *S. suis* y en la amplificación del gen *cps2J* el cual codifica para la biosíntesis capsular de *S. suis* serotipo 2 y ½ (13).

En el desarrollo y optimización de ésta técnica se emplearon cebadores previamente reportados en otros estudios (7, 14). Las condiciones óptimas de la prueba determinadas en este trabajo difieren de las condiciones reportadas previamente (7,14), esto podría explicarse debido al uso de diferentes reactivos y equipos para la estandarización de la prueba.

Los resultados obtenidos demostraron que estos cebadores detectan específicamente la especie de *Streptococcus suis* y reconocen cepas pertenecientes al serotipo 2 de *S. suis*. Todas las cepas de referencia de *S. suis* evaluadas en este estudio fueron detectadas por la m-PCR, mientras que ninguna de las otras especies bacterianas evidenciaron una reacción positiva.

En la infección experimental de tejido, para simular una muestra clínica de campo, se obtuvieron los productos de amplificación esperados. De esta forma, se pudo comprobar que la PCR, bajo las condiciones descritas, puede detectar ADN de *S. suis* en muestras clínicas como la tonsila, el cual es el

sitio de alojamiento primario del microorganismo y que se puede emplear como técnica rápida para la detección de animales infectados (portadores).

Esta PCR demostró ser igual o más sensible que otras PCR descritas previamente: la detección de la prueba múltiple desarrollada por Wisselink *et al.* (22) fue de 10 fg de ADN cromosomal en 25 µl de muestra clínica. La PCR reportada por Marois *et al.* (7) tuvo un límite de detección de 1.4 UFC para el serotipo 2 y de 0.14 UFC para *S. suis*. Por otro lado, las sensibilidades de otras PCR descritas para detectar *S. suis* reportadas por Smith *et al.* y Okwumabua *et al.* no fueron evaluadas en esos experimentos (9,12).

Se puede inferir que debido a la alta sensibilidad y especificidad de la m-PCR, ésta permitiría el análisis directo de las muestras, evitando el paso del cultivo bacteriológico. El uso de esta técnica es esencial para la identificación de cerdos portadores, los cuales juegan un papel epidemiológico importante en la infección de *S. suis* (8). Se han desarrollado otros métodos de PCR previamente para detectar la especie de *S. suis* (3,10,22). En relación con los factores de virulencia, Okwumabua *et al.* y Wisselink *et al.* han reportado dos técnicas de PCR para detectar la suilisina y el factor extracelular; dos factores de virulencia de *S. suis* (10,21).

Sin embargo, la ausencia de estas proteínas en algunas cepas virulentas pueden excluir estas pruebas dentro del diagnóstico rutinario. Además, un estudio previo demostró que estas proteínas no estaban presentes en todas las cepas de *S. suis* ni en todas las cepas virulentas europeas (2,10). En el 2003, Okwumabua *et al.* desarrollaron una PCR múltiple basada en el gen *gdh*, el cual codifica la enzima glutamato deshidrogenasa de *S. suis* serotipo 2, permitiendo la amplificación de todos los serotipos de *S. suis* (9). Este método es muy eficiente, pero fue aplicado para detectar y caracterizar *S. suis* de cultivos puros.

En cuanto a la distribución de los serotipos de *S. suis*, la situación es diferente dependiendo de la ubicación geográfica y del transcurso del tiempo.

En Colombia hasta el momento no se han hecho estudios representativos que determinen la prevalencia y distribución de los serotipos de *S. suis* en las explotaciones porcinas del país. Actualmente, existe un trabajo previo donde se detectó *S. suis* serotipo 2 en granjas porcinas (1). En ese trabajo se aislaron 120 cepas de *S. suis*, 50 de estas correspondían al serotipo 2; mientras que las 70 cepas restantes no fueron tipificables, indicando que otros serotipos de *S. suis* se encontraban infectando a los cerdos en el país (1).

Debido a que los estudios epidemiológicos e investigativos sobre la infección de *S. suis* en explotaciones porcinas son escasos en nuestro país, se hace necesario desarrollar y aplicar técnicas moleculares rápidas, sensibles y específicas que faciliten la detección de *S. suis* en campo.

Adicionalmente, en este trabajo se logró desarrollar la técnica de PCR basada en secuencias intergénicas consenso repetitivas de Enterobacterias

(ERIC-PCR) para generar huellas genómicas para *Streptococcus suis*. Mediante el uso de los cebadores (ERIC 1R y ERIC 2) usados en la ERIC-PCR, se obtuvieron perfiles o patrones de banda de los 7 serotipos evaluados, indicando que la bacteria de *S. suis* posee en su genoma este tipo de secuencias conocidas también como unidades repetitivas intergénicas (IRUs), con productos de amplificación con tamaños entre 100 pb y 1000 pb. Los serotipos y cepas se pudieron diferenciar comparando los patrones de su huella genómica. Este análisis se hizo mediante el software Quantity One v. 4.6.8., como resultado se construyó un dendograma filogenético.

El dendograma obtenido representa el nivel de similitud entre los perfiles generados a partir de 7 serotipos de *S. suis* (Fig 5). Se observan 3 grupos diferentes. El grupo 1 consiste de los serotipos 1 y 4, los cuales son los más distantes, el grupo dos consiste de los serotipos 5, 6 y 7 y el grupo 3 contiene los serotipos 2 y 8. En este último grupo se observó el alto nivel de similitud entre las dos cepas del serotipo 2 evaluadas.

Los resultados durante el desarrollo de la ERIC-PCR en este estudio mostraron una alta heterogeneidad genética entre los diferentes serotipos de *S. suis* evaluados (1,2,4,5,6,7 y 8). Esto señala la notoria diversidad genética que existe entre las cepas y serotipos de esta especie bacteriana, se puede deducir entonces que esta técnica puede ser utilizada en investigaciones epidemiológicas que incluyan la tipificación molecular de cepas de *Streptococcus suis* para establecer si existe o no una relación genómica entre las cepas involucradas en brotes clínicos en el campo.

En otras investigaciones previas, la ERIC-PCR ha sido aplicada con éxito para caracterizar aislamientos de *S. suis* (11,15,16). Esta técnica se ha aplicado en estudios de colonización de cepas virulentas y sistémicas de *S. suis* en cerdas y cerdos jóvenes (11,15) y para determinar la persistencia de cepas epidémicas a través del tiempo en explotaciones porcinas. Esta técnica ha demostrado ser una herramienta útil para la genotipificación y análisis de la variabilidad genética de aislamientos de *S. suis*.

Esta ERIC-PCR puede ser utilizada para identificar las fuentes de cepas virulentas introducidas en una explotación (trazabilidad), para detectar grupos prevalentes de cepas involucradas en la mortalidad causada por *S. suis* y para la selección de aislados que puedan ser usados en la elaboración de vacunas (bacterinas) autógenas; lo cual la convierte en una herramienta importante para la vigilancia, prevención y control de infecciones con *S. suis*.

En conclusión, los ensayos desarrollados en el presente trabajo pueden ser empleados para identificar cerdos portadores de *S. suis* serotipos 2 y 1/2 y de los demás serotipos. Además, pueden aplicarse en estudios epidemiológicos y en estudios de transmisión de *S. suis* en explotaciones porcinas, contribuyendo al control de la enfermedad en nuestro medio.

## REFERENCIAS

1. **Alvarado, J., Linero, C.** 1994. Caracterización del *Streptococcus suis* tipo 2 por huella genómica de dos áreas porcícolas del país. *Tesis de pregrado*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia. 82 p.
2. **Berthelot-Hérault, F., H. Morvan, A. M. Ke´ribin, M. Gottschalk, and M. Kobisch.** 2000. Production of muramidase released protein (MRP), extracellular factor (EF) and haemolysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular type 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Vet. Res.*31:473–479
3. **Boye M, Feenstra AA, Tegtmeier C, Andresen LO, Rasmussen SR, Bille-Hansen V.** 2000. 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*, 12: 224–32.
4. **Gottschalk, M.** 2009. Review on *Streptococcus suis* infection in pigs and the importance of the agent as a cause of human infection. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37: 73-79.
5. **Gottschalk. M.** 2002. *Streptococcus suis*: update on pathogenesis and progress on control. American Association of Swine Veterinarians. 255-260.
6. **Lun ZR, Wang QP, Chen XG, Li AX, Zhu XQ.** 2007. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis* 7: 201–209.
7. **Marois, C., Bougeard, M., Gottschalk, M and Kobish, M.** 2004. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and ½ in tonsils of live and dead pigs. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 42. No. 7:3169-3175.
8. **Marois, C., Devendec, L., Gottschalk, M., Kobish, M.** 2007. Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 71: 14-22
9. **Okwumabua O., O’Connor M, Shull E.** 2003. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett*, 218: 79–84

10. **Okwumabua, O., O. Abdelmagid, and M. M. Chengappa.** 1999. Hybridization analysis of the gene encoding a hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis* type 2: evidence for the absence of the gene in some isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 181:113–121.
11. **Oliveira, S., Batista, L., Torremorell, M., Pijoan, C.** 2001. Experimental colonization of piglets and gilts with systemic strains of *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis* to prevent disease. *The Canadian Journal of Veterinary Research.* 65:161-167.
12. **Smith, H. E., L. van Bruijnsvoort, H. Buijs, H. J. Wisselink, and M. A. Smits.** 1999. Rapid PCR test for *Streptococcus suis* serotype 7. *FEMS Microbiol. Lett.* 178:265–270.
13. **Smith, H., de Vries, R., van't Slot, R. and Smits, M.** 2000. The *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: genetic determinant for the synthesis of sialic acid. *Microbial Pathogenesis* ; 29: 127–134
14. **Smith, H., Veenbergen, V., et al.** 1999. The *cps* Genes of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 9: Development of Rapid serotype-specific PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol 37. No.10: 3146-3152.
15. **Torremorell M, Calsamiglia M, Pijoan C.** 1998a. Colonization of suckling pigs by *Streptococcus suis* with particular reference to pathogenic serotype 2 strains. *Can J Vet Res.* 62:21–26.
16. **Torremorell, M. and Pijoan, C.** 1998b. Prolonged persistence of an epidemic *Streptococcus suis* strain in a closed population. *Vet. Rec.* 143:394-395.
17. **van Ooyen, A.** 2001. Theoretical aspects of pattern analysis. In new approaches for the generation and analysis of microbial fingerprints. Amsterdam, Nederland. Elsevier.
18. **Vecht, U., L. A. M. G. van Leengoed, and E. R. M. Verheyen.** 1985. *Streptococcus suis* infections in pigs in The Netherlands (part one). *Vet. Q.* 7:315–321.
19. **Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J. R.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research.* Vol. 19, No. 24. 6823 -6831.

20. **Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R.** 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Cell Biology*. 5: 25–40
21. **Wisselink, H. J., F. H. Reek, U. Vecht, N. Stockhofe-Zurwieden, M. A. Smits, and H. E. Smith.** 1999. 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.* 67:143–157.
22. **Wisselink, H., Joosten, J. and Smith, H.** 2002. Multiplex PCR Assays for Simultaneous Detection of six Major Serotypes and Two Virulence-Associated Phenotypes of *Streptococcus suis* in Tonsillar Specimens from Pigs. *J Clin Microbiol*; 40: 2922–29.

## **CAPITULO 3**

**Detección de *Streptococcus suis* en una explotación porcina de tipo intensivo por medio de técnicas moleculares**

## Detección de *Streptococcus suis* en una explotación porcina de tipo intensivo por medio de técnicas moleculares

### RESUMEN

*Streptococcus suis* es un agente patógeno de singular importancia en los cerdos. Causa una serie de procesos patológicos que han adquirido relevancia en la producción porcina. Los portadores de *S. suis* son fuente de infección para otros cerdos y juegan un papel importante en la transmisión de estas bacterias en las piaras. En este estudio se demostró la presencia de *S. suis* en una granja porcina comercial mediante el análisis por PCR múltiple y cultivo bacteriológico de muestras tomadas a partir de cerdos clínicamente sanos. El 62.5% de las muestras fueron positivas por PCR para *S. suis*. No se obtuvo ningún aislamiento de *S. suis* por lo tanto no fue posible realizar la caracterización molecular mediante ERIC-PCR. Estos resultados mostraron que la PCR es un método más sensible que el cultivo bacteriológico y que es una herramienta útil para detectar animales portadores en una explotación, contribuyendo al diseño y desarrollo de programas de control y erradicación de la enfermedad.

---

### INTRODUCCION

La infección causada por *Streptococcus suis* constituye uno de los problemas bacterianos más importantes en la producción porcina intensiva. Esta bacteria es comensal habitual de las vías respiratorias altas de los cerdos, esporádicamente ocasionan brotes agudos de enfermedad, aunque, en numerosas ocasiones, producen patologías crónicas. La erradicación de este tipo de infecciones es complicada, debido a que la colonización ocurre muy temprano en la vida de los lechones, por lo que es frecuente que estos procesos se presenten de un modo recurrente en una misma explotación durante años (8). *S. suis* coloniza las tonsilas palatinas de cerdos sanos y enfermos (3,10). Los cerdos portadores subclínicos actúan como fuente de infección para los cerdos jóvenes susceptibles (9); la detección de estos portadores podría ofrecer un mejor entendimiento de la epidemiología de la infección de *S. suis* y puede ayudar en el desarrollo de medidas de control efectivas. Han sido numerosos los estudios encaminados a establecer las tasas de portadores de *S. suis*, que han resultado ser muy variables, dependiendo de la existencia de casos clínicos en las explotaciones muestreadas, sensibilidad de la técnica empleada, tamaño del muestreo, así como de la edad de los animales muestreados (5).



Este trabajo tuvo como objetivo detectar y caracterizar cepas de *Streptococcus suis* y *S. suis* serotipo 2 y ½ en cerdos clínicamente sanos de una explotación porcina de tipo intensivo por medio de cultivo bacteriológico y la aplicación de las técnicas moleculares de PCR múltiple y ERIC-PCR, con el fin de contribuir con el conocimiento epidemiológico de la enfermedad en nuestro medio.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Muestras**

Para la realización de este estudio se seleccionó 1 granja porcina de tipo intensivo y de ciclo completo ubicada en el departamento de Cundinamarca. La elección de la granja se realizó de acuerdo a la posibilidad de muestreo ofrecida por los propietarios y los profesionales a cargo de la granja.

Para la detección de *Streptococcus suis* en esta granja se realizó un muestreo de tipo transversal, tomando muestras al azar de animales clínicamente sanos de la línea de producción correspondientes a lechones de 1 a 4 semanas de edad y cerdas de 1 a 4 semanas postparto. En total se realizaron 3 muestreos (Tabla 1 y 2).

En el primer muestreo, se seleccionaron 5 cerdas al azar y se les tomaron hisopados nasales y vulvares, 3 cerdas tenían 1, 2 y 3 semanas posparto, mientras que las otras dos cerdas muestreadas se encontraban en la cuarta semana posparto; de cada una de estas cerdas se muestrearon 3 lechones, a los cuales se les recolectó hisopados nasales y tonsilares.

En el segundo muestreo, se evaluaron 4 grupos de cerdas correspondientes a la 1, 2, 3 y 4 semanas postparto, cada grupo estuvo conformado por 5 cerdas escogidas aleatoriamente para un total de 20 cerdas. De cada cerda se seleccionaron al azar 3 lechones para un total de 15 lechones por cada grupo de cerdas, es decir, que en total se muestrearon 60 lechones en esta granja; a cada uno de estos lechones se les tomaron hisopados tonsilares para efectos del estudio.

Finalmente, en el tercer muestreo, se seleccionaron 6 cerdas al azar y se les tomaron hisopados nasales y vulvares, tres cerdas se encontraban en la primera semana posparto, mientras que las otras 3 cerdas tenían 2, 3 y 4 semanas posparto; de cada una de estas cerdas se muestrearon 4 lechones, a los cuales se les recolectó hisopados nasales y tonsilares.

En total, se evaluaron 99 muestras de hisopados tonsilares, 39 de hisopos nasales colectados a partir de lechones, 31 hisopados nasales y 31 vulvares tomados de las cerdas. Inmediatamente después de realizar el muestreo las muestras fueron transportadas bajo condiciones de refrigeración al Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario-ICA ubicado en la ciudad de Bogotá, para su procesamiento mediante métodos bacteriológicos y moleculares.

### **Análisis microbiológico**

Las muestras recolectadas se sembraron en base de agar Columbia (Código 21112, BD) suplementado con 6% de sangre de cordero, y 0.25% de suplemento selectivo para *Streptococcus* (Oxoid SR0126E) y se incubaron a 37°C por 24 horas en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> (6). Posteriormente se seleccionaron las colonias pequeñas y puntiformes que presentaron α-hemólisis y se les realizó una coloración de Gram y la prueba de catalasa, a continuación fueron subcultivadas en caldo

Todd-Hewitt (Código 249240, BD) y agar sangre para luego ser analizadas mediante las siguientes pruebas bioquímicas para continuar con su identificación y caracterización: crecimiento en NaCl al 6.5%, hidrólisis de la esculina, Voges-Proskauer (VP) y trealosa (21).

Los aislamientos presuntivos de *Streptococcus suis* fueron confirmados mediante el sistema de identificación bioquímica miniaturizado API 20 STREP system (bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, France) (17).

**Tabla 1. Número de muestras tomadas a partir de cerdas**

Semana posparto	Muestro No. 1		Muestro No. 2		Muestro No. 3		Total
	HN <sup>a</sup>	HV <sup>b</sup>	HN	HV	HN	HV	
1	1	1	5	5	3	3	18
2	1	1	5	5	1	1	14
3	1	1	5	5	1	1	14
4	2	2	5	5	1	1	16
<b>Total</b>	5	5	20	20	6	6	
	10		40		12		62

<sup>a</sup> HN: Hisopo nasal    <sup>b</sup> HV: Hisopo vulvar

**Tabla 2. Número de muestras tomadas a partir de lechones asintomáticos**

EDAD (semanas)	Muestro No. 1		Muestro No. 2		Muestro No. 3		Total
	HN <sup>a</sup>	HT <sup>b</sup>	HN	HT	HN	HT	
1	3	3	-	15	12	12	45
2	3	3	-	15	4	4	29
3	3	3	-	15	4	4	29
4	6	6	-	15	4	4	35
<b>Total</b>	15	15	0	60	24	24	
	30		60		48		138

<sup>a</sup> HN: Hisopo nasal    <sup>b</sup> HT: Hisopo tonsilar

### Diagnostico molecular: PCR múltiple

Todas las muestras de hisopos vulvares, nasales y tonsilares de las cerdas y lechones muestreados en las granjas, fueron evaluadas mediante la técnica de PCR múltiple para detectar la especie de *Streptococcus suis* y *S. suis* serotipo 2 y 1/2; ésta m-PCR está basada en la amplificación del gen que codifica para 16S rARN de *S. suis* y en la amplificación del gen *cps2J*, tal como se describió previamente

La extracción del ADN se realizó a partir de pools hechos con las muestras recolectadas para reducir costos, utilizando el kit comercial *Qiamp Tissue kit* (QIAGEN Inc. Valencia, California); éstos pools fueron realizados a partir de los hisopos tonsilares y nasales tomados a los lechones teniendo en cuenta la edad y el tipo de muestra, así mismo, se hicieron pools de los hisopados nasales y vulvares tomados a las cerdas madres. En el caso de los lechones se incluyeron 3 muestras

(primer y segundo muestreo) y 4 muestras (tercer muestreo) de lechones de la misma camada en cada pool

Con respecto a las cerdas, se incluyeron 5 muestras en cada pool, para el primer y segundo muestreo, mientras que en el tercer muestreo se hicieron pooles de tres muestras cada uno.

## RESULTADOS

### Detección de *S. suis* en cerdas y cerdos clínicamente sanos

Para la detección de cerdos portadores de *S. suis* se evaluaron animales asintomáticos de una explotación porcina ubicada en el departamento de Cundinamarca. Se recolectaron en total 99 hisopados tonsilares y 39 hisopados nasales de lechones, 31 hisopados vulvares y 31 nasales a partir de cerdas madres. Todas las muestras fueron analizadas mediante cultivo bacteriológico y por la técnica de PCR múltiple diseñada para la detección de la especie de *Streptococcus suis* y *S. suis* serotipo 2 y ½.

### Cultivo microbiológico

Un total de 200 muestras provenientes de cerdas y lechones clínicamente sanos fueron analizadas individualmente mediante cultivo bacteriológico, tal y como se describió previamente, pero no fue posible aislar cepas de *S. suis* de ninguna muestra. Sin embargo, se logró observar una alta diversidad en la morfología de las colonias obtenidas en los cultivos, pertenecientes a otras bacterias de la flora normal del cerdo entre las que se encuentran *Streptococcus dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus* y *Pasteurella sp.*

### Diagnóstico molecular

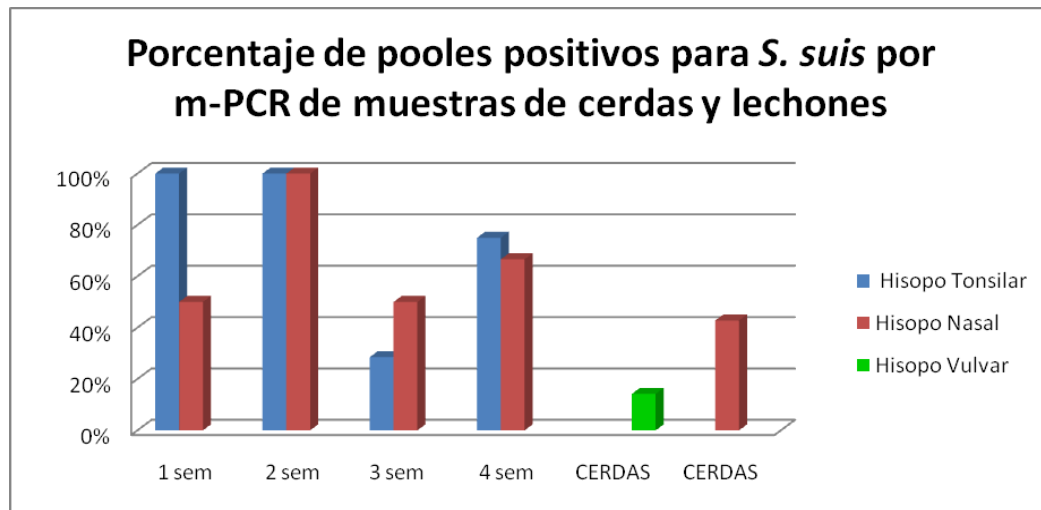
El porcentaje de los pooles hechos con las muestras de hisopados provenientes de animales clínicamente sanos que dieron resultados positivos para *Streptococcus suis* mediante la técnica de PCR múltiple se muestran en la Tabla 3. En total se analizaron 56 pooles, siendo el 62.5 % positivos para *S. suis* por m-PCR, mientras que todas las muestras analizadas fueron negativas para *S. suis* serotipo 2.

**Tabla 3. Resultados de PCR de *S. suis* en pooles de hisopados de cerdas y lechones asintomáticos**

Tipo de muestra	Lechones				Cerdas	Total pooles
	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas		
Hisopo Nasal	2/4	2/2	1/2	2/3	3/7	18
Hisopo Tonsilar	9/9	7/7	2/7	6/8	-	31
Hisopo vulvar	-	-	-	-	1/7	7
Total positivos (%)	11 (84.6)	9 (100)	3 (33.3)	8 (72.7)	4 (28.5)	56

Se pudo observar una prevalencia alta de *S. suis* en los animales estudiados. El 100%, 100%, 28.5%, 75% de las muestras de hisopados tonsilares correspondientes a lechones de 1, 2, 3 y 4 semanas de edad respectivamente fueron positivas a *S. suis*, mientras que el 50%, 100%, 50%, 66.6% de las muestras de hisopados nasales de lechones de 1, 2, 3 y 4 semanas de edad respectivamente fueron positivas a *S. suis* (Fig. 1).

Respecto a las muestras de las cerdas madres, 3 de 7 muestras de hisopos nasales fueron positivos, mientras que 1 de 7 muestras de hisopos vulvares fueron positivos para *S. suis*.



**Figura 1. Porcentaje de pools positivos para *S. suis* por PCR múltiple**

## DISCUSION

En este estudio se realizó la detección de *S. suis* en muestras de campo a partir de muestras de hisopados nasales y vulvares de cerdas e hisopados tonsilares y nasales de lechones sanos mediante técnicas microbiológicas y moleculares. Se debe destacar que se encontró una mayor presencia de *S. suis* en la amígdala donde habita normalmente si se compara con las fosas nasales (Tabla 3). Swildens *et al.* (20) demostraron que los hisopados tonsilares de lechones pueden ser utilizados en ensayos de PCR para detectar portadores de cepas virulentas de *Streptococcus suis* serotipo 2. Lo cual indica que este tipo de muestra es una herramienta eficiente para la detección rutinaria de cerdos asintomáticos portadores y lograr un control de esta bacteria en explotaciones porcinas comerciales.

Se puede pensar que la bacteria se puede detectar con mayor frecuencia en fosas nasales cuando hay brotes de la enfermedad, debido a una mayor excreción nasal. Esto podría explicar los resultados encontrados pues se trata de simple colonización quizás subclínica procedente de la madre.

La recolección de muestras de hisopados tonsilares es más fácil de realizar y no es un procedimiento traumático para los cerdos. Trabajos anteriores han empleado hisopados tonsilares para la detectar *S. suis* en animales infectados experimentalmente y en cerdas vivas (14, 19). Adicionalmente, Marois *et al.* (15) demostraron que los hisopados tonsilares son más sensibles que las muestras de biopsia de tonsila para la detección de *S. suis* en cerdas y cerdos vivos de la línea de producción.

En este estudio no se logró aislar *S. suis* a partir de las 200 muestras analizadas mediante cultivo bacteriológico, en contraste, con la m-PCR el 62.5% de las muestras fueron positivas; aunque no se detectó ADN de *S. suis* serotipo 2 y ½ en las muestras evaluadas. No obstante, los resultados reflejan la colonización con cepas y/o serotipos diferentes de *S. suis* posiblemente no patógenos, lo cual es lo esperado con este agente de la flora normal. También se podría sugerir que no existen portadores de *S. suis* serotipo 2 en la granja examinada. Los niveles bajos de células bacterianas (vivas o muertas) en las muestras recolectadas podrían explicar las diferencias en los resultados obtenidos con los dos métodos (24).

El serotipo 2, el serotipo clínico más importante, no fue detectado en este estudio mediante PCR y cultivo bacteriológico. Otros estudios han demostrado que el serotipo 2 es menos frecuente en cerdos sanos que en cerdos enfermos y que los porcentajes de colonización por cepas del serotipo 2 son más bajos que la colonización total (13,17). La granja muestreada en este estudio no presentó problemas clínicos evidentes con *S. suis* tipo 2 en la época en que se realizaron los muestreos.

Para entender las diferencias en los porcentajes de colonización entre los muestreos de la misma explotación o entre distintas explotaciones puede atribuirse a diferencias en el porcentaje de infección de *S. suis*, la cantidad de bacterias presentes en cada cerdo, el estado inmunitario e infeccioso de las cerdas, el efecto de las prácticas de manejo o de la enfermedad, el uso de antibióticos en el alimento y la calidad bacteriológica de los procedimientos utilizados para aislar *S. suis* (23).

Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de los obtenidos por Alvarado y Linero (1) en donde lograron aislar 120 cepas de *S. suis* a partir de granjas ubicadas en Cundinamarca y Antioquia; 50 de estas eran pertenecientes al serotipo 2. Esta aparente inconsistencia podría indicar una diferencia en la prevalencia actual de los serovares presentes en los 2 estudios o que probablemente aislamientos de los serotipos 2 y ½ podrían no ser las cepas predominantes en animales sanos y por lo tanto menos factible de ser cultivadas pero presentes a un nivel aún detectable por PCR. En el estudio hecho por Marois *et al.* (14) mediante una PCR basada en el gen *cps2J* encontraron que esta técnica era 20 veces más sensible que el cultivo bacteriológico para la detección de los serotipos 2 y ½.

Igualmente, se observó que *S. suis* está presente en la granja muestreada, indicando que *S. suis* está ampliamente distribuido en esta

explotación porcina en animales de diferentes edades, ya que es una bacteria ubicua y endémica en las poblaciones de cerdos que se caracteriza por colonizar a los lechones de forma muy temprana en el nacimiento o en los primeros días de vida (2, 22).

El hecho de que *Streptococcus suis* fue detectado mediante PCR en la mayoría de los animales muestreados en este estudio no es raro ya que es bien conocido que esta bacteria pertenece a la microflora normal intestinal y de los sistemas respiratorio y reproductor de los cerdos (4). *S. suis* es una especie muy heterogénea de la cual han sido descritos 33 serotipos (7, 11, 12); pero sólo pocos de estos serotipos con frecuencia se detectan en lesiones patológicas. Estudios previos han demostrado que la prevalencia de *S. suis* es alta en los cerdos de granjas comerciales (17) y que los cerdos son colonizados muy temprano en sus vidas. En las granjas estudiadas se observó que la colonización total de *S. suis* siguió un patrón similar. Los lechones fueron colonizados en etapas tempranas de su vida, y por el momento en el que ellos son destetados, la mayoría de ellos ya poseen *S. suis* en sus tonsilas, consistentes en cepas y/o serotipos de la flora normal.

Anteriormente se ha demostrado que la mayoría de los cerdos son portadores inaparentes de múltiples serotipos de *Streptococcus suis* en el tracto respiratorio superior y que las hembras pueden albergar diferentes serotipos en su mucosa vaginal (13). En este estudio se observó que la PCR múltiple detectó ADN de *S. suis* en el 84.6% de los lechones muestreados de una semana de edad y en el 14.2% de muestras de hisopados vulvares de las cerdas madres.

Estos resultados proveen una fuerte evidencia de que los lechones neonatos son colonizados desde el momento del parto debido al contacto con secreciones vaginales. Estos resultados coinciden con otro estudio realizado por Robertson y Blackmore (18), donde reportaron que los lechones provenientes de cerdas las cuales estaban colonizadas por *S. suis*, se convirtieron en portadores de esta bacteria en su tracto respiratorio superior. Sin embargo, es necesario aislar esta bacteria para lograr demostrar la transmisión vertical a nivel molecular mediante el análisis del ADN genómico a partir de un cultivo puro tanto de cepas de lechones como de madres (2).

La transmisión vertical de *Streptococcus suis* es tanto de cepas virulentas como no virulentas y por tanto el aislamiento del organismo a partir del tracto respiratorio de los lechones lactantes no es un buen predictor de aparición de sintomatología clínica. Solo el aislamiento de cepas con factores de virulencia reconocidos y relacionados con patogenicidad actuaría como un buen predictor de la aparición de un brote clínico (25).

Esta bacteria puede ser cultivada a partir muestras tonsilares por técnicas microbiológicas tradicionales, sin embargo, las tonsilas también están colonizadas por cepas no virulentas de *Streptococcus suis* y otras

especies estreptococales, las cuales son difíciles de distinguir con base en la morfología de la colonia y dificultan su identificación.

Aunque el medio selectivo utilizado (agar Columbia (Código 21112, BD) suplementado con 6% de sangre de cordero y 0.25% de suplemento selectivo para *Streptococcus* (Oxoid SR0126E)) redujo la flora contaminante recuperada de los hisopados, se pudo observar una gran variedad de cultivos mixtos muy complejos. Por ejemplo, al igual que en otros estudios (13), se observaron al menos 3 diferentes tipos de colonias hemolíticas cuando se examinaron los hisopos tonsilares en el agar sangre.

Después de realizar la caracterización bioquímica, algunas de las colonias que presentaron una morfología similar a *S. suis* fueron determinadas como *S. dysgalactiae* y *S. agalactiae*. Previamente otros estudios han reportado la existencia de estos estreptococos como parte de la flora normal del tracto respiratorio superior de los cerdos, así como otros microorganismos miembros de la familia *Pasteurellaceae* y microorganismos gram positivos como *Streptococcus sp.*, *Rothia nasimurium* y *Staphylococcus aureus* (4). Este último fue observado en la mayoría de los cultivos realizados a partir de las muestras. Es posible que las bacterias de la flora normal de la nasofaringe y la amígdala puedan haber interferido con la probabilidad de aislamiento bacteriano.

Los resultados obtenidos en este estudio sólo se podrán aplicar a la granja estudiada y no se podría generalizar. De hecho, el efecto de las diferentes condiciones de manejo en los sistemas de explotación (1 sitio, 3 sitios, Multisitio), y la presencia de otras infecciones concomitantes, tales como el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) y al Circovirus Porcino (PCV-2), puede tener una influencia sobre la transmisión de diferentes cepas de *S. suis* en una determinada piara y facilitar la expresión clínica de la enfermedad (16).

## REFERENCIAS

1. **Alvarado, J., Linero, C.** 1994. Caracterización del *Streptococcus suis* tipo 2 por huella genómica de dos áreas porcícolas del país. *Tesis de pregrado*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia. 82 p.
2. **Amass, S. F, SANMIGUEL, P., and Clark, L. K.** 1997. Demonstration of Vertical Transmission of *Streptococcus suis* in Swine by Genomic Fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 35, No. 6. p. 1595–1959.
3. **Arends JP, Hartwig N, Rudolphy M, Zanen HC.** 1984. Carrier rate of *Streptococcus suis* capsular type 2 in palatine tonsils of slaughtered pigs. *J Clin Microbiol*; 20: 945–47.

4. **Baele M, Chiers K, Devriese LA, et al.** 2001. The gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning. *J Appl Microbiol.* 91:997–1003.
5. **Davies PR, Ossowicz CJ.** 1991. Evaluation of methods used for detecting *Streptococcus suis* type 2 in tonsils, and investigation of the carrier state in pigs. *Res Vet Sci*; 50: 190–94.
6. **Durand F, Perino CL, Recule C, et al.** 2001. Bacteriological diagnosis of *Streptococcus suis* meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 20: 519–21.
7. **Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J.** 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*; 27: 2633–36.
8. **Gottschalk, M.** 2009. Revisão sobre a infecção por *Streptococcus suis* em suínos e importância do agente como causa de infecção em seres humanos. *Acta Scientiae Veterinariae.* 37 (Supl 1): s73-s79.
9. **Gottschalk, M.** 2002. *Streptococcus suis*: update on pathogenesis and progress on control. Proceedings American Association of Swine Veterinarians. 255-260.
10. **Gottschalk, M.** 2005. *Streptococcus suis* series: Part 2. A practical guide to management of related diseases. Pig Progress. Vol. 21. No. 4. 28-31.
11. **Higgins R, Gottschalk M, Boudreau M, Lebrun A, Henrichsen J.** 1995. Description of six new capsular types (29–34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Invest*; 7: 405–06.
12. **Hill J.E, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH.** 2005. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol*; 107: 63–69.
13. **MacInnes, J., Gottschalk, M., Lone, A., Metcalf, D., Ojha, S., Rosendal, T., Watson, S. and Friendship, R.** 2008. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Canadian Journal of Veterinary Research*; 72: 242-248.



14. **Marois, C., Bougeard, M., Gottschalk, M and Kobish, M.** 2004. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 42. No. 7:3169-3175.
15. **Marois, C., Devendec, L., Gottschalk, M., Kobish, M.** 2007. Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 71: 14-22.
16. **Martinez, G., Harel, J., Lacouture, S., Gottschalk, M.** 2002. Genetic diversity of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 isolates recovered from carrier pigs in closed herds. *Canadian Journal of Veterinary Research*; 66: 240-248.
17. **Mogollón, J.D., C., Pijoan, M. P. Murtaugh, J. E. Collins y P. P. Cleary.** 1991. Identification of epidemic strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 29:782-787.
18. **Robertson ID, Blackmore DK.** 1989. Prevalence of *Streptococcus suis* types 1 and 2 in domestic pigs in Australia and New Zealand. *Vet Rec*; 124: 391–94.
19. **Swildens B, Wisselink HJ, Engel B, Smith, H., Nielen, M., Verheijden, J., Stegeman, J.** 2005. Detection of extracellular factor-positive *Streptococcus suis* serotype 2 strains in tonsillar swabs of live sows by PCR. *Vet Microbiol.* 109: 223–228.
20. **Swildens, B, Wisselink, H.J., Smith, H.E., Verheijden, J.H.M.** 2000. Tonsillar swabs can be used in a PCR assay for the detection of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains in weaned piglets. The 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress. Melbourne, Australia.
21. **Tarradas C, Arenas A, Maldonado A, et al.** 1994. Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine: proposal for biochemical parameters. *J Clin Microbiol.* 32:578-580.
22. **Torremorell M, Calsamiglia M, Pijoan C.** 1998. Colonization of suckling pigs by *Streptococcus suis* with particular reference to pathogenic serotype 2 strains. *Can J Vet Res.* 62:21–26.
23. **Wisselink, H. J., F. H. Reek, U. Vecht, N. Stockhofe-Zurwieden, M. A. Smits, and H. E. Smith.** 1999. 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.* 67:143–157.

24. **Wisselink, H., Joosten, J. and Smith, H.** 2002. Multiplex PCR Assays for Simultaneous Detection of six Major Serotypes and Two Virulence-Associated Phenotypes of *Streptococcus suis* in Tonsillar Specimens from Pigs. *J Clin Microbiol*; 40: 2922–29.
25. **Zielinski, G.** 2006. Enfermedades re-emergentes: infecciones por *Streptococcus suis* y *Haemophilus parasuis*. Área Producción Animal, E.E.A INTA Marcos Juárez. 1-4 p

#### 4. DISCUSION

La infección causada por *Streptococcus suis* constituye uno de los problemas bacteriológicos más importantes en la producción porcina intensiva. Esta bacteria es comensal habitual de las vías respiratorias altas de los cerdos, esporádicamente ocasionan brotes agudos de enfermedad, aunque, en numerosas ocasiones, producen patologías crónicas. La erradicación de este tipo de infecciones es complicada, por lo que es frecuente que estos procesos se presenten de un modo recurrente en una misma explotación durante años (57).

*S. suis* coloniza las tonsilas palatinas de cerdos sanos y enfermos (8, 129). Los cerdos portadores subclínicos actúan como fuente de infección para los cerdos jóvenes susceptibles (66); la detección de estos portadores puede ofrecer un mejor entendimiento de la epidemiología de la infección de *S. suis* y puede ayudar en el desarrollo de medidas de control efectivas. Han sido numerosos los estudios encaminados a establecer las tasas de portadores de *S. suis*, que han resultado ser muy variables, dependiendo de la existencia de casos clínicos en las explotaciones muestreadas, sensibilidad de la técnica empleada, tamaño del muestreo, así como de la edad de los animales muestreados (33,36).

En este trabajo, se desarrolló la técnica de PCR múltiple (m-PCR) basada en la amplificación de un fragmento del gen que codifica para el 16S rRNA (16S rDNA) de *S. suis* y en la amplificación del gen *cps2J* el cual codifica para la biosíntesis capsular de *S. suis* serotipo 2 y ½ (110). A su vez, se evaluó su aplicabilidad para detectar la especie de *S. suis* y *S. suis* serotipo 2 y ½ en animales portadores sanos.

En el desarrollo y optimización de ésta técnica se usaron primers previamente reportados en otros estudios (80, 110). Las condiciones óptimas de la prueba determinadas en este trabajo difieren de las condiciones

reportadas previamente (80, 110), esto podría explicarse debido al uso de diferentes reactivos y equipos para la estandarización de la prueba.

Los resultados obtenidos demuestran que estos primers detectan específicamente la especie de *Streptococcus suis* y reconocen cepas pertenecientes al serotipo 2 de *S. suis*. Todas las cepas de referencia de *S. suis* evaluadas en este estudio fueron detectadas por la m-PCR, mientras que ninguna de las otras especies bacterianas mostraron una reacción positiva.

Para probar la especificidad de la técnica, se realizaron distintas reacciones de PCR con 10 ng de ADN cromosomal de cepas de referencia disponibles en el laboratorio de *S. suis* de los serotipos: 1,2, 4, 5, 6,7 y 8, y otras especies bacterianas comúnmente encontradas en las tonsilas de los cerdos. No se obtuvieron productos de amplificación con ninguna de las cepas examinadas. Lo anterior demuestra que la especificidad *in vitro* de la prueba es de 100%.

La sensibilidad de esta PCR fue evaluada *in vitro* con tonsilas experimentalmente infectadas con una cepa de referencia *S. suis* tipo 2 y se encontró que fue de 900 UFC de *S. suis*/ml de muestra de tonsila, igualmente se evaluó a partir de diluciones seriadas de ADN purificado de *S. suis*, dando como resultado un límite de detección de 24.8 pg.

En la infección experimental de tejido, se obtuvieron los productos de amplificación esperados. De esta forma, se pudo comprobar que la PCR, bajo las condiciones descritas, puede detectar ADN de *S. suis* en muestras tisulares como la tonsila, el cual es el sitio de la replicación primaria del microorganismo y que se puede emplear como técnica rápida para la detección de animales infectados.

Esta PCR demostró ser igual o más sensible que otras PCR descritas previamente: la detección de la prueba múltiple desarrollada por Wisselink *et al.* (143) fue de 10 fg de ADN cromosomal en 25 µl de muestra clínica. Por

otro lado, las sensibilidades de otras PCR desarrolladas para detectar *S. suis* descritas por Smith *et al.* y Okwumabua *et al.* no fueron evaluadas (92, 110).

La evaluación de la m-PCR con muestras de hisopados nasales, tonsilares y vulvares tomadas a partir de animales clínicamente sanos, al igual que, en muestras tisulares, demostró que es una prueba sensible y específica para detectar *S. suis* en cerdos portadores. Adicionalmente, se observó que la m-PCR fue más rápida y sensible que el cultivo bacteriológico; el cultivo presenta el inconveniente de que su resultado puede demorar hasta 4 días y en aquellos animales con tratamiento antimicrobiano previo, puede resultar negativo. Por lo tanto, esta técnica puede ser una importante herramienta diagnóstica para la detección de cerdos portadores de *S. suis* en explotaciones porcinas, facilitando el diseño y ejecución de programas de control y erradicación de la enfermedad.

La alta sensibilidad y especificidad de la m-PCR, permite el análisis directo de las muestras, evitando el paso del cultivo. El uso de esta técnica es esencial para la identificación de cerdos portadores, los cuales juegan un papel epidemiológico importante en la infección de *S. suis* (81). Otros métodos de PCR han sido desarrollados previamente para detectar la especie de *S. suis* (19, 143,145). Okwumabua *et al.* y Wisselink *et al.* han reportado dos técnicas de PCR para detectar dos de los factores de virulencia de *S. suis*, la suilisina y el factor extracelular, respectivamente (94,131).

Sin embargo, la ausencia de estas proteínas en algunas cepas virulentas pueden excluir estas pruebas dentro del diagnóstico rutinario. Además, un estudio previo demostró que estas proteínas no estaban presentes en todas las cepas de *S. suis* ni en todas las cepas virulentas europeas (16,94). En el 2003, Okwumabua *et al.* desarrollaron una PCR múltiple basada en el gen *gdh*, el cual codifica la enzima glutamato deshidrogenasa de *S. suis* serotipo 2, permitiendo la amplificación de todos los serotipos de *S. suis* (92). Este

método es muy eficiente, pero fue aplicado para detectar y caracterizar *S. suis* de cultivos puros.

Por otro lado, la PCR múltiple desarrollada en este estudio, permite detectar todos los serotipos de *S. suis* y más específicamente los serotipos 2 y ½ en muestras tisulares y en hisopados. Este serotipo es el más frecuentemente implicado en procesos clínicos y ha sido aislado en la mayoría de los brotes clínicos diagnosticados en todos los países (55). Adicionalmente, *S. suis* puede causar enfermedad en humanos; la mayoría de los casos clínicos documentados están asociados al serotipo 2 (29,145).

En cuanto a la distribución de serotipos de *S. suis*, la situación es diferente dependiendo de la ubicación geográfica y del transcurso del tiempo. Por ejemplo, la distribución de los serotipos en Canadá ha estado cambiando los últimos años. El porcentaje de cepas de *S. suis* serotipo 2 aisladas de animales enfermos disminuyó de 22 a 15% en el año 1999, y en el 2007 se redujo al 12.5% (55, 86). Esta situación es muy diferente de la observada en países Europeos como Francia, Italia y España donde más del 60% de los aislamientos recuperados de animales enfermos pertenecen al serotipo 2 (16). Bajo circunstancias específicas, algunas cepas correspondientes a otros serotipos de *S. suis* pueden ser altamente virulentas, tal es el caso del serotipo 14 en El Reino Unido y Suecia y los serotipos ½ y 5 en Canadá (55).

En Australia, Países bajos y Alemania, *S. suis* serotipo 9 es frecuentemente aislado de cerdos enfermos, mientras que el serotipo 7 es el más prevalente en Finlandia (144). Lo anterior demuestra la amplia distribución que existe de los diferentes serotipos de *S. suis* en cerdos.

En Colombia hasta el momento no se han hecho estudios que determinen la prevalencia y distribución de los serotipos de *S. suis* en las explotaciones porcinas. Actualmente, sólo existe un trabajo donde se demuestra la presencia de *S. suis* serotipo 2 en granjas porcinas (3). En este trabajo se evaluaron 200 muestras recolectadas de lechones clínicamente sanos entre 5 – 8 semanas de edad pertenecientes a dos granjas ubicadas

en los departamentos de Antioquia y Cundinamarca. A partir de estas muestras se obtuvieron 120 aislamientos de cepas de *S. suis*, 50 de estas correspondían al serotipo 2; lo anterior evidencia la presencia de este serotipo en las granjas estudiadas. Adicionalmente, los 70 aislamientos restantes indican que otros serotipos de *S. suis* se encuentran infectando a los cerdos (3).

Debido a que este estudio fue realizado hace varios años, el propósito del presente trabajo es contribuir al conocimiento actual de la epidemiología de la enfermedad mediante el desarrollo y aplicación de técnicas moleculares como la PCR múltiple para detectar animales portadores de *S. suis* y *S. suis* serotipo 2, el cual, como se menciona anteriormente, es el más reportado a nivel mundial en brotes clínicos de *S. suis* y la ERIC-PCR para caracterizar aislamientos de esta bacteria por genotipificación.

En este estudio, la detección de *S. suis* en muestras de campo se realizó a partir de muestras de hisopados nasales y vulvares de cerdas e hisopados tonsilares y nasales de lechones sanos mediante técnicas microbiológicas y moleculares. Swildens *et al.* (115) demostraron que los hisopados tonsilares de lechones pueden ser utilizados en ensayos de PCR para detectar portadores de cepas virulentas de *Streptococcus suis* serotipo 2. Lo cual indica que este tipo de muestra es una herramienta eficiente para la detección rutinaria de cerdos asintomáticos portadores y lograr la erradicación de esta bacteria en explotaciones porcinas comerciales.

La recolección de muestras de hisopados tonsilares es más fácil de realizar y no es un procedimiento traumático para los cerdos. Trabajos anteriores han empleado hisopados tonsilares para la detectar *S. suis* en animales infectados experimentalmente y en cerdas vivas (80, 114). Adicionalmente, Marois *et al.* (81) demostraron que los hisopados tonsilares son más sensibles que las muestras de biopsia de tonsila para la detección de *S. suis* en cerdas y cerdos vivos de la línea de producción.

En este estudio no se logró aislar *S. suis* a partir de las 200 muestras analizadas mediante cultivo bacteriológico, mientras que con la m-PCR el 62.5% de las muestras fueron positivas; aunque no se detectó ADN de *S. suis* serotipo 2 y ½ en las muestras evaluadas. Los niveles bajos de células bacterianas (vivas o muertas) en las muestras recolectadas pueden explicar las diferencias en los resultados obtenidos con los dos métodos (143).

El serotipo 2, el serotipo clínico más importante, no fue detectado en este estudio mediante PCR y cultivo bacteriológico. Otros estudios han demostrado que el serotipo 2 es menos frecuente en cerdos sanos que en cerdos enfermos y que los porcentajes de colonización por cepas del serotipo 2 son más bajos que la colonización total (79,89). La granja muestreada en este estudio no presentó problemas evidentes con *S. suis* en la época en que se realizaron los muestreos.

Las diferencias en los porcentajes de colonización entre los muestreos de la misma explotación o entre distintas explotaciones puede atribuirse a diferencias en la prevalencia de *S. suis*, la cantidad de bacterias presentes en cada cerdo, el estado inmunitario e infeccioso de las cerdas, el efecto de las prácticas de manejo o de la enfermedad y la calidad bacteriológica de los procedimientos utilizados para aislar *S. suis* (142).

Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de los obtenidos por Alvarado y Linero (3) en donde lograron aislar 120 cepas de *S. suis* a partir de granjas ubicadas en Cundinamarca y Antioquia; 50 de estas eran pertenecientes al serotipo 2. Esta aparente inconsistencia podría indicar una diferencia en la prevalencia actual de los serovares presentes en los 2 estudios o que probablemente aislamientos de los serotipos 2 y ½ podrían no ser las cepas predominantes en animales sanos y por lo tanto menos factible de ser cultivadas pero presentes a un nivel aún detectable por PCR. En el estudio hecho por Marois *et al.* (80) mediante una PCR basada en el gen *cps2J* encontraron que esta técnica era 20 veces más sensible que el cultivo bacteriológico para la detección de los serotipos 2 y ½.



Igualmente, se observó que *S. suis* está presente en la granja muestreada, indicando que *S. suis* está ampliamente distribuido en esta explotación porcina en animales de diferentes edades, ya que es una bacteria ubicua en las poblaciones de cerdos y se caracteriza por colonizar a los lechones de forma muy temprana (5,123).

El hecho de que *Streptococcus suis* fue detectado mediante PCR en la mayoría de los animales muestreados en este estudio no es raro ya que es bien conocido que esta bacteria pertenece a la microflora normal intestinal y de los sistemas respiratorio y reproductor de los cerdos (11, 40). *S. suis* es una especie muy heterogénea en la cual 33 serotipos han sido descritos (53, 65, 68); pero sólo pocos de estos serotipos son frecuentemente encontrados en lesiones. Estudios previos han demostrado que la prevalencia de *S. suis* es alta en los cerdos de granjas comerciales (89) y que los cerdos son colonizados muy temprano en sus vidas. La colonización total de *S. suis* siguió un patrón similar en la granja estudiada. Los lechones fueron colonizados en etapas tempranas de su vida, y por el momento en el que ellos son destetados, la mayoría de ellos ya poseen *S. suis* en sus tonsilas.

Anteriormente se ha demostrado que la mayoría de los cerdos son portadores inaparentes de múltiples serotipos de *Streptococcus suis* en el tracto respiratorio superior y que las hembras pueden albergar diferentes serotipos en su mucosa vaginal (66, 79). En este trabajo se observó que la PCR múltiple detectó ADN de *S. suis* en el 84.6% de las muestras tomadas a partir de lechones de una semana de edad y en el 14.2% de muestras de hisopados vulvares de las cerdas madres.

Estos resultados proveen una fuerte evidencia de que los lechones neonatos son colonizados desde el momento del parto debido al contacto con secreciones vaginales. Nuestros resultados coinciden con otro estudio realizado por Robertson y Blackmore (113), donde reportaron que los lechones provenientes de cerdas las cuales estaban colonizadas por *S. suis*, se convirtieron en portadores de esta bacteria en su tracto respiratorio

superior. Sin embargo, es necesario aislar esta bacteria para lograr demostrar la transmisión vertical a nivel molecular mediante el análisis del ADN genómico a partir de un cultivo puro (5).

La transmisión vertical de *Streptococcus suis* es tanto de cepas virulentas como no virulentas y por tanto el aislamiento del organismo a partir del tracto respiratorio de los lechones lactantes no es un buen predictor de aparición de sintomatología clínica. Solo el aislamiento de cepas con factores de virulencia reconocidamente relacionados a patogenicidad actuaría como un buen predictor de la aparición de un brote clínico (151).

El principio en el que subyace el control de las infecciones estreptocócicas, incluida la meningitis, es la comprensión de que la transmisión de la infección es inicialmente vertical, de la cerda al lechón, seguido de transmisión lateral a través de las prácticas habituales de manejo en las salas de partos. Una parte de la población de reproductoras será portadora sana de la infección, y esas cerdas vivirán en un estado de equilibrio entre la infección (transmisión) y la inmunidad. Estas cerdas portadoras no sólo pasarán la infección a sus crías a través de la vagina durante el parto, sino también a través de la piel y la saliva en los primeros momentos tras el nacimiento. También aportarán anticuerpos maternos, que protegerán a los lechones una vez colonizados por la infección, que se aloja habitualmente en las tonsilas. Las infecciones concomitantes, los factores de estrés y una baja ingestión de calostro perturbarán el equilibrio entre colonización e inmunidad, y entonces el lechón sucumbirá a la infección (58, 59).

Esta bacteria puede ser cultivada a partir muestras tonsilares por técnicas microbiológicas tradicionales, sin embargo, las tonsilas también están colonizadas por cepas no virulentas de *Streptococcus suis* y otras especies estreptococales, las cuales son difíciles de distinguir en base a la morfología de la colonia.

Aunque el medio selectivo utilizado (agar Columbia (Código 21112, BD) suplementado con 6% de sangre de cordero y 0.25% de suplemento selectivo para *Streptococcus* (Oxoid SR0126E)) redujo la flora contaminante recuperada de los hisopados, se pudo observar una gran variedad de cultivos mixtos muy complejos. Por ejemplo, al igual que en otros estudios (79), al menos 3 diferentes tipos de colonias hemolíticas fueron vistas cuando los hisopos tonsilares fueron sembrados en el agar sangre.

Después de realizar la caracterización bioquímica, algunas de las colonias que presentaron una morfología similar a *S. suis* fueron determinadas como *S. dysgalactiae* y *S. agalactiae*. Previamente otros estudios han reportado la existencia de estos estreptococos como parte de la flora normal del tracto respiratorio superior de los cerdos, así como otros microorganismos miembros de la familia *Pasteurellaceae* y microorganismos gram positivos como *Streptococcus sp.*, *Rothia nasimurium* y *Staphylococcus aureus* (11, 40). Este último fue observado en la mayoría de los cultivos realizados a partir de las muestras.

Otro objetivo que tuvo este estudio fue el de genotipificar los aislamientos de *S. suis* que se obtuvieran a partir de las muestras de campo evaluadas, a través de la amplificación de elementos repetitivos mediante el uso de la ERIC-PCR, para determinar si existe variabilidad genética entre las cepas que se lograran aislar. Para esto en este trabajo se desarrolló la prueba de ERIC-PCR.

La técnica de PCR basada en secuencias intergénicas consenso repetitivas de Enterobacterias (ERIC-PCR) fue utilizada para generar huellas genómicas para *Streptococcus suis*. Mediante el uso de los primers (ERIC 1R y ERIC 2) usados en la ERIC-PCR, se obtuvieron perfiles o patrones de banda de los 7 serotipos evaluados, indicando que la bacteria de *S. suis* posee en su genoma este tipo de secuencias conocidas también como unidades repetitivas intergénicas (IRUs), con productos de amplificación con tamaños entre 100 pb y 1000 pb. Las cepas pudieron diferenciarse

comparando los patrones de su huella genómica. Este análisis se hizo mediante el software Quantity One v. 4.6.8., como resultado se construyó un dendograma filogenético.

El dendograma obtenido representa el nivel de similitud entre los perfiles generados a partir de 7 serotipos de *S. suis*. Se observan 3 grupos diferentes. El grupo 1 consiste de los serotipos 1 y 4, los cuales son los más distantes, el grupo dos consiste de los serotipos 5, 6 y 7 y el grupo 3 contiene los serotipos 2 y 8. En este último grupo se observa el alto nivel de similitud entre las dos cepas del serotipo 2 evaluadas.

Los resultados durante el desarrollo de la ERIC-PCR en este estudio mostraron una alta diversidad de polimorfismo entre los diferentes serotipos de *S. suis* evaluados (1,2,4,5,6,7 y 8). Lo anterior, muestra que esta técnica puede ser utilizada en investigaciones epidemiológicas que incluyan la tipificación molecular de cepas de *Streptococcus suis* para establecer si existe una relación genómica entre las cepas involucradas en brotes.

Las diferencias entre los aislamientos de *S. suis* a nivel genético han sido previamente estudiadas. En general, niveles considerablemente altos de diversidad genética se han observado dentro y entre los serotipos de *S. suis*. Sin embargo, la mayoría de los estudios fueron realizados con cepas de diferentes regiones geográficas (12,100,113). Además, existe información limitada con respecto a la diversidad entre los aislamientos de un determinado serotipo de *S. suis* recuperado de cerdos portadores pertenecientes a piaras endémicamente no afectadas, ya que todos los estudios fueron realizados con aislados de granjas con manifestaciones clínicas de la infección por *S. suis* (89, 123,124).

Las secuencias ERIC se encuentran tanto en bacterias gran positivas como gran negativas. Los elementos ERIC han sido descubiertos en regiones intergénicas no codificantes, estos elementos tienen una longitud de 126 pb y son altamente conservados. La posición de las secuencias ERIC en los genomas bacterianos varían entre las diferentes especies y han sido

utilizadas como marcador genético para caracterizar aislamientos dentro de una especie bacteriana (131, 132). Por esta razón, la ERIC-PCR puede ser usada para incrementar la eficiencia en el estudio de la distribución genética de cepas de *Streptococcus suis*. En estudios previos, la técnica de ERIC-PCR ha usada con éxito para realizar la tipificación molecular de muchas especies bacterianas incluyendo *E. coli*, *Bacillus* spp. *Salmonella*, *V. cholera*, *Pseudomonas*, *V. parahaemolyticus* (152).

Anteriormente, la ERIC-PCR ha sido aplicada con éxito para caracterizar aislamientos de *S. suis* (95,123,124). Esta técnica se ha aplicado en estudios de colonización de cepas virulentas y sistémicas de *S. suis* en cerdas y cerdos jóvenes (95, 123) y para determinar la persistencia de cepas epidémicas a través del tiempo en explotaciones porcinas. Esta técnica ha demostrado ser una herramienta útil para la genotipificación y análisis de la variabilidad genética de aislamientos de *S. suis*.

En el presente trabajo, no se logró realizar la genotipificación mediante la ERIC-PCR a partir de las muestras de campo, debido a que no se obtuvo ningún aislamiento de *S. suis*. Para la aplicación de esta técnica es necesario obtener previamente ADN bacteriano purificado a partir de cultivos puros del microorganismo, ya que, como se dijo anteriormente los primers ERIC no son específicos de especie, y permiten la amplificación de regiones en genomas tanto de bacterias gram positivas como gram negativas (132).

Sin embargo, la técnica de ERIC-PCR desarrollada en este estudio con cepas de referencia de distintos serotipos de *S. suis* demuestra que es una herramienta eficiente que se puede emplear en estudios que contribuyan al conocimiento de la epidemiología de la enfermedad en el país, permitiendo identificar la variabilidad genética dentro y entre los diferentes serotipos de *S. suis*. Se ha observado la alta variabilidad genética existente entre aislamientos de campo de *S. suis*, por lo tanto, es importante tener en cuenta, que mediante el empleo de esta técnica se podrá identificar las

diferencias entre cepas patógenas y no patógenas en estudios futuros que se realicen en explotaciones porcinas del país (133).

Esta ERIC- PCR puede ser utilizada para identificar las fuentes de cepas virulentas introducidas en una explotación, para detectar grupos prevalentes de cepas involucradas en la mortalidad causada por *S. suis* y para la selección de aislados que puedan ser usados en la elaboración de vacunas autógenas; lo que la convierte en una herramienta importante la vigilancia, prevención y control de infecciones con *S. suis* (133).

Los resultados obtenidos en este estudio sólo se podrán aplicar a la granja estudiada y no deben hacerse generalizaciones. De hecho, el efecto de las diferentes condiciones de manejo de la explotación (1 sitio, 3 sitios, Multisitio), y la presencia de otras infecciones, tales como el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), puede tener una influencia sobre la transmisión de diferentes cepas de *S. suis* en una determinada piara (82).

## 5. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se logró desarrollar dos técnicas moleculares: una PCR múltiple para la detección de *Streptococcus suis* y *S. suis* serotipo 2 y ½ y la ERIC-PCR para la tipificación molecular de cepas de *S. suis*.
- Los resultados obtenidos demostraron la sensibilidad y la especificidad de esta PCR múltiple y permiten recomendar su uso en la determinación de la infección natural con la bacteria *Streptococcus suis* en poblaciones porcinas.
- Los resultados evidencian que la PCR múltiple es una técnica que presenta grandes ventajas en la detección de *Streptococcus suis* frente a los métodos bacteriológicos tradicionales. Es un método específico y rápido, ya que el proceso de extracción de ADN, amplificación del mismo y electroforesis pueden ser llevados a cabo dentro de 24 horas. La sensibilidad es alta, porque permite detectar bajas concentraciones del ADN de *S. suis* en casi cualquier tipo de muestra clínica (hisopados, tejidos).
- La ERIC-PCR es una técnica de genotipificación fácil y rápida, haciéndola útil para investigaciones epidemiológicas de rutina.
- Mediante la aplicación de la ERIC-PCR se puede determinar la variabilidad genética que presentan distintas cepas de *S. suis*, la cual debe ser tomada en cuenta en futuros trabajos clínicos y epidemiológicos, en el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y en el desarrollo de bacterinas (autovacunas) para esta enfermedad.

- Los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR múltiple, demostraron que existe un alto porcentaje de animales portadores asintomáticos en la granja estudiada. Desde un punto de vista epidemiológico, estos cerdos portadores clínicamente sanos pueden jugar un papel fundamental en el mantenimiento y difusión de la infección de cepas no patógenas de *Streptococcus suis*.



## 6. RECOMENDACIONES

- Es importante desarrollar y aplicar otras técnicas moleculares que detecten específicamente otros serotipos de *Streptococcus suis* de relevancia clínica, así como marcadores de virulencia de *S. suis* para obtener información epidemiológica de la enfermedad.
- Es necesario realizar otros estudios para lograr entender las interacciones de esta bacteria con agentes virales como PRRS y Circovirus Porcino tipo 2.
- Se deben emplear medios de cultivo selectivos para lograr aislar cepas de *S. suis* a partir de muestras clínicas con alta contaminación bacteriana.
- Es importante realizar análisis comparativos mediante la secuenciación de los productos obtenidos por PCR en estudios epidemiológicos moleculares de la enfermedad causada por *S. suis*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aarestrup FM, Jorsal SE, Jensen NE. 1998. Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Vet Microbiol*; 60: 59–66.
2. Allen, A., Bolito, S., Lindsay, H., Khan S., Bryant, C., Norton, P., Ward, P., Leigh, J., Morgan, J., Riches, H., Eastty, S. and Maskell, D. 2001. Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin. *Infect. Immun.* 69: 2732-2735.
3. Alvarado, J., Linero, C. 1994. Caracterización del *Streptococcus suis* tipo 2 por huella genómica de dos áreas porcícolas del país. *Tesis de pregrado*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia. 82 p.
4. Amass, S. 2000. *Streptococcus suis*: What's New?. American Association of Swine practitioners. 315-317.
5. Amass, S. F, SANMIGUEL, P., and Clark, L. K. 1997. Demonstration of Vertical Transmission of *Streptococcus suis* in Swine by Genomic Fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 35, No. 6. p. 1595–1599.
6. Amass, S. F. Stevenson, G.w., Vyverberg, B.D., Huxford, T.W. 2000. Administration of a homologous bacterin to sows pre-farrowing provided partial protection against streptococcosis in their weaned pigs. *Swine Health and Production*, Vol. 8. No. 5. 217-219.
7. Amass, S.F. Wu, C.C, Clark, L.K. 1996. Evaluation of antibiotics for the elimination of the tonsillar carrier state of *Streptococcus suis* in pigs. *J Vet Diagn Invest.* 8: 64-67.
8. Arends JP, Hartwig N, Rudolphy M, Zanen HC. 1984. Carrier rate of *Streptococcus suis* capsular type 2 in palatine tonsils of slaughtered pigs. *J Clin Microbiol*; 20: 945–47.
9. Arends JP, Zanen HC. 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis.* 10: 131–37.
10. Auer J, Berent R, Porodko M, Eber B. 2001. Streptococcus infection and splenectomy. *Lancet*, 357: 1130.

11. Baele M, Chiers K, Devriese LA, et al. 2001. The gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning. *J Appl Microbiol.* 91:997–1003.
12. Beaudoin, M., J. Harel, R. Higgins, M. Gottschalk, M. Frenette, and J. McInnes. 1992. Molecular analysis of isolates of *Streptococcus suis* capsular type 2 by restriction-endonuclease-digested DNA separated on SDS-PAGE and by hybridization with an rDNA probe. *J. Gen. Microbiol.* 138:2639–2645.
13. Belkum, A., Scherer, S. Alphen, L, Verbrugh, H. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 62, no. 2. p. 275–293.
14. Bently, R. W., Leigh, J.A., Collins, M.D. 1991. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol*; 41: 487-494.
15. Berthelot-Herault F, Marois C, Gottschalk M, Kobisch M. 2002. Genetic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and humans as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*; 40: 615–19.
16. Berthelot-Hérault, F., H. Morvan, A. M. Ke´ribin, M. Gottschalk, and M. Kobisch. 2000. Production of muramidase released protein (MRP), extracellular factor (EF) and haemolysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular type 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Vet. Res.*31:473–479.
17. Blouin, C. 1994. Evaluation of the antibody response in pigs vaccinated against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a double-antibody sandwich ELISA. *Can J Vet Res* 58: 49-54.
18. Blume V, Luque I, Vela AI, Borge C, Maldonado A, Domínguez L, Tarradas C, Fernández-Garayzábal JF. 2009. Genetic and virulence-phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of *Streptococcus suis* swine isolates. *Int Microbiol.*12(3):161-6.
19. Boye M, Feenstra AA, Tegtmeier C, Andresen LO, Rasmussen SR, Bille-Hansen V. 2000. 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*, 12: 224–32.

20. Brousseau R, Hill JE, Prefontaine G, Goh SH, Harel J, Hemmingsen SM. 2001. *Streptococcus suis* serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences. *Appl Environ Microbiol*; 67: 4828–33.
21. Busque, P. Higgins, R., Caya, F. 1997. Immunization of pigs against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a live avirulent strain. *Canadian Journal of Veterinary Research*; 61: 275-279.
22. Cantin, M., Harel, J., Higgins, R., Gottschalk, M. 1992. Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *Streptococcus suis* isolates. *J. Vet. Invest.* 4:170-174.
23. Charland N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse, and M. Gottschalk. 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* 144:325–332.
24. Charland, N., Jacques, M., Lacouture, S. and Gottschalk, M. 1997. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. *Microbiology* 143, 3607-3614.
25. Charland, N., Kobisch, M., Martineau-Doize! , B., Jacques, M. and Gottschalk, M. 1996. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* 14, 195-203.
26. Charland, N., Nizer, V., Rubens, C., Kim, K., Lacouture, S., Gottschalk, M. 2000. *Streptococcus suis* interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* 68: 637-643.
27. Chatellier S, Harel J, Zhang Y, et al. 1998. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Int J Syst Bacteriol*; 48 (pt 2): 581–89.
28. Chatellier, S., M. Gottschalk, R. Higgins, R. Brousseau, and J. Harel. 1999. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *J. Clin. Microbiol.* 37:362–366.
29. Chen C, Tang J, Dong W, Wang C, Feng Y, et al. 2007. A Glimpse of Streptococcal Toxic Shock Syndrome from Comparative Genomics of *S. suis* 2 Chinese Isolates. *PLoS ONE* 2(3): e315

30. Clark LK, Hill MA, Kniffen TS. 1994. An evaluation of the components of medicated early weaning. *J Swine Health Prod* ; 2(3):5-11.
31. Clifton-Hadley FA, Enright MR. 1984a. Factors affecting the survival of *Streptococcus suis* type 2. *Vet Rec*; 114: 584–86.
32. Clifton-Hadley, F.A. 1984b. Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. *Vet Res Commun*. 8:217-227.
33. Clifton-Hadley, F.A. 1985. Epidemiology of *Streptococcus suis* type 2 infection. *Veterinary Annual*, 25: 161-166.
34. Clifton-Hadley, F.A.; and T. J.L. Alexander. 1989. Diagnóstico de la infección por *Streptococcus suis* en el cerdo. *The Veterinary Record*, 9: 185-187.
35. Costa AT, Lobato FC, Abreu VL, Assis RA, Reis R, Uzal FA. 2005. Serotyping and evaluation of the virulence in mice of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 47: 113–115.
36. Davies PR, Ossowicz CJ. 1991. Evaluation of methods used for detecting *Streptococcus suis* type 2 in tonsils, and investigation of the carrier state in pigs. *Res Vet Sci*; 50: 190–94.
37. de Moor, C.E. 1963. Septicaemic infections in pigs caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R, S and T. *Antonie Leeuwenhoek J Microbiol Serol* 29:272-280.
38. del Campo Sepulveda EM, Altman E, Kobisch M, D’Allaire S, Gottschalk M. 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Vet Microbiol*; 52: 113–25.
39. Devriese LA, Cruz Colque JI, De Herdt P, Haesebrouck F. 1992. Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. *J Appl Bacteriol*; 73: 421–25.
40. Devriese, LA, Hommez, J, Pot, B, Haesebrouck, F. 1994. Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. *J Appl Bact*. 77: 31-36.

41. Du YP, Qian WJ, Xu GB. 2000. Investigation on 8 human cases with meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *Chin J Prev Med*; 34: 305 (in Chinese).
42. Durand F, Perino CL, Recule C, et al. 2001. Bacteriological diagnosis of *Streptococcus suis* meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 20: 519–21.
43. Elliott, S.D. 1966. Streptococcal infections in young pigs. I. An immunological study of the causative agent (PM *Streptococcus*). *J Hyg (Camb)* 64:205-212.
44. Erickson, E.D.; Doster, A.R. and Pokorny, T.S. 1984. Isolation of *Streptococcus suis* from swine in Nebraska. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 185: 666-668.
45. Field HI, Buntain D, Done JT. 1954. Studies on piglet mortality. I. Streptococcal meningitis and arthritis. *Vet Rec*. 66:453-455.
46. Fongcom A, Pruksakorn S, Mongkol R, Tharavichitkul P, Yoonim N. 2001. *Streptococcus suis* infection in northern Thailand. *J Med Assoc Thai*; 84: 1502–08.
47. Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J. S., Manning, S. D., Marrs, C. F. 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspect Innov*: 2: 10.
48. Francois B, Gissot V, Ploy MC, Vignon P. 1998. Recurrent septic shock due to *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*; 36: 2395.
49. Galina, L., C. Pijoan, M. Sitjar, W. T. Christianson, K. Rossow, and J. E. Collins. 1994. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet. Rec*. 134:60–64.
50. Gallagher F. 2001. Streptococcus infection and splenectomy. *Lancet*; 357: 1129–30.
51. Geffner Sclarsky DE, Moreno MR, Campillo Alpera MS, Pardo FJ, Gomez GA, Martinez-Lozano MD. 2001. *Streptococcus suis* meningitis. *An Med Interna*; 18: 317–18.
52. Gillings M., Holley, M. 1997. Repetitive element PCR fingerprinting (Rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 17-21.

53. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J. 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*; 27: 2633–36.
54. Gottschalk M, Lacouture S, Odierno L. 1999. Immunomagnetic isolation of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 from swine tonsils. *J Clin Microbiol*; 37: 2877–81.
55. Gottschalk M, Segura M. 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol*; 76: 259–72.
56. Gottschalk M, Turgeon P, Higgins R, Beaudoin M, Bourgault AM. 1991. Susceptibility of *Streptococcus suis* to penicillin. *J Vet Diagn Invest*; 3: 170–72.
57. Gottschalk M. 2009. Revisão sobre a infecção por *Streptococcus suis* em suínos e importância do agente como causa de infecção em seres humanos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37 (Supl 1): s73-s79.
58. Gottschalk, M. 2002. *Streptococcus suis*: update on pathogenesis and progress on control. Proceedings American Association of Swine Veterinarians. 255-260.
59. Gottschalk, M. 2005. *Streptococcus suis* series: Part 2. A practical guide to management of related diseases. Pig Progress. Vol. 21. No. 4. 28-31.
60. Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M. 1993. Production of capsular material by *Streptococcus suis* serotype 2 under different growth conditions. *Can. J. Vet. Res.* 57:49-52
61. Gottschalk, M., Lacouture, S., Dubreuil, J. D. 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology*. 141, 189-195.
62. Gu H, Zhu H, Lu C. 2009. Use of in vivo-induced antigen technology (IVIAT) for the identification of *Streptococcus suis* serotype 2 in vivo-induced bacterial protein antigens. *BMC Microbiol.* 18; 9:201.
63. Haataja, S., Tikkanen, K., Hytonem, J., Finne, J. 1996. The Gala1-4Gal-binding adhesion of *Streptococcus suis*, a gram-positive meningitis-associated bacterium. In: Kahane, I., Ofek, I. Towards Anti-adhesion therapy for microbial diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 408, 25-34.

64. He J. H, Wang JC, Lin JH. 2001. Advances in *Streptococcus suis* type 2-a new zoonosis pathogen. *Anim Husb Vet Med*; 33: 38–40 (in Chinese).
65. Higgins R, Gottschalk M, Boudreau M, Lebrun A, Henrichsen J. 1995. Description of six new capsular types (29–34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Invest*; 7: 405–06.
66. Higgins R, Gottschalk M, Mittal KR, Beaudoin M. 1990. *Streptococcus suis* infection in swine. A sixteen month study. *Can J Vet Res*; 54: 170–73.
67. Higgins R, Gottschalk M. 1990. An update on *Streptococcus suis* identification. *J Vet Diagn Invest*; 2: 249–52.
68. Hill J.E, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH. 2005. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol*; 107: 63–69.
69. Hulton, C.J.S., Higgins, C.F. and Sharp, P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria *Molecular Microbiology* 5, 825–834.
70. Jacobs, A.A., Loeffen, W., van den Berg, A., Storm, P. 1994. Identification, purification and characterization of a thiol- activated hemolysin (suilyisin) of *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 62, 1742-1748.
71. Jansen, E.J., Van Dorssen C.A. 1951. Meningoencephalitis bij varkens door streptococcen. *Tijdschr Diergeneeskd.* 76:815-832.
72. Kataoka, Y., M. Haritani, M. Mori, M. Kishima, C. Sugimoto, M. Nakazawa, and K. Yamamoto. 1991. Experimental infections of mice and pigs with *Streptococcus suis* type 2. *J. Vet. Med. Sci.* 53:1043–1049.
73. Kebede, M. Chengappa, M.M. Stuart, J.G. 1990. Isolation and characterization of temperature sensitive mutants of *Streptococcus suis*: efficacy trial of the mutant vaccine in mice. *Veterinary Microbiology.* 22:249-257.
74. Kilpper-bälz, R.; K. H. Schleifer. 1987. *Streptococcus suis* sp. nom. *Rev.Int. J. Sys. Bacteriol.* 37: 160 – 162.
75. King SJ, Leigh JA, Heath PJ, et al. 2002. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*:



- identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *J Clin Microbiol*; 40: 3671–80.
76. Kopic J, Paradzik MT, Pandak N. 2002. *Streptococcus suis* infection as a cause of severe illness: 2 cases from Croatia. *Scand J Infect Dis*; 34: 683–84.
  77. Lalonde, M., Segura, M. Lacouture, S., Gottschalk, M. 2000. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology*. 146: 1913-1921.
  78. Ma YZ, Fang WH, Ke CL, Zhang XF. 2003. Biological characteristics of isolates of *Streptococcus suis* type 2. *Chin J Vet Sci*; 23: 326–28.
  79. MacInnes, J., Gottschalk, M., Lone, A., Metcalf, D., Ojha, S., Rosendal, T., Watson, S. and Friendship, R. 2008. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Canadian Journal of Veterinary Research*; 72: 242-248.
  80. Marois, C., Bougeard, M., Gottschalk, M and Kobish, M. 2004. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 42. No. 7:3169-3175.
  81. Marois, C., Devendec, L., Gottschalk, M., Kobish, M. 2007. Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 71: 14-22
  82. Martinez, G., Harel, J., Lacouture, S., Gottschalk, M. 2002. Genetic diversity of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 isolates recovered from carrier pigs in closed herds. *Canadian Journal of Veterinary Research*; 66: 240-248.
  83. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. 1993. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis*. 17 : 153-64.
  84. Matsuo H, Sakamoto S. 2003. Purulent meningitis caused by *Streptococcus suis* in a pig breeder. *Kansenshogaku Zasshi*; 77: 340–42 (in Japanese).
  85. Mazokopakis EE, Kofteridis DP, Papadakis JA, Gikas AH, Samonis GJ. 2005. First case report of *Streptococcus suis* septicaemia and meningitis from Greece. *Eur J Neurol*; 12: 487–89.

86. Messier S, Lacouture S, Gottschalk M. 2008. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types from 2001 to 2007. *Can Vet J.* 49(5):461-2.
87. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1983. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J Clin Microbiol*; 18: 1351–54.
88. Mogollón J.D., Pijoan C, Murtaugh MP, Kaplan EL, Collins JE, Cleary PP. 1990. Characterization of prototype and clinically defined strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. *J Clin Microbiol*; 28: 2462–66.
89. Mogollón, J.D., C., Pijoan, M. P. Murtaugh, J. E. Collins y P. P. Cleary. 1991. Identification of epidemic strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 29:782-787.
90. National Center for Biotechnology Information. *Streptococcus suis*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. (Consultado Abril.25. 2010).
91. Norton, P.M., Rolph, C., Ward, P.N., Bentley, R.W., Leigh, J.A. 1999. Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26, 25-35.
92. Okwumabua O., O'Connor M, Shull E. 2003. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett*; 218: 79–84.
93. Okwumabua, O., J. Saats, y M. M. Chengappa. 1995. Detection of genomic heterogeneity in *Streptococcus suis* isolates by DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes (ribotyping). *J. Clin. Microbiol.* 33:968-972.
94. Okwumabua, O., O. Abdelmagid, and M. M. Chengappa. 1999. Hybridization analysis of the gene encoding a hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis* type 2: evidence for the absence of the gene in some isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 181:113–121.
95. Oliveira, S., Batista, L., Torremorell, M., Pijoan, C. 2001. Experimental colonization of piglets and gilts with systemic strains of *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis* to prevent disease. *The Canadian Journal of Veterinary Research.* 65:161-167.

96. Paterson RA, Robertson ID, Sanders RC, Siba PM, Clegg A, Hampson DJ. 1993. The carriage of *Streptococcus suis* type 2 by pigs in Papua New Guinea. *Epidemiol Infect*; 110: 71–78.
97. Perch B, Pedersen KB, Henrichsen J. 1983. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*; 17: 993–96.
98. Prieto C, Garcia FJ, Suarez P, Imaz M, Castro JM. 1994. Biochemical traits and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughtered pigs. *Zentralbl Veterinarmed B*; 41: 608–17.
99. Rasmussen SR, Andresen LO. 1998. 16S rDNA sequence variations of some *Streptococcus suis* serotypes. *Int J Syst Bacteriol*; 48 (pt 3):1063–65.
100. Rasmussen, S. R., F. M. Aarestrup, N. E. Jensen, and S. E. Jorsal. 1999. Associations of *Streptococcus suis* serotype 2 ribotype profiles with clinical disease and antimicrobial resistance. *J. Clin. Microbiol.* 37:404–408.
101. Reams R. Y., Harrington D. D., Glickman L. T., Thacker H. L., Bowersock T. 1996. Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. *J Vet Diagn Invest.* 8: 119-121.
102. Robertson ID, Blackmore DK. 1989a. Occupational exposure to *Streptococcus suis* type 2. *Epidemiol Infect*; 103: 157–64.
103. Robertson ID, Blackmore DK. 1989b. Prevalence of *Streptococcus suis* types 1 and 2 in domestic pigs in Australia and New Zealand. *Vet Rec*; 124: 391–94.
104. Rosales J. 2003. Encuentros en la biología. Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la UMA , Año XI, Número 84.
105. Rosenkranz M, Elsner HA, Sturenburg HJ, Weiller C, Rother J, Sobottka I. 2003. *Streptococcus suis* meningitis and septicemia contracted from a wild boar in Germany. *J Neurol*; 250: 869–70.
106. Sharples, G and Lloyd, R. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 22. 6503-6508.

107. Silva LMG., Baums C. G., Rehm T., Wisselink HJ., Goethe R., Valentin-Weigand P. (2006). Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolated by PCR. *Vet. Micro*, en prensa.
108. Smith HE, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Vecht U, Smits MA. 1997. Virulence markers of *Streptococcus suis* type 1 and 2. *Adv Exp Med Biol*; 418: 651–55.
109. Smith, H., de Vries, R., van't Slot, R. and Smits, M. 2000. The *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: genetic determinant for the synthesis of sialic acid. *Microbial Pathogenesis* ; 29: 127–134
110. Smith, H., Veenbergen, V., et al. 1999. The *cps* Genes of *Streptococcus suis* serotypes 1,2 and 9: Development of Rapid serotype-specific PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 37. No.10: 3146-3152.
111. Smith, H.E., Damman, M., van der Velde, J., Wagennar, F., Wisselink, H., Stockhofe-Zurwieden, N., and Smith, M.A. 1999. Identification and characterisation of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* 67: 1750–1756.
112. Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM. 1997. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun*; 21: 381–407.
113. Staats, J., B.Plattner, J. Nietfeld, S. Dritz y M.M. Chengappa. 1998. Use of ripotyping and hemolysin activity to identify highly virulent *Streptococcus suis* type 2 isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36:15-19.
114. Swildens B, Wisselink HJ, Engel B, Smith, H., Nielen, M., Verheijden, J., Stegeman, J. 2005. Detection of extracellular factor-positive *Streptococcus suis* serotype 2 strains in tonsillar swabs of live sows by PCR. *Vet Microbiol.* 109: 223–228.
115. Swildens, B, Wisselink, H.J.,Smith, H.E., Verheijden, J.H.M. 2000. Tonsillar swabs can be used in a PCR assay for the detection of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains in weaned piglets. The 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress. Melbourne, Australia.
116. Takamatsu, D., Osaki, M. Sekisaki, T. 2000. Sequence analysis of a small cryptic plasmid isolated from *Streptococcus suis* serotype 2. *Curr. Microbiol.* Jan; 40 (1) 61-6.

117. Tambyah PA, Kumarasinghe G, Chan HL, Lee KO. 1997. *Streptococcus suis* infection complicated by purpura fulminans and rhabdomyolysis: case report and review. *Clin Infect Dis*; 24: 710–12.
118. Tambyah PA, Lee KO. 2001. Streptococcus infection and splenectomy. *Lancet*; 357: 1130–31.
119. Tang JQ, Zhu J, Hu XS, Zhu FC, Nou GZ. 2001. Epidemiological and pathogenic study on the outbreak of toxic shock syndrome and meningocephalitis caused by swine streptococcus. *Acta Acad Med Militaris Tertiae*; 23: 1292–95 (in Chinese).
120. Tarradas C, Arenas A, Maldonado A, et al. 1994. Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine: proposal for biochemical parameters. *J Clin Microbiol*. 32:578-580.
121. Tarradas, C. 2000. Nuevos conocimientos sobre patologías asociadas a *Streptococcus suis*. Córdoba. España. Anaporc. No. 199.
122. Tarradas, M. C., Arenas, A., Maldonado, A., Vicente, S., Miranda, A. and Perea, A. 1994. Susceptibility of *Streptococcus suis* to various antimicrobial agents. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B*. 41: 685–8.
123. Torremorell M, Calsamiglia M, Pijoan C. 1998a. Colonization of suckling pigs by *Streptococcus suis* with particular reference to pathogenic serotype 2 strains. *Can J Vet Res*. 62:21–26.
124. Torremorell, M. and Pijoan, C. 1998b. Prolonged persistence of an epidemic *Streptococcus suis* strain in a closed population. *Vet. Rec*. 143:394-395.
125. Torremorell, M. Pijoan, C. Dee, S.A. 1998c. Experimental colonization of young pigs with *Streptococcus suis* and its effect on disease. Proceedings IPVS; 2: p. 90.
126. van Ooyen, A. 2001. Theoretical aspects of pattern analysis. In new approaches for the generation and analysis of microbial fingerprints. Amsterdam, Nederland. Elsevier.
127. Vecht, U., H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and H. E. Smith. 1996. Characterization of virulence of the *Streptococcus suis* serotype 2 strain Henrichsen S735 in newborn gnotobiotic pigs. *Vet. Microbiol*. 51:125–136.

128. Vecht, U., N. Stockhofe-Zurwieden, B. Tetenburg, H. J. Wisselin, and H. E. Smith. 1997. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 for mice and pigs appeared host-specific. *Vet. Microbiol.* 58:53–60.
129. Vecht, U., Van Leengoed, L.A.M.G., Verheijen, E.R.M., 1985. *Streptococcus suis* infections in pigs in The Netherlands (part one). *Vet. Quart.* 7, 315-321.
130. Vela AI, Goyache J, Tarradas C, et al. 2003. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*; 41: 2498–502.
131. Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. Vol. 19, No. 24. 6823 -6831.
132. Versalovic, J., Lupski, J. R. 2002. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol.* 10: 15-21.
133. Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R.1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Cell Biology.* 5: 25–40.
134. Vila J, Marcos MA, Jiménez de Anta MT. 1996. A comparative study of different P C R-based DNA fingerprinting techniques for typing of *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J Med Microbiol.* 44:482-9.
135. Wang H, Hu XS, Zhu FC, Chen SY, Sun JZ, Hua CT. 2000. An epidemiological study on the human streptococcal infective syndrome among men and pigs. *Mod Prev Med*; 27: 312–14 (in Chinese).
136. Wang LL, Ye CY, Xu YM, Cui ZG, Jing HQ, Jin D, Du HM, Zhang SY, Bai XM, Zhao AL, Xu JG. 2008. Development of a protocol on pulsed field gel electrophoresis analysis for *Streptococcus suis*. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 29(5):473-7.
137. Wang YH, Dong DP, Xie Q, Wang DX, Han LZ, Ni YX. 2005. Analysis of infectious syndrome caused by *Streptococcus suis* type 2. *Jiangsu Med J*; 31: 419–20 (in Chinese).
138. Watkins EJ, Brooksby P, Schweiger MS, Enright SM. 2001. Septicaemia in a pig-farm worker. *Lancet*, 357: 38.

139. Windsor, E.R., Elliot, S.D. 1975. Streptococcal infections in young pigs. IV. An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs. *J Hyg (Camb)* 75: 69-78.
140. Winterhoff N, Goethe R, Gruening P, et al. 2002. Identification and characterization of two temperature-induced surface-associated proteins of *Streptococcus suis* with high homologies to members of the arginine deiminase system of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol*; 184: 6768–76.
141. Wisselink HJ, Smith HE, Stockhofe-Zurwieden N, Peperkamp K, Vecht U. 2000. 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.* 74: 237–48.
142. Wisselink, H. J., F. H. Reek, U. Vecht, N. Stockhofe-Zurwieden, M. A. Smits, and H. E. Smith. 1999. 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.* 67:143–157.
143. Wisselink, H., Joosten, J. and Smith, H. 2002. Multiplex PCR Assays for Simultaneous Detection of six Major Serotypes and Two Virulence-Associated Phenotypes of *Streptococcus suis* in Tonsillar Specimens from Pigs. *J Clin Microbiol*; 40: 2922–29.
144. Wisselink, H., Smith, H., Zurwieden, N., Peperkamp, K., Vecht, U. 2000. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Veterinary Microbiology* 74 237-248.
145. Yang WZ, Yu HJ, Jing HQ, et al. 2006. An outbreak of human *Streptococcus suis* serotype 2 infections presenting with toxic shock syndrome in Sichuan, China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*; 27: 185–91 (in Chinese).
146. Yuan H, Jing H, Chen Z, et al. 2006. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis*; 12: 914–20.
147. Yuan H, Lu Q, Wang JL, et al. 2005. Analysis for the latent period of human infection of *Streptococcus suis* in Sichuan Province. *J Prev Med Inform*; 21: 384–85 (in Chinese).

148. Zhang A, Chen B, Mu X, Zhao Y, Zheng P, Chen H, Jin M. 2009. Identification of three novel *in vivo*-induced expressed antigens during infection with *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiol Lett.* 295(1):17-22.
149. Zhang XY, Ding JQ, Qin HP. 2002. Clinical analysis of 22 cases of the disease contracted both by man and pigs with swine streptococcus infections. *J Trop Med*; 2: 361–63 (in Chinese).
150. Zhu J, Tang JQ, Guo HB, Zhang Y, Tao KH. 2000. Epidemiologic and pathogenic study on an outbreak of acute streptococcal disease in pigs. *J Prev Med Chin PLA*; 18: 257–59 (in Chinese).
151. Zielinski, G. 2006. Enfermedades re-emergentes: infecciones por *Streptococcus suis* y *Haemophilus parasuis*. Área Producción Animal, E.E.A INTA Marcos Juárez. 1-4 p
152. Zulkifli. Y., Alitheen, N.B., Son, R., Raha, A.R., Samuel, L., Yeap, S.K. and Nishibuchi, M. 2009. Random amplified polymorphic DNA-PCR and ERIC PCR analysis on *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles in Padang, Indonesia. *International Food Research Journal.* 16: 141-150.



# ANEXOS

## ANEXO 1. Análisis bioinformático de los primers usados en el estudio

- Alineamiento múltiple de los primers Cps2J reportados por Smith *et al.* 1999.

```
gi | 89513249 | TTCTTTTGATAGATGACGGTTCCTTCAGATTCATCAACGGATATATGTTTG 150
gi | 89513247 | TTCTTTTGATAGATGACGGTTCCTTCAGATTCATCAACGGATATATGTTTG 150
gi | 89513245 | TTCTTTTGATAGATGACGGTTCCTTCAGATTCATCAACGGATATATGTTTG 150
gi | 89513243 | TTCTTTTGATAGATGACGGTTCCTTCAGATTCATCAACGGATATATGTTTG 150
gi | 82395256 | TTCTTTTGATAGATGACGGTTCCTTCAGATTCATCAACGGATATATGTTTG 150
gi | 4580620   | -----GGTTCCTTCAGATTCATCAACGGATATATGTTTG 33
                *****

gi | 89513249 | GAATACGCAGAGCAAGATGGTAGAATAAAAACTTTTCCGGTTACCAAATGG 200
gi | 89513247 | GAATACGCAGAGCAAGATGGTAGAATAAAAACTTTTCCGGTTACCAAATGG 200
gi | 89513245 | GAATACGCAGAGCAAGATGGTAGAATAAAAACTTTTCCGGTTACCAAATGG 200
gi | 89513243 | GAATACGCAGAGCAAGATGGTAGAATAAAAACTTTTCCGGTTACCAAATGG 200
gi | 82395256 | GAATACGCAGAGCAAGATGGTAGAATAAAAACTTTTCCGGTTACCAAATGG 200
gi | 4580620   | GAATACGCAGAGCAAGATGGTAGAATAAAAACTTTTCCGGTTACCAAATGG 83
                *****

                <----->
forwardCps2j -----ACGCAAGGAATTACGGTATC----- 23
gi | 89513249 | TGGTGTTTCAAACGCAAGGAATTACGGTATCAAAAATAGCACAGCAAATT 250
gi | 89513247 | TGGTGTTTCAAACGCAAGGAATTACGGTATCAAAAATAGCACAGCAAATT 250
gi | 89513245 | TGGTGTTTCAAACGCAAGGAATTACGGTATCAAAAATAGCACAGCAAATT 250
gi | 89513243 | TGGTGTTTCAAACGCAAGGAATTACGGTATCAAAAATAGCACAGCAAATT 250
gi | 82395256 | TGGTGTTTCAAACGCAAGGAATTACGGTATCAAAAATAGCACAGCAAATT 250
gi | 4580620   | TGGTGTTTCAAACGCAAGGAATTACGGTATCAAAAATAGCACAGCAAATT 133
                *****

gi | 89513249 | ATATTATGTTTGTAGATTCTGATGATATTGTTGACGGCAACATTGTTGAG 300
gi | 89513247 | ATATTATGTTTGTAGATTCTGATGATATTGTTGACGGCAACATTGTTGAG 300
gi | 89513245 | ATATTATGTTTGTAGATTCTGATGATATTGTTGACGGCAACATTGTTGAG 300
gi | 89513243 | ATATTATGTTTGTAGATTCTGATGATATTGTTGACGGCAACATTGTTGAG 300
gi | 82395256 | ATATTATGTTTGTAGATTCTGATGATATTGTTGACGGCAACATTGTTGAG 300
gi | 4580620   | ATATTATGTTTGTAGATTCTGATGATATTGTTGACGGCAACATTGTTGAG 183
                *****

gi | 89513249 | TCCTTATACACCTGTTTTAAAAGAGAATGATAGTGATTTGTCTGGGAGGGTT 350
gi | 89513247 | TCCTTATACACCTGTTTTAAAAGAGAATGATAGTGATTTGTCTGGGAGGGTT 350
gi | 89513245 | TCCTTATACACCTGTTTTAAAAGAGAATGATAGTGATTTGTCTGGGAGGGTT 350
gi | 89513243 | TCCTTATACACCTGTTTTAAAAGAGAATGATAGTGATTTGTCTGGGAGGGTT 350
gi | 82395256 | TCCTTATACACCTGTTTTAAAAGAGAATGATAGTGATTTGTCTGGGAGGGTT 350
gi | 4580620   | TCCTTATACACCTGTTTTAAAAGAGAATGATAGTGATTTGTCTGGGAGGGTT 233
                *****

gi | 89513249 | ACTTGCTACTTTTGATGGAAATTATCAAGAATCTGAGCTGCAAAGTGTC 400
gi | 89513247 | ACTTGCTACTTTTGATGGAAATTATCAAGAATCTGAGCTGCAAAGTGTC 400
gi | 89513245 | ACTTGCTACTTTTGATGGAAATTATCAAGAATCTGAGCTGCAAAGTGTC 400
```

```

gi | 89513243 | ACTTGCTACTTTTTGATGGAAATTATCAAGAATCTGAGCTGCAAAAAGTGTC 400
gi | 82395256 | ACTTGCTACTTTTTGATGGAAATTATCAAGAATCTGAGCTGCAAAAAGTGTC 400
gi | 4580620 | ACTTGCTACTTTTTGATGGAAATTATCAAGAATCTGAGCTGCAAAAAGTGTC 283
*****

gi | 89513249 | AAATTGATTTGGAAGAGATAAAAAGAGGTGCGAGACTTAGGAAATGAAAAT 450
gi | 89513247 | AAATTGATTTGGAAGAGATAAAAAGAGGTGCGAGACTTAGGAAATGAAAAT 450
gi | 89513245 | AAATTGATTTGGAAGAGATAAAAAGAGGTGCGAGACTTAGGAAATGAAAAT 450
gi | 89513243 | AAATTGATTTGGAAGAGATAAAAAGAGGTGCGAGACTTAGGAAATGAAAAT 450
gi | 82395256 | AAATTGATTTGGAAGAGATAAAAAGAGGTGCGAGACTTAGGAAATGAAAAT 450
gi | 4580620 | AAATTGATTTGGAAGAGATAAAAAGAGGTGCGAGACTTAGGAAATGAAAAT 333
*****

gi | 89513249 | TTTCCAAATCATTATATGAGCGGTATCTTTAATAGCCCTTGTTGCAAAC 500
gi | 89513247 | TTTCCAAATCATTATATGAGCGGTATCTTTAATAGCCCTTGTTGCAAAC 500
gi | 89513245 | TTTCCAAATCATTATATGAGCGGTATCTTTAATAGCCCTTGTTGCAAAC 500
gi | 89513243 | TTTCCAAATCATTATATGAGCGGTATCTTTAATAGCCCTTGTTGCAAAC 500
gi | 82395256 | TTTCCCAATCATTATATGAGCGGTATCTTTAATAGCCCTTGTTGCAAAC 500
gi | 4580620 | TTTCCCAATCATTATATGAGCGGTATCTTTAATAGCCCTTGTTGCAAAC 383
*****

gi | 89513249 | TTATAAGAATATATATATAAACAAGGTTTTGACACTGAACAGTGGTTAG 550
gi | 89513247 | TTATAAGAATATATATATAAACAAGGTTTTGACACTGAACAGTGGTTAG 550
gi | 89513245 | TTATAAGAATATATATATAAACAAGGTTTTGACACTGAACAGTGGTTAG 550
gi | 89513243 | TTATAAGAATATATATATAAACAAGGTTTTGACACTGAACAGTGGTTAG 550
gi | 82395256 | TTATAAGAATATATATATAAACAAGGTTTTGACACTGAACAGTGGTTAG 550
gi | 4580620 | TTATAAGAATATATATATAAACAAGGTTTTGACACTGAACAGTGGTTAG 433
*****

gi | 89513249 | GAGAGGACTTATTATTTAATCTAAATTATTTAAAGAATATAAAAAAAGTC 600
gi | 89513247 | GAGAGGACTTATTATTTAATCTAAATTATTTAAAGAATATAAAAAAAGTC 600
gi | 89513245 | GAGAGGACTTATTATTTAATCTAAATTATTTAAAGAATATAAAAAAAGTC 600
gi | 89513243 | GAGAGGACTTATTATTTAATCTAAATTATTTAAAGAATATAAAAAAAGTC 600
gi | 82395256 | GAGAGGACTTATTATTTAATCTAAATTATTTAAAGAATATAAAAAAAGTC 600
gi | 4580620 | GAGAGGACTTATTATTTAATCTAAATTATTTAAAGAATATAAAAAAAGTC 483
*****

gi | 89513249 | AGCTATGTAAACAGAAATCTTTATTTTGCTAGAAGAGGTATACAAAGTAC 650
gi | 89513247 | AGCTATGTAAACAGAAATCTTTATTTTGCTAGAAGAGGTATACAAAGTAC 650
gi | 89513245 | AGCTATGTAAACAGAAATCTTTATTTTGCTAGAAGAGGTATACAAAGTAC 650
gi | 89513243 | AGCTATGTAAACAGAAATCTTTATTTTGCTAGAAGAGGTATACAAAGTAC 650
gi | 82395256 | CGCTATGTAAACAGAAATCTTTATTTTGCCAGAAGAAGTTTACAAAGTAC 650
gi | 4580620 | CGCTATGTAAACAGAAATCTTTATTTTGCCAGAAGAAGTTTACAAAGTAC 533
*****

gi | 89513249 | TACAAATACGTTTAAAAAAGATGTTTTTATTCAATTAGAAAATTTAGAAG 700
gi | 89513247 | TACAAATACGTTTAAAAAAGATGTTTTTATTCAATTAGAAAATTTAGAAG 700
gi | 89513245 | TACAAATACGTTTAAAAAAGATGTTTTTATTCAATTAGAAAATTTAGAAG 700
gi | 89513243 | TACAAATACGTTTAAAAAAGATGTTTTTATTCAATTAGAAAATTTAGAAG 700
gi | 82395256 | TACAAATACGTTTAAATATGATGTTTTTATTCAATTAGAAAATTTAGAAG 700
gi | 4580620 | TACAAATACGTTTAAATATGATGTTTTTATTCAATTAGAAAATTTAGAAG 583
*****

gi | 89513249 | AAAAACTTTTGATTTGTTTGTAAATATTTGGTGGACAATATGAATTT 750
gi | 89513247 | AAAAACTTTTGATTTGTTTGTAAATATTTGGTGGACAATATGAATTT 750

```

```

gi | 89513245 | AAAAACTTTTGTATTGTTTGTAAAATATTTGGTGGACAATATGAATTT 750
gi | 89513243 | AAAAACTTTTGTATTGTTTGTAAAATATTTGGTGGACAATATGAATTT 750
gi | 82395256 | AAAAACTTTTGTATTGTTTGTAAAATATTTGGTGGACAATATGAATTT 750
gi | 4580620   | AAAAACTTTTGTATTGTTTGTAAAATATTTGGTGGACAATATGAATTT 633
*****

gi | 89513249 | TCTGTTTTTAAAGAGACGCTACAGTGGCATATTATTTATTATAGCTTATT 800
gi | 89513247 | TCTGTTTTTAAAGAGACGCTACAGTGGCATATTATTTATTATAGCTTATT 800
gi | 89513245 | TCTGTTTTTAAAGAGACGCTACAGTGGCATATTATTTATTATAGCTTATT 800
gi | 89513243 | TCTGTTTTTAAAGAGACGCTACAGTGGCATATTATTTATTATAGCTTATT 800
gi | 82395256 | TCTGTTTTTAAAGAGACGCTACAGTGGCATATTATTTATTATAGCTTATT 800
gi | 4580620   | TCTGTTTTTAAAGAGACGCTACAGTGGCATATTATTTATTATAGCTTATT 683
*****

gi | 89513249 | AATGTTCAAAAATGGAGATGAATCGCTTCCAAAGAAATTGCATATATTTA 850
gi | 89513247 | AATGTTCAAAAATGGAGATGAATCGCTTCCAAAGAAATTGCATATATTTA 850
gi | 89513245 | AATGTTCAAAAATGGAGATGAATCGCTTCCAAAGAAATTGCATATATTTA 850
gi | 89513243 | AATGTTCAAAAATGGAGATGAATCGCTTCCAAAGAAATTGCATATATTTA 850
gi | 82395256 | AATGTTCAAAAATGGAGATGAATCGCTTCCAAAGAAATTGCATATATTTA 850
gi | 4580620   | AATGTTCAAAAATGGAGATGAATCGCTTCCAAAGAAATTGCATATATTTA 733
*****

gi | 89513249 | AGTATTTATACAATAGGCATTCTTTAGATACTCTAAGTATTTAAACGAACG 900
gi | 89513247 | AGTATTTATACAATAGGCATTCTTTAGATACTCTAAGTATTTAAACGAACG 900
gi | 89513245 | AGTATTTATACAATAGGCATTCTTTAGATACTCTAAGTATTTAAACGAACG 900
gi | 89513243 | AGTATTTATACAATAGGCATTCTTTAGATACTCTAAGTATTTAAACGAACG 900
gi | 82395256 | AGTATTTATACAATAGGCATTCTTTAGATACTCTAAGTATTTAAACGAACG 900
gi | 4580620   | AGTATTTATACAATAGGCATTCTTTAGATACTCTAAGTATTTAAACGAACG 783
*****

reversoCps2j -----CAATAGGCATTCTTTAGATACT----- 23
                        ←
gi | 89513249 | TCCTCTGTTTTTAAAAGAATATGTAAATTAATTGTTGCTAATAATTTGTT 950
gi | 89513247 | TCCTCTGTTTTTAAAAGAATATGTAAATTAATTGTTGCTAATAATTTGTT 950
gi | 89513245 | TCCTCTGTTTTTAAAAGAATATGTAAATTAATTGTTGCTAATAATTTGTT 950
gi | 89513243 | TCCTCTGTTTTTAAAAGAATATGTAAATTAATTGTTGCTAATAATTTGTT 950
gi | 82395256 | TCCTCTGTTTTTAAAAGAATATGTAAATTAATTGTTGCTAATAATTTGTT 950
gi | 4580620   | TCCTCTGTTTTTAAAAGA----- 801
*****

```

**-Tamaño del Producto esperado**

671 pb

**- Especificidad de los primers CPS2JF y CPS2JR mediante alineamiento local de secuencias.**

La pareja de primers CPS2JF y CPS2JR, mediante análisis bioinformático dá hit únicamente con secuencias de *S. suis* serotipo 2.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">CP000837.1</a>	Streptococcus suis GZ1, complete genome	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">GQ352510.1</a>	Streptococcus suis strain ZJNB2007 capsular polysaccharide (cps2J)	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">GQ352509.1</a>	Streptococcus suis strain ZJX2008 capsular polysaccharide (cps2J)	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">GQ352508.1</a>	Streptococcus suis strain ZJWZ2008 capsular polysaccharide (cps2J)	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">GQ352507.1</a>	Streptococcus suis strain ZJWZ2006 capsular polysaccharide (cps2J)	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">GQ352506.1</a>	Streptococcus suis strain ZJWL2005 capsular polysaccharide (cps2J)	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">GQ352505.1</a>	Streptococcus suis strain ZJTZ2005 capsular polysaccharide (cps2J)	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">GQ352503.1</a>	Streptococcus suis strain ZJH2005 capsular polysaccharide (cps2J)	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">GQ352502.1</a>	Streptococcus suis strain ZJHZ2006 capsular polysaccharide (cps2J)	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">AM946016.1</a>	Streptococcus suis P1/7 complete genome	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">FM252032.1</a>	Streptococcus suis BM407 complete genome, strain BM407	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">FM252031.1</a>	Streptococcus suis SC84 complete genome, strain SC84	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">EU693942.1</a>	Streptococcus suis strain NB200701 Cps2J (cps2J) gene, partial cds	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">EU000467.1</a>	Streptococcus suis strain SS2-1 putative glycosyltransferase (cps2J)	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">EU000466.1</a>	Streptococcus suis strain HA0610 putative glycosyltransferase (cps2J)	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">EU000465.1</a>	Streptococcus suis strain HA0609 putative glycosyltransferase (cps2J)	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">CP000408.1</a>	Streptococcus suis 98HAH33, complete genome	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">CP000407.1</a>	Streptococcus suis 05ZYH33, complete genome	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">DQ410856.1</a>	Streptococcus suis strain 98015 Cps2J (cps2J) gene, complete cds	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">DQ410855.1</a>	Streptococcus suis strain SC152 Cps2J (cps2J) gene, complete cds	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">DQ410854.1</a>	Streptococcus suis strain SC22 Cps2J (cps2J) gene, complete cds	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">DQ410853.1</a>	Streptococcus suis strain SC17 Cps2J (cps2J) gene, complete cds	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">DQ256427.1</a>	Streptococcus suis isolate ZYS8 Cps2J gene, complete cds	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%
<a href="#">AF118389.1</a>	Streptococcus suis Cps2A (cps2A), Cps2B (cps2B), Cps2C (cps2C)	<a href="#">42.8</a>	42.8	20%	0.32	100%

- Alineamiento múltiple de los primers 16S rRNA reportados por Marois, C. *et al.* 2004.

```

gi | 80973657      GTAGAACGCTGAAGTCTGGTGCTTGCCTAGACGGATGAGTTGCGAACGG 75
AB071343.1      GTAGAACGCTGAAGTCTGGTGCTTGCCTAGACGGATGAGTTGCGAACGG 83
gi | 82395251      -----TGAAGTCTGGTGCTTGCCTAGACGGATGAGTTGCGAACGG 41
gi | 82395258 |    -----TGAAGTCTGGTGCTTGCCTAGACGGATGAGTTGCGAACGG 41
gi | 83339815      GTAGAACGCTGAAGTCTGGTGCTTGCCTAGACGGATGAGTTGCGAACGG 86
gi | 82395270      -----TGAAGTCTGGTGCTTGCCTAGACGGATGAGTTGCGAACGG 41
AF009477        GTAGAACGCTGAAGTCTGGTGCTTGCCTAGACGGATGAGTTGCGAACGG 100
AF009490.1      GTAGAACGCTGAAGTCTGGTGCTTGCCTAGACGGATGAGTTGCGAACGG 91
gi | 82395266      -----TGAAGTCTGGTGCTTGCCTAGACGGATGAGTTGCGAACGG 41

```

```

gi | 80973657      GTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTCATAGCGGGGGATAACTATTGGAA 125
AB071343.1      GTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTCATAGCGGGGGATAACTATTGGAA 133
gi | 82395251      GTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTCATAGCGGGGGATAACTATTGGAA 91
gi | 82395258      GTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTCATAGCGGGGGATAACTATTGGAA 91
gi | 83339815      GTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTCATAGCGGGGGATAACTATTGGAA 136
gi | 82395270      GTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTCATAGCGGGGGATAACTATTGGAA 91
AF009477        GTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTCATAGCGGGGGATAACTATTGGAA 150
AF009490.1      GTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTCATAGCGGGGGATAACTATTGGAA 141
gi | 82395266      GTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTCATAGCGGGGGATAACTATTGGAA 91

```

FORWARD-16S- -----> CAGTATTTACCGCATGGTAGATAT ----- 24

gi|80973657 ACGATAGCTAATACCGCATAACAGTATTTACCGCATGGTAGATATTTGAA 175  
 AB071343.1 ACGATAGCTAATACCGCATAACAGTATTTACCGCATGGTAGATATTTGAA 183  
 gi|82395251 ACGATAGCTAATACCGCATAACAGTATTTACCGCATGGTAGATATTTGAA 141  
 gi|82395258 ACGATAGCTAATACCGCATAACAGTATTTACCGCATGGTAGATATTTGAA 141  
 gi|83339815 ACGATAGCTAATACCGCATAACAGTATTTACCGCATGGTAGATATTTGAA 186  
 gi|82395270 ACGATAGCTAATACCGCATAACAGTATTTACCGCATGGTAGATATTTGAA 141  
 AF009477 ACGATAGCTAATACCGCATAACAGTATTTACCGCATGGTAGATATTTGAA 200  
 AF009490.1 ACGATAGCTAATACCGCATAACAGTATTTACCGCATGGTAGATATTTGAA 191  
 gi|82395266 ACGATAGCTAATACCGCATAACAGTATTTACCGCATGGTAGATATTTGAA 141

\*\*\*\*\*

gi|80973657 AGGAGCAATTGCTTCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTG 225  
 AB071343.1 AGGAGCAATTGCTTCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTG 233  
 gi|82395251 AGGAGCAATTGCTTCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTG 191  
 gi|82395258 AGGAGCAATTGCTTCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTG 191  
 gi|83339815 AGGAGCAATTGCTTCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTG 236  
 gi|82395270 AGGAGCAATTGCTTCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTG 191  
 AF009477 AGGAGCAATTGCTTCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTG 250  
 AF009490.1 AGGAGCAATTGCTTCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTG 241  
 gi|82395266 AGGAGCAATTGCTTCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTG 191

gi|80973657 GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTTCGATACATAGCCGACCTGAGAGGGT 275  
 AB071343.1 GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTTCGATACATAGCCGACCTGAGAGGGT 283  
 gi|82395251 GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTTCGATACATAGCCGACCTGAGAGGGT 241  
 gi|82395258 GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTTCGATACATAGCCGACCTGAGAGGGT 241  
 gi|83339815 GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTTCGATACATAGCCGACCTGAGAGGGT 286  
 gi|82395270 GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTTCGATACATAGCCGACCTGAGAGGGT 241  
 AF009477 GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTTCGATACATAGCCGACCTGAGAGGGT 300  
 AF009490.1 GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTTCGATACATAGCCGACCTGAGAGGGT 291  
 gi|82395266 GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTTCGATACATAGCCGACCTGAGAGGGT 241

gi|80973657 GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG 325  
 AB071343.1 GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG 333  
 gi|82395251 GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG 291  
 gi|82395258 GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG 291  
 gi|83339815 GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG 336  
 gi|82395270 GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG 291  
 AF009477 GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG 350  
 AF009490.1 GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG 341  
 gi|82395266 GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG 291

gi|80973657 CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCG 375  
 AB071343.1 CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCG 383  
 gi|82395251 CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCG 341  
 gi|82395258 CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCG 341  
 gi|83339815 CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCG 386  
 gi|82395270 CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCG 341  
 AF009477 CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCG 400  
 AF009490.1 CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCG 391  
 gi|82395266 CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCG 341

```

gi|80973657 TGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACT 425
AB071343.1 TGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACT 433
gi|82395251 TGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACT 391
gi|82395258 TGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACT 391
gi|83339815 TGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACT 436
gi|82395270 TGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACT 391
AF009477 TGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACT 450
AF009490.1 TGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACT 441
gi|82395266 TGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACT 391

```



```

Reverse-16S- -----TTCTCACTTGACGGTATCTTAC----- 22
gi|80973657 GTGAGAAGAGTGGAAAGTTTCTCACTTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGA 475
AB071343.1 GTGAGAAGAGTGGAAAGTTTCTCACTTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGA 483
gi|82395251 GTGAGAAGAGTGGAAAGTTTCTCACTTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGA 441
gi|82395258 GTGAGAAGAGTGGAAAGTTTCTCACTTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGA 441
gi|83339815 GTGAGAAGAGTGGAAAGTTTCTCACTTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGA 486
gi|82395270 GTGAGAAGAGTGGAAAGTTTCTCACTTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGA 441
AF009477 GTGAGAAGAGTGGAAAGTTTCTCACTTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGA 500
AF009490.1 GTGAGAAGAGTGGAAAGTTTCTCACTTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGA 491
gi|82395266 GTGAGAAGAGTGGAAAGTTTCTCACTTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGA 441
*****

```

```

gi|80973657 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTG 525
AB071343.1 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTG 533
gi|82395251 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTG 491
gi|82395258 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTG 491
gi|83339815 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTG 536
gi|82395270 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTG 491
AF009477 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTG 550
AF009490.1 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTG 541
gi|82395266 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTG 491

```

```

gi|80973657 TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAA 575
AB071343.1 TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAA 583
gi|82395251 TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAA 541
gi|82395258 TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAA 541
gi|83339815 TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAA 586
gi|82395270 TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAA 541
AF009477 TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAA 600
AF009490.1 TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAA 591
gi|82395266 TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAA 541

```

**-Tamaño del Producto esperado**  
319 pb

**-Especificidad de los primers 16S rRNA mediante alineamiento local de secuencias.**

La pareja de primers 16S-195(s) y 16S-489(as2), mediante análisis bioinformático dá hit únicamente con secuencias de *S. suis* serotipo 2.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">CP000837.1</a>	Streptococcus suis GZ1, complete genome	<a href="#">44.6</a>	342	40%	0.095	100%
<a href="#">GU360732.1</a>	Streptococcus suis strain ATCC 43765 16S ribosomal RNA gene, pa	<a href="#">44.6</a>	85.5	40%	0.095	100%
<a href="#">AM946016.1</a>	Streptococcus suis P1/7 complete genome	<a href="#">44.6</a>	342	40%	0.095	100%
<a href="#">FM252032.1</a>	Streptococcus suis BM407 complet genome, strain BM407	<a href="#">44.6</a>	342	40%	0.095	100%
<a href="#">FM252031.1</a>	Streptococcus suis SC84 complete genome, strain SC84	<a href="#">44.6</a>	342	40%	0.095	100%
<a href="#">FJ434463.1</a>	Streptococcus suis strain L010 16S ribosomal RNA gene, partial seq	<a href="#">44.6</a>	85.5	40%	0.095	100%
<a href="#">FJ434462.1</a>	Streptococcus suis strain L004 16S ribosomal RNA gene, partial seq	<a href="#">44.6</a>	44.6	21%	0.095	100%
<a href="#">FJ434461.1</a>	Streptococcus suis strain L008 16S ribosomal RNA gene, partial seq	<a href="#">44.6</a>	44.6	21%	0.095	100%
<a href="#">FJ405354.1</a>	Streptococcus sp. 4098 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">44.6</a>	85.5	40%	0.095	100%
<a href="#">EU477176.1</a>	Streptococcus suis strain NML 070844 16S ribosomal RNA gene, par	<a href="#">44.6</a>	85.5	40%	0.095	100%
<a href="#">CP000408.1</a>	Streptococcus suis 98HAH33, complete genome	<a href="#">44.6</a>	342	40%	0.095	100%
<a href="#">CP000407.1</a>	Streptococcus suis 05ZYH33, complete genome	<a href="#">44.6</a>	342	40%	0.095	100%
<a href="#">EF431911.1</a>	Streptococcus suis clone 14 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<a href="#">44.6</a>	44.6	21%	0.095	100%
<a href="#">EF431910.1</a>	Streptococcus suis clone 13 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<a href="#">44.6</a>	85.5	40%	0.095	100%
<a href="#">EF431909.1</a>	Streptococcus suis clone 12 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<a href="#">44.6</a>	85.5	40%	0.095	100%
<a href="#">EF431908.1</a>	Streptococcus suis clone 11 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<a href="#">44.6</a>	85.5	40%	0.095	100%
<a href="#">EF431907.1</a>	Streptococcus suis clone 10 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<a href="#">44.6</a>	44.6	21%	0.095	100%
<a href="#">EF431906.1</a>	Streptococcus suis clone 9 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<a href="#">44.6</a>	85.5	40%	0.095	100%
<a href="#">EF431905.1</a>	Streptococcus suis clone 8 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<a href="#">44.6</a>	85.5	40%	0.095	100%
<a href="#">EF431904.1</a>	Streptococcus suis clone 7 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<a href="#">44.6</a>	44.6	21%	0.095	100%
<a href="#">EF431901.1</a>	Streptococcus suis clone 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<a href="#">44.6</a>	44.6	21%	0.095	100%
<a href="#">EF431900.1</a>	Streptococcus suis clone 3 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<a href="#">44.6</a>	85.5	40%	0.095	100%
<a href="#">EF431899.1</a>	Streptococcus suis clone 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<a href="#">44.6</a>	85.5	40%	0.095	100%
<a href="#">EF431898.1</a>	Streptococcus suis clone 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<a href="#">44.6</a>	85.5	40%	0.095	100%
<a href="#">DQ232539.1</a>	Streptococcus suis strain CIP 105906 16S ribosomal RNA gene, par	<a href="#">44.6</a>	85.5	40%	0.095	100%