

01672

5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL

ESTUDIO DE ANTIGENOS DE
Streptococcus suis

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
MA. DEL ROSARIO ESPERANZA GALVAN PEREZ

TUTOR: DRA. PATRICIA TATO ZALDIVAR

COMITE TUTORAL: DR. JOSE LUIS MOLINARI SORIANO
DR. CARLOS PIJOAN AGUADE



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

**A la memoria de mi padre:
Juan Pablo Galván de la Peña
lo llevo siempre en mi corazón.**

**A mi madre:
Esperanza Pérez Zúñiga
por su gran amor y apoyo
para mi superación. Sin ella
no lo hubiera logrado.**

**A mi esposo:
Everardo Anta Jaen por su
comprensión, ayuda y paciencia
Gracias Amor.**

**A mis hijos:
Everardo y Luis Fernando
por su apoyo e infinita
comprensión y paciencia.**

AGRADECIMIENTOS:

Deseo expresar mi agradecimiento:

A Dios por darme la oportunidad de lograr una meta mas en la vida.

A la Dra. Elda Jiménez Guerra quien fue la que me impulsó a superarme y me ha brindado sus conocimientos, ayuda y valiosa amistad.

A la Dra. Patricia Tato Zaldívar y al Dr. José Luis Molinari Soriano. por guiarme por el camino de la investigación, brindarme sus conocimientos, ejemplo, apoyo y amistad..

A la QFB Isabel Cortés Cuéllar y al M. en C. José Antonio Ramírez Bárcenas por su apoyo técnico para la realización de este trabajo.

Al honorable jurado: Dres.. Patricia Tato Zaldívar, Carlos Pijoan Aguade., José Luis Molinari Soriano, José Angel Gutiérrez Pabello.y Roberto Cervantes Olivares, .por sus valiosos comentarios y sugerencias a esta tesis.

Al Dr. Carlos Pijoan Aguade por la donación de los *Streptococcus suis* y sus observaciones en este trabajo.

Al Dr. Marcelo Gottschalk por la donación del antisuero anti-EF..

A mis compañeros y amigos del Departamento de Producción Animal: Cerdos y del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina por todo el apoyo brindado para el logro de esta tesis.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Patricia Tato Zaldívar en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina y en el Departamento de Producción Animal: Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

CONTENIDO

<i>Índice</i>	<i>Página</i>
Resumen.	i
Abstract.	ii
Contenido.	iii
Lista de cuadros.	iv
Lista de figuras.	v
Introducción.	1
Antecedentes.	3
a) Características de <i>Streptococcus suis</i> .	3
b) Datos históricos.	4
c) Epidemiología.	5
d) Infecciones producidas por <i>Streptococcus suis</i> .	6
e) Patogénesis.	7
f) Factores de virulencia de <i>Streptococcus suis</i> .	11
g) Diagnóstico de infecciones por <i>Streptococcus suis</i> .	13
h) Tratamiento.	15
i) Prevención.	16
Administración preventiva de antimicrobianos.	17
Inmunización.	18
j) Erradicación de infecciones.	19
Hipotesis.	21
Objetivos.	21
Material y Métodos.	23
1. Cepas de <i>Streptococcus suis</i> .	23
2. Aislamiento de <i>Streptococcus suis</i> de casos clínicos y tipificación.	23
3. Obtención de antígenos.	26
1. Determinación de la concentración de proteínas.	27

2. Electroforésis e Inmunolectrotransferencia.	27
3. Análisis de los resultados.	29
Resultados.	30
1) Análisis de los antígenos de <i>Streptococcus suis</i> .	30
2) Determinación de proteínas reconocidas por sueros homólogos.	31
3) Determinación de proteínas reconocidas por sueros heterólogos.	33
4) Reactividad de los sueros hiperinmunes contra bacterias completas hacia las preparaciones antigénicas.	40
5) Determinación de la presencia de factor extracelular.	42
6) Reconocimiento de antígenos de cepas de campo de S suis por sueros hiperinmunes anti-complejos inmunes obtenidos de las cepas de referencia 2,4,5, y 11.	43
7) Reconocimiento de antígenos de cepas de campo de S. suis por sueros hiperinmunes anti-bacteria completa.	46
Discusión.	50
Conclusiones.	55
Bibliografía.	56

Lista de Cuadros:

Página

1. Distribución numérica de los tipos capsulares de <i>S. suis</i>.	6
2. Porcentajes de 6 tipos capsulares de <i>S. suis</i>.	7
3. Pruebas bioquímicas que identifican <i>S.suis</i>.	24
4. Reconocimiento de antígenos de los diferentes complejos antigénicos de las cepas de referencia de <i>S. suis</i> por antisueros homólogos.	32
5. Reconocimiento de antígenos de los diferentes complejos antigénicos de las cepas de referencia de <i>S. suis</i> por sueros antiserotipo 2.	34
6. Reconocimiento de antígenos de los diferentes complejos antigénicos de las cepas de referencia de <i>S. suis</i> por sueros antiserotipo 4.	36
7. Reconocimiento de antígenos de los diferentes complejos antigénicos de las cepas de referencia de <i>S. suis</i> por sueros antiserotipo 5.	37
8.-Reconocimiento de antígenos de los diferentes complejos antigénicos de las cepas de referencia de <i>S. suis</i> por sueros antiserotipo 11.	39
9. Reconocimiento de antígenos de los diferentes complejos antigénicos de las cepas de referencia por antisueros homólogos contra bacterias completas.	41
10. Porcentaje de reconocimiento de los diferentes antígenos en las preparaciones antigénicas de las cepas de campo por antisueros homólogos.	43
11. Porcentaje de reconocimiento de antígenos de las diferentes preparaciones antigénicas de las cepas de campo por antisueros anti-bacteria completa.	49

Lista de Figuras	Página
1. Análisis electroforético de las preparaciones antigénicas de las cepas de referencia.	30
2. Reconocimiento de antígenos por sueros homólogos.	31
3. Determinación de antígenos por sueros heterólogos antiserotipo 2.	33
4. Reconocimiento de antígenos por sueros heterólogos antiserotipo 4.	35
5.-Reconocimiento de antígenos por sueros heterólogos antiserotipo 5.	38
6. Reconocimiento de antígenos por sueros heterólogos antiserotipo 11.	38
7. Reconocimiento de antígenos en las preparaciones antigénicas de cepas de referencia se confrontaron con sueros contra bacterias completas de serotipo homólogo.	40
8. Determinación de EF en las preparaciones antigénicas de cepas de referencia se confrontaron con un antisuero anti-factor extracelular.	42
9. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo serotipo 2 por suero hiperinmune anti preparaciones antigénicas de la cepa de referencia del serotipo 2.	44
10. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo serotipo 4 por suero hiperinmune anti preparaciones antigénicas de la cepa de referencia del serotipo 4.	44
11. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo serotipo 5 por suero hiperinmune anti preparaciones antigénicas de la cepa de referencia del serotipo 5.	45
12. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo serotipo 11 por suero hiperinmune anti preparaciones antigénicas de la cepa de referencia del serotipo 11.	45
13. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo serotipo 2 por suero hiperinmune anti bacteria completa serotipo 2.	47

14. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo serotipo 4 por suero hiperinmune anti bacteria completa serotipo 4.	47
15. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo serotipo 5 por suero hiperinmune anti bacteria completa serotipo 5.	48
16. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo serotipo 11 por suero hiperinmune anti bacteria completa serotipo 11.	48

RESUMEN

Streptococcus suis (*S. suis*) se ha asociado a cuadros clínicos como septicemia, meningitis, artritis y muerte súbita en lechones. Se han descrito 35 serotipos, el 2 es el que más frecuentemente se ha aislado de casos clínicos. En México, otros serotipos que se aíslan con frecuencia son 4, 5 y 11. El diagnóstico se confirma mediante el aislamiento del agente causal y su determinación bacteriológica y serológica. El objetivo de este trabajo fue estudiar las proteínas de 4 cepas de referencia (2, 4, 5 y 11) y determinar si existen proteínas que se compartan entre ellas. Las cepas se cultivaron, cosecharon, se obtuvieron sus antígenos y se prepararon sueros hiperinmunes contra los antígenos o las bacterias completas en conejos. Las preparaciones antigénicas (ASs) se estudiaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y por inmunoelectrotransferencia (IET). Los resultados mostraron que las cepas compartían 6 antígenos proteicos con pesos moleculares de 74, 54, 40, 38, 33 y 24 kDa que fueron reconocidos por los sueros homólogos y heterólogos y que, 4 de ellos, fueron antígenos inmunodominantes. Con el fin de determinar si sueros hiperinmunes obtenidos de bacterias completas reconocían antígenos de ASs, se realizaron ensayos de IET. Los resultados mostraron que los sueros obtenidos con bacterias completas reconocieron 8 proteínas (120, 74, 70, 60, 40, 36, 33, y 24), 3 de ellas correspondieron a antígenos inmunodominantes (74, 40 y 33 kDa). También se determinó la presencia de factor extracelular (EF) en las ASs y se encontró que la preparación del serotipo 2 tenía una proteína de 110 kDa que fue reconocida por un suero anti-EF. Finalmente, se obtuvieron antígenos de cepas de campo y se estudiaron por IET usando los sueros obtenidos con cepas de referencia encontrándose que 5 proteínas fueron reconocidas con mayor frecuencia por todas las cepas, de las cuales 3 eran antígenos inmunodominantes (74, 54, y 40 kDa). La identificación de proteínas que se comparten por las diferentes cepas podría ser útil para diseñar métodos de diagnóstico más eficientes y vacunas para el control de infecciones por cualquier serotipo de *S. suis*.

Palabras clave: *Streptococcus suis*, antígenos compartidos, serotipos 2, 4, 5 y 11.

ABSTRACT

Streptococcus suis has been associated with clinical signs such as septicemia, meningitis, arthritis and sudden death in piglets. There are 35 serotypes being the serotype 2, mainly associated with clinical signs. In Mexico, the most frequently serotypes are 2, 4, 5 and 11. The identification of *S. suis* is based on isolation and serological or biochemical tests. Serotyping identifies the antigenic differences of the capsular material. The aim of this work was to study the antigenic proteins of *S. suis* reference serotypes 2, 4, 5 and 11 and determine if they share some of these proteins. The strains were cultured, harvested and antigens were obtained. Antigens and complete bacterial cells were used to obtain hyperimmune sera in rabbits. The antigenic preparations (ASs) were studied by polyacrylamide gel electrophoresis with SDS and by Western blot. Our results showed that the strains shared 6 antigens with 74, 54, 40, 38, 33 and 24 kDa of molecular weight that were recognized by both homologous and heterologous sera and 4 of them were immunodominant antigens.

Western blot tests were also used to determine if the hyperimmune sera obtained against the whole bacteria recognized antigens in the ASs. The results showed that these sera recognized 8 proteins, 3 of them were immunodominant antigens (74, 40 and 33 kDa). Presence of extracellular factor was determined in the ASs using an anti-EF serum, a 110 kDa protein was recognized in the serotype 2 ASs. Finally, field strains were obtained and studied by Western blot using hyperimmune sera against reference strains. It was determined that 5 proteins were recognized in all the strains, 3 of them were immunodominant antigens (74, 54 and 40 kDa). The identification of shared proteins may be useful to establish diagnostic methods and to develop vaccines in order to control infections with different serotypes of *S. suis*.

Keywords: *Streptococcus suis*, shared antigens, serotypes 2,4,5 and 11.

1. INTRODUCCION

Streptococcus suis (*S. suis*) se ha asociado con casos de meningitis, artritis, septicemia y muerte súbita, y se considera uno de los patógenos bacterianos de cerdos más importantes en todo el mundo (Higgins *et al.* 1992) ya que, en los últimos 10 años, ha ocasionado pérdidas económicas importantes en la industria porcina (Higgins y Gottschalk 1999).

Se han descrito 35 serotipos de *S. suis* (Perch *et al.* 1983; Gottschalk *et al.* 1989, 1991; Higgins *et al.* 1995) y aunque infrecuentemente se han aislado cepas no tipificables, se considera que éstas no tienen importancia en la enfermedad clínica (Gottschalk 1996). Reportes previos muestran una prevalencia variable de los diferentes serotipos (Galina *et al.* 1992; Prieto *et al.* 1993; Amass *et al.* 1995). Los serotipos 2, 3, 4, 5 y 7 son los de mayor prevalencia en casos clínicos (Galina *et al.* 1992) y entre ellos, el serotipo 2 es el que más frecuentemente se aísla de casos de meningitis, septicemia, artritis y endocarditis (Higgins y Gottschalk 1999), mientras que, los serotipos 3, 4, 5, 8 y 25 se aíslan con mayor frecuencia de casos de neumonía (Wisselink *et al.* 2000).

Este microorganismo forma parte de la flora normal del aparato respiratorio alto de cerdos, localizándose principalmente en tonsilas y cavidad nasal, aunque también se puede encontrar en el tracto digestivo y genital (Higgins y Gottschalk 1999). Esta bacteria se ha aislado en la mayoría de las granjas de cerdos de todo el mundo, pero también se ha encontrado en una gran variedad de especies animales que incluyen mapaches, perros, borregos, cabras, caballos y ganado vacuno (Keymer 1983). Mas aun, *S. suis* también puede infectar al hombre produciéndole septicemia, meningitis o endocarditis (Arends y Zanen 1988). Estas infecciones se consideran ocupacionales, ya que el 60% de los casos ocurren en personas que tienen contacto con cerdos, tales como

porcicultores, veterinarios y matanceros. Los serotipos que han sido aislados en humanos son 2, 4 y 14, y de éstos, el serotipo 2 en particular se ha asociado con meningitis (Arends 1988; Gottschalk 1989; Michaud y Higgins 1996).

2. ANTECEDENTES.

a) CARACTERÍSTICAS DE *S. suis*.

Son cocos Gram positivos que se disponen en pares o cadenas cortas, anaerobios facultativos, presentan cápsula y producen alfa hemólisis. Los ácidos teicoicos de su pared celular se encuentran unidos a lípidos y su polisacárido capsular es comparable al de otros estreptococos. Acidifican la trealosa, salicina, inulina, lactosa, glucosa, maltosa, fructosa, sacarosa y galactosa; no acidifican sorbitol, manitol, rafinosa, arabinosa, dulcitol, glicerol, inositol, ramnosa y xilosa. Hidrolizan la esculina y el almidón (amilasa positivos), y son catalasa negativos. No producen glucanos y algunos producen hialuronidasa. Crecen lentamente en medios con 40% de bilis y son alfa hemolíticos en agar sangre de bovino, aunque el tipo de hemólisis en agar sangre de equino puede variar. Devriese *et al.* (1991) consideran que un estreptococo alfa hemolítico que produce amilasa pero no acetoina, debe identificarse como *S. suis*.

Originalmente, los serotipos 2, 1, 1/2 y 15 de *S. suis* se clasificaron dentro de los grupos R, S y T de Moor respectivamente (Gottschalk *et al.* 1989). En la actualidad se sabe que todos los serotipos de *S. suis* poseen determinantes antigénicos en su pared celular relacionados con el grupo D de Lancefield, aunque no están genéticamente relacionados con otros miembros de este grupo. Hasta 1985 se habían descrito 9 serotipos diferentes y en los últimos 10 años se describieron 26 mas, lo que eleva su número total a 35 serotipos (Higgins *et al.* 1995). Seguramente, el número de serotipos es todavía mayor ya que, se han aislado un buen número de cepas no tipificables (Gottschalk *et al.* 1989).

S. suis produce una hemolisina llamada "suilisina" (Feder *et al.* 1994; Gottschalk *et al.* 1995), que tiene un peso molecular de 54 kDa (Jacobs *et al.* 1994). No todas las cepas la producen y se ha relacionado con la protección, ya que cerdos inmunizados con una vacuna que contiene la hemolisina purificada se protegieron contra el desafío letal con el serotipo 2 de *S. suis* (Staats *et al.* 1995).

Se han descrito otros 2 antígenos: el factor extracelular (EF) y la proteína liberadora de muramidasa (MRP). El EF es una proteína de 110 kDa mientras que la MRP es una proteína de 136 kDa asociada a la pared celular. En función de estas proteínas se han descrito 4 fenotipos: MRP+EF+, MRP+EF-, MRP-EF+ y MRP-EF- (Gottschalk 1996; Luque *et al.* 1998). Vecht *et al.* (1992, 1993) trabajando con cepas aisladas en Europa reportaron que solo las cepas virulentas de *S. suis* serotipo 2 presentan las 2 proteínas (MRP+EF+). Sin embargo, esto no es absoluto para otros países a pesar de que la mayoría de las cepas virulentas del serotipo 2 han resultado ser dobles positivas (Gottschalk 1996). Es interesante hacer notar que en estudios de inmunoelectrotransferencia utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales contra MRP y EF, se han reconocido proteínas relacionadas de tamaño variable y con mas alto peso molecular que se han denominado MRP* y EF*. Parece que las proteínas EF* no se relacionan necesariamente con cepas virulentas (Galina *et al.* 1996).

b) DATOS HISTORICOS

Los estreptococos alfa hemolíticos causantes de septicemias en cerdos fueron bioquímica y serológicamente caracterizados por de Moor entre 1953 y 1963, quien los clasificó en los grupos R, S, RS y T (de Moor 1963). En Inglaterra, Elliot (1966) sugirió que el grupo S de de Moor era similar al D de Lancefield y propuso el nombre de *Streptococcus suis* capsular tipo 1 para este serotipo.

Más adelante, en 1975, Windsor y Elliot aislaron otros estreptococos que correspondían a los del grupo R de de Moor y los denominaron *S. suis* tipo 2. El tipo 1 se asociaba a casos de meningitis en cerdos jóvenes mientras que, el serotipo 2 a meningitis en cerdos de cualquier edad. Las cepas que reaccionaban con antisueros contra ambos serotipos se designaron como 1/2 (originalmente del grupo RS). Otras cepas provenientes de tonsilas, vagina y prepucio que pertenecían al grupo T fueron reportados por Clifton-Hadley *et al.* (1984) y este serotipo fue designado como tipo 15 (Gottchalk. *et al.* 1989). De 1983 a 1995 se describieron 32 nuevos tipos capsulares del total de 35 serotipos (Perch *et al.* 1983; Higgins *et al.* 1995). Kilpper-Balz y Schieifer (1987) designaron oficialmente a estos estreptococos como *Streptococcus suis*.

c) EPIDEMIOLOGIA

Streptococcus suis es habitante natural de los tractos respiratorio superior (particularmente tonsilas y cavidad nasal), genital, y digestivo de cerdos (Clifton-Hadley *et al.* 1986b, Devriese, *et al.* 1991; Robertson, *et al.* 1991). En estudios realizados en diferentes países se ha observado que el serotipo 2 es el que se ha aislado con mayor frecuencia, aunque su prevalencia es variable. En especial, en un estudio realizado entre enero y diciembre de 1999, se encontró que el serotipo 2 fue el más abundante en 344 cepas aisladas de cerdos enfermos (15%) en Canadá y Estados Unidos (Higgins and Gottschalk 2000), sin embargo, esta prevalencia fue la más baja en la pasada década, ya que en 1990, fue de 32% (Higgins and Gottschalk 1995). La prevalencia de los demás serotipos se puede observar en el Cuadro 1. Es interesante hacer notar que reportaron el 11% de las cepas como no tipificables y que la mayoría de ellas no eran capsuladas. Por otro lado, los 6 serotipos de *S. suis* más prevalentes entre 1992 y 1999 en Norteamérica fueron el 2, 1/2, 3, 4, 7 y 8, cuya distribución se puede observar en el Cuadro 2. Las variaciones en la prevalencia de los serotipos identificados durante este periodo fueron mínimas,

excepto para el serotipo 2, lo cual indica que el nivel de infección con este microorganismo es estable en la población de cerdos estudiada (Higgins and Gottschalk 2000).

Cuadro 1. Distribución numérica de los tipos capsulares de *Streptococcus suis* en 344 aislamientos recuperados de cerdos enfermos en 1999.

Tipo	No. de		Tipo	No. de	
capsular	cepas	%	capsular	cepas	%
1	12	4	18	0	0
2	51	15	19	1	<1
1/2	45	13	20	4	1
3	34	10	21	14	4
4	14	4	22	10	3
5	19	6	23	13	4
6	1	<1	24	0	0
7	12	4	25	4	1
8	25	7	26	0	0
9	12	4	27	3	<1
10	3	<1	28	3	<1
11	0	0	29	1	<1
12	3	<1	30	2	<1
13	1	<1	31	2	<1
14	0	0	32	1	<1
15	1	<1	33	0	0
16	6	2	34	4	1
17	1	<1	NT	36	11

Tomado de Higgins and Gottschalk, Can Vet J. 41:414, 2000.

Cuadro 2. Porcentajes de los 6 tipos capsulares de *Streptococcus suis* mas prevalentes entre 1992 y 1999 en Canadá.

Tipo	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
2	23	19	24	18	18	18	22	15
1/2	13	8	9	14	8	11	13	13
3	13	10	10	12	14	11	12	10
4	5	3	5	8	5	5	3	4
7	7	7	6	8	10	7	6	4
8	7	8	7	7	6	7	6	7

Tomado de Higgins and Gottschalk, Can Vet J 41:414, 2000.

S. suis se ha recuperado de una gran variedad de especies de mamíferos. En 1983, se reportó un aislamiento del serotipo 2 a partir de un mapache en un parque nacional (Keymer *et al.* 1983). Se ha sugerido que *S. suis* es un miembro de la flora normal intestinal de ganados vacuno, ovino, caprino y equino. (Devriese, *et al.* 1990). Se han recuperado los serotipos 2 y 5 de lesiones supurativas del ganado vacuno, ovino y caprino. Todos los casos fueron esporádicos y sólo uno de ellos se relacionó con la presencia de cerdos en la granja (Hommez, *et al.* 1988). En 1990, en Bélgica se reportó un caso de meningitis en un caballo que había estado en contacto con ganado. En Canadá, se aisló en cultivo puro el serotipo 2 de un feto de bovino; el serotipo 16 a partir de un caso de bronconeumonía purulenta en un becerro de 6 semanas; el serotipo 31 de una vaca con edema cerebral y el 33 de un borrego con problemas de artritis (Higgins, *et al.* 1990b, 1995). También se han aislado cepas de *S. suis* en perros, gatos, cebras, venados, patos y otras aves (Salasia *et al.* 1994 ; Devriese *et al.* 1993, 1994a).

La mayoría de las cepas han sido aisladas de cerdos enfermos. Sin embargo, los serotipos 17, 18, 19 y 21 fueron aislados de cerdos sanos, el serotipo 14 de humano, el 20 y 31 de ganado vacuno enfermo y el 33 a partir de un borrego (Gottschalk *et al.* 1989; Higgins *et al.* 1995).

Por otro lado, se ha observado que la distribución de los serotipos varía en los diferentes países e inclusive se ha reportado que puede variar con el tiempo. Por ejemplo en Australia y Holanda, el serotipo 9 es el más frecuentemente aislado mientras que en Finlandia lo es el 7 (Sihovenen *et al.*, 1988; Gogolevski *et al.* 1990; Jacobs *et al.* 1995) y en Escocia el 14 (MacLennam *et al.* 1996). En Dinamarca, el serotipo 7 predominó alrededor de 15 años pero a partir de 1990, el serotipo 2 es el que más frecuentemente se ha aislado en este país (Perch *et al.* 1983; Aarestrup *et al.* 1998a; J.P Nielsen comunicación personal).

d) INFECCIONES PRODUCIDAS POR *S. suis*

Los primeros reportes de infecciones por *S. suis* fueron publicados por Jansen y Van Dorsen (1951) en Holanda y por Field *et al.* (1954) en Inglaterra. Desde entonces, han sido reportados casos en todos los continentes donde existe la industria porcícola. Las infecciones se han encontrado tanto en granjas tradicionales como en sistemas intensivos de producción.

En cerdos, *S. suis* puede causar meningitis, endocarditis, neumonía, septicemia, artritis, poliserositis y muerte súbita en lechones (Clinton-Hadley 1983; Vecht 1989; Higgins 1990b; Higgins 1992). Sin embargo, su implicación como agente primario causal de neumonía es controversial. La mayoría de los serotipos aislados de cerdos enfermos pertenecen a un número limitado de tipos capsulares comprendidos entre el serotipo 1 al 8 (Gottschalk 1999). En ruminantes, las cepas patógenas pertenecen a los serotipos 2, 5, 8, 9, 16 y 20 y

se han asociado con infecciones extramamarias (/Hommez *et al.* 1988; Higgins *et al.* 1990b).

e) PATOGENESIS

En general, la patogénesis de una infección está influenciada por la resistencia del hospedero, factores del medio ambiente y atributos que confieren virulencia al agente infeccioso. En las infecciones por *S suis*, la patogénesis no está bien entendida. Sin embargo, se piensa que los microorganismos pueden diseminarse sistémicamente desde la nasofaringe, resultando, ocasionalmente, en septicemia y en algunos casos, en muerte. La mayoría de los estudios se han enfocado en el serotipo 2 y en la producción de meningitis (Gottschalck, 1999). Los lechones adquieren esta bacteria durante el nacimiento o a través del contacto con la madre, sus heces y las estructuras que los rodean (paredes, suelo sucio, barrotes, etc.). La infección puede tener lugar a través de las vías respiratorias. Sin embargo, se desconoce la razón por la cual no todos los cerdos se enferman. Los animales colonizados portan a la bacteria en sus tonsilas, algunos son portadores sanos y nunca desarrollarán enfermedad mientras que otros, tarde o temprano desarrollan bacteremia y en algunos casos septicemia y finalmente meningitis (Gottschalk and Segura 2000).

Hay pocos estudios acerca de las interacciones entre *S. suis* y las células epiteliales. Se ha reportado recientemente, que cepas virulentas de *S. suis* pueden invadir en cierto grado una línea celular epitelial de origen humano (Norton *et al.* 1999). Este grupo encontró también, que cepas productoras de suilisina fueron citotóxicas para las células y que anticuerpos anti-suilisina contrarrestaron este efecto. La citotoxicidad de la suilisina fue confirmada mas tarde por Lalonde *et al.* (2000) usando una línea celular de cerdo, aunque no pudieron encontrar invasión de las células. Interesantemente, se observó un

alto nivel de adhesión para diferentes cepas y líneas celulares probadas, mediada por componentes de la pared celular, y la cual fue considerablemente reducida en la presencia del polisacárido capsular. Sin embargo, el polisacárido no pudo inhibir la adhesión de *S. suis* a las células endoteliales microvasculares (Charland *et al.* 2000). St. Geme y Cutter (1996) sugirieron que la encapsulación bacteriana puede ser modulada de acuerdo al estadio infeccioso, es decir que es regulada negativamente durante la colonización de las células epiteliales del tracto respiratorio y que una vez en el torrente sanguíneo, se induce la producción de la cápsula pudiendo proteger a la bacteria de la respuesta inmune aunque no evita por completo la adhesión a otras células. En este sentido, se ha demostrado que *S. suis* produce una mayor cantidad de polisacárido capsular *in vivo* que *in vitro* (Charland *et al.* 1996).

Los posibles pasos involucrados en la patogénesis de la meningitis son la ingestión de las bacterias por los monocitos y su transporte al líquido cerebroespinal vía el plexo coroideo, y la estimulación de la producción de citocinas por monocitos, lo cual conduciría al paso del infiltrado inflamatorio de la sangre al líquido cefalorraquídeo (Williams 1990; Chanter *et al.* 1993). Sin embargo, el rápido efecto de la penicilina en animales infectados hace improbable esta hipótesis ya que este antibiótico no penetra en monocitos o macrófagos. Por otro lado, se ha mostrado que los macrófagos son capaces de fagocitar bacterias en poca cantidad y que la mayoría de los microorganismos permanecen fuera de las células fagocíticas (Segura *et. al* 1998).

A pesar de la prevalencia de los casos de neumonía en los que se ha aislado *S. suis* en cultivo puro o en asociación con otros microorganismos, la patogénesis no ha sido bien investigada. Hasta ahora, no se ha reportado la aparición de neumonía en animales infectados experimentalmente solo con *S. suis*. Es probable que la infección se adquiriera por vía respiratoria y que la

colonización ocurra al mismo tiempo que la multiplicación de la bacteria. En un estudio se mostró que las cepas aisladas de casos de meningitis se adhirieron a secciones de tejido pulmonar de lechones recién nacidos, en menor cantidad que en casos de neumonía (Gottschalk *et al.* 1991), lo que sugiere que existen cepas con diferentes tropismos o bien, que algunas infecciones neumónicas resultan de bacteremia, ya sea por infección directa de los alvéolos o por transporte a los alvéolos a través de monocitos (Alexander 1995).

Es probable que infecciones virales concomitantes pudieran potencializar el desarrollo de lesiones debidas a *S. suis*. Iglesias *et al.* (1992) concluyeron que la enfermedad clínica asociada con el tipo 2 fue incrementada por una infección concomitante con virus de pseudorabia. Más recientemente, se ha sugerido que el virus del síndrome respiratorio y reproductivo de los cerdos (PRRSV) predispone a cerdos libres de patógenos a la infección y enfermedad causada por *S. suis* tipo 2 (Galina *et al.* 1994).

f) FACTORES DE VIRULENCIA DE *Streptococcus suis*

Los factores de virulencia tampoco están bien definidos. En algunos trabajos, se ha tratado de determinar la participación en la patogenicidad de diferentes factores tales como las fimbrias, hemaglutininas, la cápsula y la hemolisina (suilisina). De éstos, la cápsula, algunas proteínas y la suilisina han sido los factores de virulencia mas exhaustivamente estudiados. La cápsula posee ácido siálico y se considera como un factor de virulencia porque inhibe la fagocitosis, pero su papel en las infecciones no ha sido bien demostrado, ya que se ha reportado que hay cepas virulentas y menos virulentas crecidas *in vivo* que muestran cápsulas gruesas (Charland *et al.* 1996). Sin embargo, se ha demostrado que las mutantes acapsuladas isogénicas obtenidas por mutagénesis con transposones son avirulentas, comparadas con las cepas

silvestres (Charland *et al.* 1998), lo que permitiría considerar a la cápsula como un factor de virulencia, pero no como un buen marcador de virulencia.

También han sido identificadas dos proteínas como marcadores de virulencia: la MRP y el EF (Vecht *et al.* 1991). Se ha demostrado que un alto porcentaje de cepas patógenas europeas de *S. suis* serotipo 2 y de otros serotipos presentan ambas proteínas (MRP+EF+) (Vecht *et al.* 1991; Luque *et al.* 1998). Sin embargo, la mayoría de las cepas patógenas aisladas de animales en Canadá no las expresan (Gottschalk *et al.* 1998a). Por otro lado, se ha reportado que mutantes isogénicas defectuosas en estas proteínas permanecen virulentas cuando son comparadas con las cepas silvestres.

La suilisina es producida por cepas de *S. suis* (Gottschalk *et al.* 1995) y también se le ha considerado como un factor de virulencia, ya que anticuerpos contra esta exotoxina inducen protección en ratones y cerdos contra la infección experimental (Jacob *et al.* 1996). Cepas de *S. suis* serotipo 2 de muchos países europeos son hemolisina positivos. La suilisina no es producida por la mayoría de las cepas virulentas en Norteamérica (Gottschalk *et al.* 1998a), por ejemplo, de las cepas probadas en Canadá se encontró que solo una producía hemolisina y parecía tener el perfil europeo para sus proteínas, siendo MRP+EF+ (Gottschalk 1996). Por lo tanto, la hemolisina parece no estar relacionada con la virulencia en Norteamérica.

Las fimbrias son otro factor potencial de virulencia, ya que se sabe que participan en la adherencia de las bacterias a las células y son estructural y/o funcionalmente diferentes en cepas virulentas y no virulentas (Gottschalk *et al.* 1990). Otras proteínas de pared celular se han relacionado con la virulencia, sin embargo, los perfiles de proteínas de las cepas virulentas y avirulentas son muy similares (Holt *et al.* 1990; Quessy 1994). Además, se ha descrito una proteína con peso molecular aproximado de 52 kDa que se une a una

inmunoglobulina (IgG) y que pudiera interferir con la opsonización de la bacteria, evitando o reduciendo la fagocitosis, sin embargo, esta proteína está presente en cepas virulentas y avirulentas (Serhir *et al.* 1993, 1995). También se han descrito como factores de virulencia una adhesina de galactosil-(alfa 1-4)-galactosa (Tikanen *et al.* 1996) y una proteína que se une a albúmina (Quessy *et al.* 1997).

g) DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES POR *Streptococcus suis*

El diagnóstico presuntivo de infecciones por *S. suis* se basa en los signos clínicos y en las lesiones macroscópicas en los tejidos y se confirma mediante el aislamiento del agente causal y el reconocimiento de las lesiones microscópicas. En los casos de meningitis, el aislamiento se realiza a partir del líquido cefalorraquídeo o del encéfalo. Para septicemia, el aislamiento de pulmón debe tomarse con cautela, ya que *S. suis* está frecuentemente presente en el pulmón de animales sanos (Mwaniki *et al.* 1994), por lo que se recomienda el aislamiento en otros tejidos. Los cerdos pueden albergar variedad de cepas o serotipos en su cavidad nasal y tonsilas y no estar relacionadas con un cuadro patológico específico. Es más, es posible aislar múltiples serotipos de animales enfermos en el mismo hato (Higgins and Gottschalk 1999).

La determinación bacteriológica de las cepas de *S. suis* se realiza con un mínimo de pruebas bioquímicas cuando la serotipificación está disponible (Higgins and Gottschalk 1990). Devriese *et al.* (1991) han sugerido el uso de solo 2 pruebas en los aislados de cerdos: amilasa positiva y acetoina negativa (Voges-Proskauer).

La serotipificación sigue siendo una parte importante del diagnóstico de rutina y se basa en las diferencias antigénicas del material capsular, que está

principalmente compuesto por carbohidratos. Para la identificación de antígenos específicos de serotipo de *S. suis* han sido descritas diferentes técnicas. El método clásico de Lancefield fue el primero en utilizarse (de Moor 1963; Perch *et al.* 1983), pero se abandonó por ser demasiado laborioso y requerir mucho tiempo para realizarse (Perch *et al.* 1983; Gottschalk *et al.* 1989). Otros métodos que han sido usados, son la aglutinación en placa y las pruebas de inmunodifusión, aunque no parecen ser muy específicas (Hommeiz *et al.* 1986; Rosendal *et al.* 1986). Mas recientemente, la coaglutinación y las pruebas de reacción capsular se han reportado como las mas confiables (Higgins and Gottschalk 1990). Finalmente, se ha desarrollado un ensayo de ELISA para la detección de algunos tipos capsulares (Serhir *et al.* 1993).

Estas pruebas serológicas han sido evaluadas y como resultado la mayoría de los laboratorios utilizan la coaglutinación (Higgins and Gottschalk 1999). Algunas cepas dan reacciones cruzadas con mas de un antisuero con esta técnica, pero estas reacciones pueden eliminarse en la mayoría de los casos, por absorción de los antisueros, aunque en algunos permanecen, como en el serotipo 1/2 (Hampson *et al.* 1993). Estudios recientes han mostrado que el ELISA usando antígenos capsulares purificados tiene la mejor especificidad (del Campo Sepúlveda *et al.* 1996; Kataoka *et al.* 1996).

Las técnicas genéticas son muy útiles para distinguir aislados individuales de *S. suis*, para establecer el origen de la infección en un hato dado, o para asegurarse de que la cepa correcta está incluida en la vacuna que se va a aplicar (Higgins and Gottschalk 1999). Utilizando la técnica de "fingerprinting", se ha demostrado la existencia de una diversidad importante entre los aislados del tipo capsular 2 (Mogollon *et al.* 1990). Mas recientemente, Beaudoin *et al.* (1992) confirmaron la diversidad genética entre aislados y observaron que, aunque los de animales sanos genéticamente eran muy heterogéneos, esto no ocurría en la mayoría de los aislados en casos de septicemia.

En México, se usa la serotipificación para el diagnóstico. Los antisueros se producen con cepas de referencia que son cultivadas durante 18 h en agar gelosa sangre, cosechadas y lavadas con amortiguador de fosfatos salino (PBS) formalinizado al 0.3% e incubadas durante toda la noche. Los conejos con un peso entre 2.5 a 3 Kg se inoculan las primeras dos semanas con adyuvante incompleto de Freud por vía subcutánea (0.5 ml), con una concentración de 6×10^8 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) y posteriormente 4 a 5 inoculaciones semanales mas (0.25 ml) por la vena marginal de las orejas con 8×10^9 UFC. Diez días después de la última inmunización, los conejos se sangran y los sueros se titulan. Se pueden hacer 2 inoculaciones mas para obtener un mayor título de anticuerpos (Gottschalk 1993).

h) TRATAMIENTO

El tratamiento de las infecciones por *S. suis* se basa en la aplicación, por vía parenteral, de antibióticos durante cinco días o más; los animales con septicemia, meningitis y artritis rara vez responden al tratamiento (Martínez 1997). La amoxicilina, el ceftiofur y la penicilina son los antimicrobianos mas usados para tratar estas infecciones (Un Han *et al.* 2001; Kataoka *et al.* 2000) y de éstos las penicilinas han sido utilizadas como agentes quimioprolácticos.

Recientemente, se han encontrado cepas resistentes a penicilina (Gottschalk *et al.* 1991; Tarradas *et al.* 1994), por lo que ahora se recomienda que este antimicrobiano se use solo en casos en los que la susceptibilidad se haya comprobado. Diferentes autores han reportado un alto grado de resistencia a tetraciclinas, clindamicina, eritromicina, kanamicina, neomicina y estreptomycin (Tarradas *et al.* 1994; Prieto *et al.* 1994; Turgeon *et al.* 1994; Salmon *et al.* 1995). La susceptibilidad al trimetoprim con sulfametoxasol

parece ser variable (Turgeon *et al.* 1994; Tarradas *et al.* 1994). Martínez (1997) reportó que en México, el 92% de los aislados de *S. suis* son susceptibles al Florfenicol, 90% a la Cefalotina, 86% a la Ceftriaxona, y 82% a la Cefotaxina y Amoxicilina.

El pronto reconocimiento de los signos clínicos de meningitis por estreptococos seguido del tratamiento parenteral con un antibiótico apropiado es el mejor método para maximizar la sobrevivencia de los cerdos. Junto con la terapia se recomienda un agente anti-inflamatorio para el tratamiento de la meningitis en cerdos (Amass 1997). La gentamicina parece ser muy activa contra *S. suis* y en combinación con penicilina es recomendado en humanos para el tratamiento de endocarditis producida por este microorganismo (Trottier *et al.* 1991).

i) PREVENCIÓN

Control de factores de riesgo

Las infecciones por *S. suis* son un ejemplo de las enfermedades emergentes asociadas a la intensificación de la industria porcina. Múltiples factores están involucrados sobresaliendo entre ellos, el status de salud del hato (infecciones concomitantes y estados de inmunosupresión), el grado de virulencia de las cepas involucradas, la calidad del medio ambiente y de la atención por los porcicultores (Higgins and Gottschalk 1999). Los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de infecciones por *S. suis* en cerdos susceptibles son el hacinamiento, la pobre ventilación, excesivas fluctuaciones de temperatura y el mezclar cerdos de diferentes edades (mas de 2 semanas de diferencia). Las formas en que se pueden controlar estos factores de riesgo incluyen un manejo adecuado de los cerdos en corrales mas pequeños para evitar las mezclas, así como, sacar a los animales de una misma edad al mismo tiempo; minimizar las fluctuaciones de temperatura; y la desinfección y

limpieza de los corrales entre la entrada y salida de grupos de cerdos. Todo esto reduciría la diseminación de microorganismos, mejorando el status de salud y la conversión alimenticia (Dee *et al.* 1993).

La medicación temprana en la alimentación después del destete de los lechones, se ha usado para mejorar el status de salud de los cerdos y para eliminar algunos microorganismos infecciosos (Alexander *et al.* 1980). Se acepta que este método es exitoso para controlar la pleuroneumonía y la disentería, pero su capacidad para reducir o eliminar microorganismos que colonizan tempranamente como *Haemophilus parasuis* y *Actinobacillus suis* es cuestionable. El control de estos problemas requiere de nuevas técnicas diagnósticas así como de la manipulación de la inmunidad de la madre y de la transmisión de la enfermedad antes del destete (Pijoan 1996).

Administración preventiva de antimicrobianos

Antes de realizar un tratamiento profiláctico antimicrobiano en cerdos, se deben tomar en cuenta varios factores como: la biodisponibilidad, la ruta de administración (alimentos o agua), competencia (hacinamiento) y la concentración en el suero necesaria para matar a *S. suis* (del Castillo *et al.* 1995; Amass 1997). Se ha reportado que la penicilina procaínica incorporada a los alimentos redujo significativamente la prevalencia de meningitis por estreptococos en un hato (McKellar *et al.* 1987). Del Castillo *et al.* (1995) encontraron que de todos los tipos de tratamientos orales con penicilina, sólo el tratamiento de lechones con penicilina V en agua permitía que se alcanzaran niveles séricos más altos que los requeridos para eliminar las cepas de *S. suis* probadas. Estos autores proponen que las penicilinas deberían administrarse únicamente por vía oral y en agua para reducir la interferencia en la adsorción debida a la presencia del alimento.

Las amoxicilinas tienen ventajas sobre las penicilinas naturales para ser utilizadas en la medicación en masa, ya que su biodisponibilidad es similar, pero su eliminación del cuerpo es mas baja que la de la penicilina V por lo que se pueden obtener concentraciones mas altas en el suero (del Castillo *et al.* 1995).

Inmunización

Hasta ahora, la mayoría de las vacunas usadas para proteger contra las infecciones por *S. suis* han sido bacterinas autógenas y los resultados de estas inmunizaciones son inconsistentes. Es posible que estas vacunas no sean eficientes debido a diferentes factores como la degradación de antígenos protectores, la pérdida de antigenicidad de la bacteria a causa del proceso de calentamiento o formalinización (Holt *et al.* 1990), la baja inmunogenicidad de la bacteria capsulada (del Campo Sepúlveda *et al.* 1996), o bien, la inducción de anticuerpos dirigidos a antígenos no asociados con factores de virulencia (Holt *et al.* 1988). Reams *et al.* (1996) han sugerido que la presencia de múltiples serotipos en un mismo hato pueda influenciar la pobre respuesta a la vacunación. Algunas cepas pueden ser patógenas primarias causando septicemia, meningitis o artritis, pero la mayoría se consideran oportunistas o patógenos pulmonares secundarios los cuales, sin lugar a duda, deberían tomarse en cuenta en los programas de vacunación (Reams *et al.* 1996).

Además de la bacterinas, se han probado vacunas atenuadas, como las mutantes sensibles a la temperatura de *S. suis* serotipo 1/2, que han mostrado diversos grados de protección en ratones contra el desafío de los serotipos 1, 2 y 1/2 (Kebede *et al.* 1990). La vacunación de ratones con una mutante dependiente de estreptomycin de este serotipo resultó en protección total contra el desafío con los serotipos 1 y 1/2 y en protección parcial contra el desafío del serotipo 2 (Foster *et al.* 1994). También se han probado inmunizaciones con cepas avirulentas obteniéndose protección en ratones y

en cerdos contra el desafío del serotipo 2 (Holt *et al.* 1988; Quessy *et al.* 1994b; Kobisch *et al.* 1995; Del Campo Sepúlveda *et al.* 1996). Esto sugiere que los antígenos importantes no son factores de virulencia, ya que ambas cepas, virulentas y avirulentas, pueden inducir protección.

Diferentes proteínas de la pared celular del serotipo 2 pueden inducir también una buena protección (Holt *et al.* 1990; Quessy *et al.* 1994). Sin embargo, proteínas como la MRP de 136 kDa que tienen en buen potencial inmunogénico no están presentes en todas las cepas virulentas (Quessy *et al.* 1994; Galina *et al.* 1996). Se han probado vacunas contra proteínas extracelulares como la suilisina y el EF (110 kDa) y los resultados han mostrado que se induce protección completa con la suilisina purificada y solo parcialmente con el EF (Jacobs *et al.* 1996). Aunque la suilisina es producida por un gran número de serotipos y aislados de campo a partir de cerdos enfermos (Jacobs *et al.* 1995), hay cepas virulentas en Norteamérica que no producen hemolisina detectable (Gottschalk 1996).

Se ha establecido la importancia de la inmunidad humoral en la protección contra infecciones por *S. suis*, ya que se puede transferir pasivamente protección contra el serotipo 2 a través de sueros (Holt *et al.* 1988). Sin embargo, se ha reportado que se producen títulos bajos de anticuerpos anti-polisacárido capsular en cerdos infectados natural o experimentalmente (Del Campo Sepúlveda *et al.* 1996) y que cuando se utiliza un anticuerpo monoclonal contra el polisacárido capsular del serotipo 2 no se induce protección en ratones (Charland *et al.* 1996).

J) ERRADICACIÓN DE INFECCIONES POR *S. suis*

De acuerdo a Clifton-Hadley *et al.* (1986) solo sacando a todos los cerdos y volviendo a poblar los corrales con cerdos no infectados, se puede asegurar la erradicación de la infección, lo cual es muy costoso. Por otro lado, Amass *et al.*

(1996) consideran que la optimización del manejo de cerdos y de su medio ambiente, aunado al tratamiento médico de animales enfermos clínicamente es suficiente para el control y la prevención de la mortalidad causada por estreptococosis. Es importante mencionar que también se deben practicar medidas de bioseguridad que incluyan eliminar roedores y moscas (Amass,1997). Finalmente, recomiendan la cesárea para obtener cerdos libres de *S. suis* (Amass *et al.* 1996).

Considerando que existen múltiples serotipos que se asocian con la enfermedad en cerdos, que la frecuencia de los serotipos es variable y que las técnicas de diagnóstico, principalmente las serológicas, no permiten obtener resultados en corto tiempo, se hace imperioso el continuar investigando con el fin de encontrar herramientas mas adecuadas de diagnóstico y mecanismos de control y prevención más eficientes.

Con estos antecedentes, el objetivo de nuestro trabajo es estudiar los antígenos de diferentes cepas de *Streptococcus suis* con la intención de identificar proteínas que se compartan por las diferentes cepas y que pudieran ser útiles para diseñar vacunas que protejan contra diferentes serotipos y mejorar el diagnóstico.

HIPOTESIS

Sí los diferentes serotipos de *Streptococcus suis* son bacterias Gram + que comparten muchas características entre sí y cuyas diferencias antigénicas residen en los polisacáridos capsulares; entonces es posible que los diferentes serotipos compartan antígenos protéicos que pudieran ser útiles para el diagnóstico y el control o prevención de las infecciones producidas por este microorganismo.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la composición antigénica de cepas de referencia de *Streptococcus suis* (serotipos 2, 4, 5 y 11), determinar con sueros homólogos y heterólogos, los antígenos protéicos que se comparten y establecer la presencia de estos antígenos en cepas de campo aisladas de casos clínicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener antígenos protéicos de las cepas de referencia de *S. suis* serotipos 2, 4, 5 y 11.
2. Preparar antisueros en conejo con cada una de las preparaciones antigénicas obtenidas con las cepas de referencia.
3. Definir los antígenos que son reconocidos por los sueros hiperinmunes.
4. Comparar la composición antigénica de las cepas de referencia entre sí y determinar los pesos moleculares de las proteínas compartidas entre ellas.

HIPOTESIS

Sí los diferentes serotipos de *Streptococcus suis* son bacterias Gram + que comparten muchas características entre sí y cuyas diferencias antigénicas residen en los polisacáridos capsulares; entonces es posible que los diferentes serotipos compartan antígenos protéicos que pudieran ser útiles para el diagnóstico y el control o prevención de las infecciones producidas por este microorganismo.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la composición antigénica de cepas de referencia de *Streptococcus suis* (serotipos 2, 4, 5 y 11), determinar con sueros homólogos y heterólogos, los antígenos protéicos que se comparten y establecer la presencia de estos antígenos en cepas de campo aisladas de casos clínicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener antígenos protéicos de las cepas de referencia de *S. suis* serotipos 2, 4, 5 y 11.
2. Preparar antisueros en conejo con cada una de las preparaciones antigénicas obtenidas con las cepas de referencia.
3. Definir los antígenos que son reconocidos por los sueros hiperinmunes.
4. Comparar la composición antigénica de las cepas de referencia entre sí y determinar los pesos moleculares de las proteínas compartidas entre ellas.

5. Determinar por ensayos de inmunoelectrotransferencia la presencia del factor extracelular en las preparaciones antigénicas de las cepas de referencia.
6. Tipificar por coagulación 25 cepas de *S. suis* obtenidas de casos clínicos de cerdos con meningitis y endocarditis y obtener antígenos de estas cepas.
7. Establecer los patrones de reconocimiento de los antígenos de las cepas obtenidas de casos clínicos con los antisueros obtenidos con los antígenos de las cepas de referencia o con antisueros obtenidos con las bacterias completas.

MATERIAL Y METODOS

1. Cepas de *Streptococcus suis*.

Se utilizaron cepas de referencia de *S. suis* de los serotipos 2, 4, 5 y 11 gentilmente donadas por el Dr. Carlos Pijoan de la Universidad de Minesota. Estos serotipos corresponden a los más frecuentemente aislados en nuestro país (Galván *et al.* 1997). También se utilizaron 25 cepas de *S. suis* obtenidas de casos clínicos a partir de líquidos cefalorraquídeos (LCR) y de corazón, cuyos serotipos se determinaron por coaglutinación, se registraron sus frecuencias y se congelaron hasta su uso.

2. Aislamiento de *Streptococcus suis* de casos clínicos y su tipificación.

Las muestras de LCR y de corazón de cerdos enfermos de diferentes granjas del país fueron obtenidas del laboratorio de Bacteriología del Departamento de Producción Animal: Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Estas muestras se sembraron en gelosa sangre (8% sangre de equino en agar nutritivo) y se incubaron durante toda la noche a 37°C. A partir de las colonias alfa hemolíticas se realizaron frotis y tinción de Gram para seleccionar las colonias de estreptococos. Estas se sembraron en caldo Todd Hewitt por 24 h a 37°C y a partir de estos cultivos se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: crecimiento en medios de cloruro de sodio al 6.5%, producción de acetoina (Voges–Proskauer), producción de amilasa, de catalasa y de ácidos a partir de manitol, sorbitol, salicin, sacarosa, trealosa y lactosa. Si las pruebas bioquímicas identificaban al microorganismo como *S. suis* (Cuadro 3), se realizaba la serotipificación por coaglutinación (Gottschalk *et al.* 1996)

Cuadro 3. Pruebas bioquímicas que identifican a *Streptococcus suis*

Prueba Bioquímica	S. <i>suis</i>	S. <i>pneumoniae</i>
Hemólisis	α	α
Catalasa	Negativo	Negativo
Amilasa	Positivo	Negativo
Voges-Proskauer	Negativo	Negativo
Arabinosa	Negativo	Positivo
Dulcitol	Negativo	Negativo
Glicerol	Negativo	Positivo
Inositol	Negativo	NT
Manitol	Negativo	Negativo
Rafinosa	Negativo	Positivo
Ramnosa	Negativo	NT
Sorbitol	Negativo	Negativo
Xilosa	Negativo	Positivo
Fructuosa	Positivo	Positivo
Galactosa	Positivo	Positivo
Glucosa	Positivo	Positivo
Lactosa	Positivo	Positivo
Inulina	Positivo	Positivo
Maltosa	Positivo	Positivo
Sacarosa	Positivo	Positivo
Salicin	Positivo	NT
Trealosa	Positivo	Trealosa

Tomado del Manual Bergey
 NT No tipificado

La coaglutinación consiste en aglutinar a los estreptococos utilizando anticuerpos anti-*S. suis* acoplados a *Staphylococcus* a través de la proteína A. El reactivo de coaglutinación fue preparado por el procedimiento descrito por Christensen, *et al.* 1973). Brevemente, la cepa Cowan de *S. aureus* se cultivó en agar de soya tripticasa¹ durante 18 h a 37°C, las células se colectaron en un amortiguador de fosfatos salino (PBS), pH 7.4 que contenía 0.15 M de NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄, y 0.01 M KH₂PO₄ y se lavaron 2 veces por centrifugación¹ a 1395 gx/20 min. Las bacterias fueron resuspendidas en PBS con 0.5% de formaldehído y se mantuvieron 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron una vez mas con PBS y se ajustó el volumen a 10 ml con el mismo amortiguador. Estas suspensiones se calentaron a 80°C por 5 min e inmediatamente después se les bajó la temperatura con hielo en agua. Después, se le agregó a cada alícuota 50 µl/ml de un antisuero anti-*S. suis* con un título mínimo de 1:32 obtenido por la inmunización de conejos con bacterias formalinizadas. Las suspensiones se incubaron 1 h a temperatura ambiente con agitación cada 15 min y se centrifugaron a 1395 gx durante 15 min. Las bacterias se lavaron 2 veces y finalmente fueron resuspendidas a una concentración del 10% (V/V) con PBS que contenía 0.05% de azida de sodio y 0.1% de albúmina sérica bovina² (Galván *et al.* 1997). La reacción se llevó a cabo en un portaobjetos al que se le agregó una gota de cada reactivo de coaglutinación (17 reactivos que reconocen a los serotipos 1, 1/2, 2-11, 18-22) y una gota de la bacteria formalinizada a una concentración del Tubo No. 2 McFarlan (6x10⁸ UFC/ml de muestra) obtenida de las muestras de cerdos enfermos, se homogenizaron las muestras con un aplicador y se observaron en cámara con luz indirecta para determinar la presencia de grumos o conglomerados de bacterias. Como testigos se utilizaron PBS, un antisuero positivo y uno negativo.

‡ Becton Dickinson Diagnostic, Cockeysville, MD, USA.

*¹ Sorvall Products L.P. Sorval Super 21, Conneticut, USA

3. Obtención de antígenos.

Los complejos antigénicos se obtuvieron siguiendo el método de los polvos acetónicos bacterianos descrito por Tato *et al.* (1979). Cada una de las cepas de referencia así como las obtenidas de cerdos enfermos, se cultivaron en 50 ml en caldo Todd-Hewitt durante toda la noche a 37°C y al día siguiente este cultivo se inoculó en 2 l del mismo caldo y se incubó hasta que el cultivo alcanzó la fase logarítmica de crecimiento (5-6h)..Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10,620 gx por 15 min y se lavaron 2 veces con amortiguador de fosfatos de sodio (0.02M, pH 7.2). Posteriormente, se resuspendieron en acetona fría deshidratada con cloruro de calcio, y se lavaron, por centrifugación a 10,620 gx/15 min, con la misma acetona hasta que los sobrenadantes salieron claros (2-3 veces). Los paquetes celulares se disgregaron en una caja de petri y se dejaron en un desecador durante 48-72 h para eliminar el resto de la acetona. Los polvos acetónicos se resuspendieron en un mortero con una solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.02 M pH 7.2 que contenía 0.1 M de cloruro de potasio, 0.25 M de sacarosa, 0.12 M de cloruro de magnesio, 0.4% de desoxicolato de sodio y 20 µg/ml de DNasa (solución amortiguadora de extracción) y se incubaron a 37°C durante 2 h en baño maría con agitación constante con la finalidad de extraer los antígenos proteicos. Después de la incubación, se dializaron contra una solución de fosfatos de sodio 0.01M pH 7.2, usando una membrana de diálisis Spectrapor³ que excluye moléculas con peso molecular menor de 12,000-14,000 Da durante 3 días con cambios cada 8 hrs. Después de la diálisis, el material dentro de la membrana se centrifugó a 10,620 g durante 15 min y el sobrenadante se esterilizó por filtración a través de membranas de Milipore⁴ 0.22µ y se liofilizó.

² Sigma Chemical Company, St Louis, MD, USA.

³ Spectrum Laboratories Inc. Rancho Dominguez, CA, USA

⁴ Millipore Corporation, Bedford, MA, USA

4. Determinación de la concentración de proteínas.

Para determinar la concentración de proteína de los complejos antigénicos de *S. suis* se utilizó el método descrito por Bradford (1976). La curva patrón se obtuvo a partir de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1mg/ml. Las determinaciones se realizaron en placas de 96 pozos y las lecturas se hicieron en un lector de ELISA (Multiscan II⁵) a 590nm.

5. Obtención de sueros hiperinmunes.

Se obtuvieron sueros hiperinmunes en conejos contra bacterias completas formalinizadas y de complejos antigénicos de cada cepa de referencia (serotipos 2, 4, 5 y 11). Se inocularon 2 conejos a una concentración del Tubo No. 2 McFarlan (6×10^8 UFC/ml de muestra) o 100 µg de complejos antigénicos de cada cepa de referencia semanalmente. En las primeras 2 inmunizaciones, se utilizó hidróxido de aluminio como adyuvante. Se realizaron 4 refuerzos mas y 10 días después de la última inmunización se sangraron a blanco, se obtuvo el suero por centrifugación y se hicieron alicuotas de 1 ml que se congelaron a -70°C hasta su uso.

6. Electroforésis e Inmunolectrotransferencia.

Las muestras fueron analizadas por electroforesis utilizando geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) usando la técnica descrita por Laemmli (1970). El gel concentrador se preparó al 5% y el resolvidor al 10% de poliacrilamida y se colocaron 40 µg de proteína por carril. Se incluyeron estándares de peso molecular preteñidos⁶. La electroforésis se

⁵Multiscan II

⁶Bio-Rad Laboratories, INC. Hercules, CA, USA.

realizó a 75 volts hasta que las muestras alcanzaron el gel separador y después a 120 volts por 2 h. Después de la electroforesis, parte del gel se tiñó con azul de Coomasie y el resto se transfirió a papel de nitrocelulosa utilizando un sistema de cámara semiseca de transferencia⁶. Previamente, los papeles de nitrocelulosa y los geles se incubaron durante 30 min en un amortiguador que contenía 25 mM Tris, 14.4 g de glicina, 200 ml de metanol y 800 ml de agua. Se realizó la transferencia aplicando una corriente de 18 volts por 50 min. Posteriormente, los tiras de nitrocelulosa se bloquearon por incubación durante toda la noche a 4°C con una solución de PBS-Tween al 0.3%, se lavaron 3 veces con PBS-Tween por 5 min cada vez y 2 veces mas con PBS solo. Se cortaron tiras de 0.4 cm que se incubaron toda la noche a 4°C con los antisueros correspondientes a una dilución 1:100 (PBS-Tween 20). Al otro día, se lavaron 3 veces por 5 min cada vez con PBS-Tween 20 y 2 veces mas con PBS solo. Posteriormente, se les agregó el anticuerpo (anti-IgG de conejo) conjugado con peroxidasa en una dilución 1:1500 (PBS-Tween) y se incubaron por 2 h a 37°C. Las tiras de nitrocelulosa se lavaron para eliminar el exceso de conjugado y se revelaron utilizando una solución que contenía: ortocloronaftol² y peróxido de hidrógeno⁹ al 0.3% como sustrato.

Para determinar la presencia de factor extracelular (EF) en los complejos antigénicos obtenidos de las cepas de referencia, se realizaron ensayos de inmunotransferencia utilizando para revelar un anticuerpo específico contra el factor extracelular gentilmente donado por el Dr. Marcelo Gottschalk (Universidad de Montreal, Quebec, Canada). El suero anti-EF se utilizó a una dilución 1:5000.

⁹ Zuum Universal Productora S.A. de C.V.México,D.F.

También se realizaron estudios de inmunoelectrotransferencia para determinar qué antígenos de los extractos antigénicos de las diferentes cepas eran reconocidos por los sueros hiperinmunes inducidos con bacterias completas formalinizadas.

8. Análisis de los resultados

Las imágenes de los diferentes patrones electroforéticos y de transferencia, fueron digitalizadas en un equipo OfficeJet G85⁸⁶. Los pesos moleculares de las bandas obtenidas se calcularon utilizando el programa Labworks⁷, a partir de patrones obtenidos con los marcadores de peso molecular Kaleidoscopio⁶. Este programa nos permitió también correlacionar las bandas reconocidas por los diferentes sueros utilizados en los ensayos de inmunoelectrotransferencia.

⁸ Hewlett Packard, México

⁶ Media cybernetics v.3.0

RESULTADOS

1. Análisis de los antígenos de *Streptococcus suis*

Las preparaciones antigénicas de las cepas de referencia de *S. suis* fueron analizados por electroforesis. Los resultados mostraron al menos 21 bandas con pesos moleculares entre 15 y 205 kDa. El complejo antigénico obtenido del serotipo 2 mostró 21 bandas; el del serotipo 4, 25; el del serotipo 5, 27; y el del serotipo 11, 23 bandas, como se puede observar en la Figura 1.

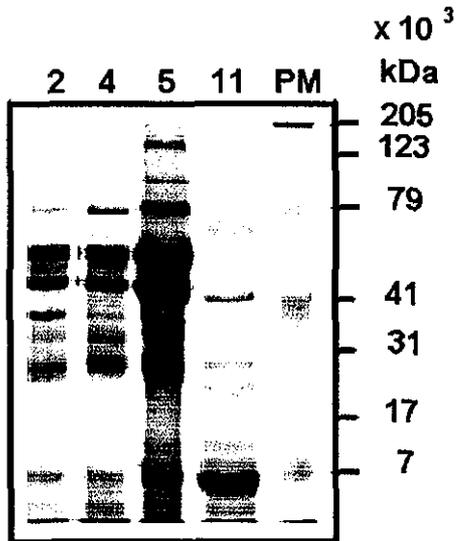


Figura 1. Análisis electrofóretico de las preparaciones antigénicas de las cepas de referencia de *S. suis* (2,4,5 y 11) en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS. A la derecha de la figura se muestran los estándares de peso molecular.

2. Determinación de proteínas reconocidas por sueros homólogos.

Los ensayos de inmunoelectrotransferencia mostraron que el suero anti-serotipo 2 reconoció 14 bandas del complejo antigénico homólogo con pesos moleculares entre 15 y 141 kDa mientras que, el anti-serotipo 4 reconoció 7

entre 24 y 112 kDa; el anti-serotipo 5, 18 entre 15 y 198 kDa; y el anti-serotipo 11, 13 bandas con pesos entre 15 y 120 kDa. Los patrones de reconocimiento que se observaron entre los antígenos de las cepas de referencia con sus sueros homólogos mostraron que se comparten al menos 6 proteínas entre los serotipos con pesos moleculares de 74, 54, 40, 38, 33 y 24 kDa (Cuadro 4). Es importante hacer notar que 4 de estas proteínas (74, 54, 40 y 33 kDa) fueron antígenos inmunodominantes en todas las preparaciones (Figura 2).

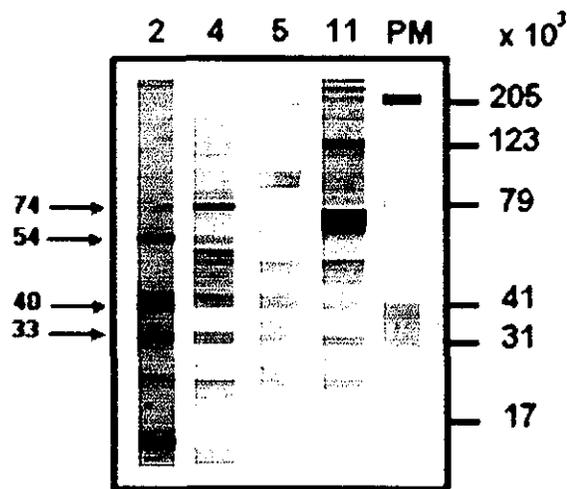


Figura 2. Reconocimiento de antígenos por sueros homólogos. Las preparaciones antigénicas de las cepas de referencia (2,4,5 y 11) se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se confrontaron con sus sueros homólogos. Las flechas indican los cuatro antígenos inmunodominantes y a la derecha se muestran los estándares de peso molecular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4. Reconocimiento de antígenos de los diferentes complejos antigénicos de las cepas de referencia de *S. suis* por antiseros homólogos.

Peso Molecular (kDa)	Serotipos			
	2	4	5	11
198			+	
141	+		+	
120	+		+	+
118			+	
112		+		
107	+		+	
95	+			
85			+	
81	+		+	
76				+
74	+	+	+	+
70	+			+
65			+	+
62				+
54	+	+	+	+
49	+		+	+
40	+	+	+	+
38	+	+	+	+
33	+	+	+	+
30			+	
24	+	+	+	+
20			+	+
15 ⁺	+		+	+

+ indica presencia de banda

3. Determinación de proteínas reconocidas por sueros heterólogos

Por otro lado, al hacer reaccionar los antígenos con los sueros heterólogos se observó que hay proteínas que son reconocidas en todas las preparaciones, mientras que otras son reconocidas en 2 o 3 de ellas y finalmente, algunas proteínas parecen ser específicas de serotipo.

Al probar el suero anti-serotipo 2 con las diferentes preparaciones antigénicas se observó que se reconocen 10 bandas en el complejo antigénico del serotipo 4, con pesos moleculares aproximados entre 15 y 141 kDa; 15 en el del serotipo 5, con pesos entre 15 y 141 kDa; y 13 en el del serotipo 11, con pesos entre 20 y 183 kDa. Ocho proteínas fueron reconocidas en todas las preparaciones antigénicas por el suero anti-serotipo 2 (107, 74, 54, 49, 40, 38, 33 y 24 kDa).(Cuadro 5 y Figura 3).

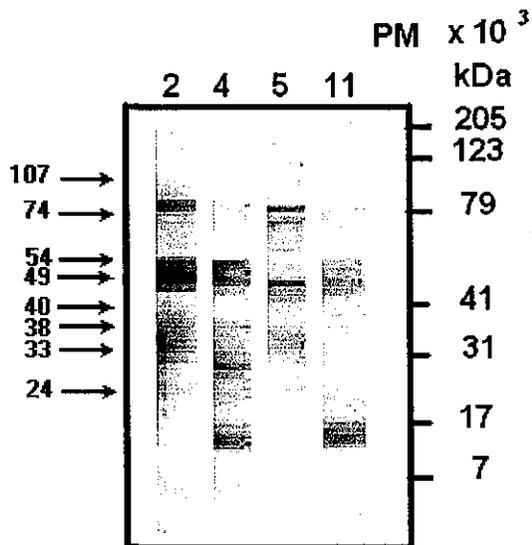


Figura 3. Determinación de antígenos por sueros heterólogos. Las preparaciones antigénicas de las cepas de referencia (2,4,5 y 11) se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se confrontaron con el suero antiserotipo 2. Las flechas muestran las proteínas compartidas por los diferentes preparaciones antigénicas. y a la derecha se muestran los estándares de peso molecular..

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 5. Reconocimiento de antígenos de los diferentes complejos antigénicos de las cepas de referencia de *S. suis* por suero anti-serotipo 2.

Peso Molecular (kDa)	Serotipos			
	2	4	5	11
183				+
160				+
141	+	+	+	
127			+	
120	+			
107	+	+	+	+
95	+			
82	+		+	
74	+	+	+	+
70	+		+	+
62				+
54	+	+	+	+
49	+	+	+	+
46			+	
40	+	+	+	+
38	+	+	+	+
33	+	+	+	+
24	+	+	+	+
20			+	+
15	+	+	+	

+ indica presencia de banda

El suero anti-serotipo 4 al reaccionar con las preparaciones antigénicas reconoció 8 bandas del serotipo 2, con pesos moleculares aproximados entre 15 y 112 kDa; 10 en el serotipo 5, con pesos entre 15 y 160 kDa, y 9 en el serotipo 11, con pesos entre 20 y 74 kDa. De estas proteínas, 6 se reconocieron en todas las preparaciones antigénicas y coincidieron con las reconocidas por los sueros homólogos (Cuadro 6 y Figura 4).

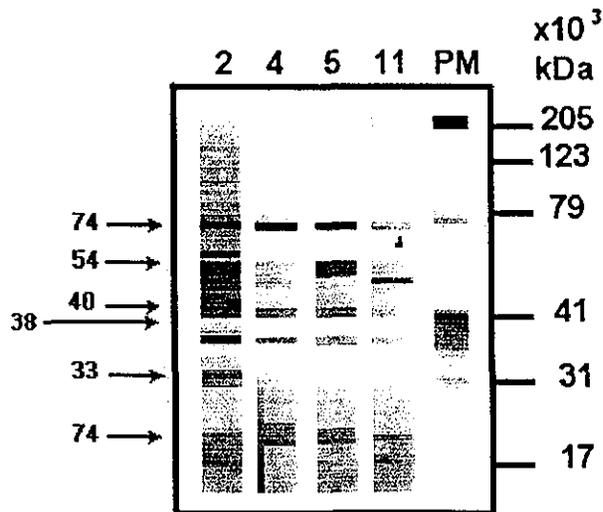


Figura 4. Reconocimiento de antígenos por sueros heterólogos. Las preparaciones antigénicas de las cepas de referencia (2,4,5 y 11) se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se confrontaron con el suero antiserotipo 4. Las flechas muestran las proteínas compartidas por las diferentes preparaciones antigénicas y a la derecha se muestran los estándares de peso molecular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 6. Reconocimiento de antígenos de los diferentes complejos antigénicos de las cepas de referencia de *S.suis* por suero anti-serotipo 4.

Peso Molecular (kDa)	Serotipos			
	4	2	5	11
160			+	
148			+	
118			+	
112	+	+		
74	+	+	+	+
70				+
65				+
54	+	+	+	+
40	+	+	+	+
38	+	+	+	+
33	+	+	+	+
24	+	+	+	+
20				+
15		+	+	

+ indica presencia de banda

Al probar el suero anti-serotipo 5 con los complejos antigénicos se encontró que 16 bandas fueron reconocidas en el serotipo 2, con pesos moleculares aproximados de 15 y 198 kDa; 20 en el serotipo 4, con pesos entre 15 y 198 kDa; y 12 en el serotipo 11, con pesos entre 15 y 74 kDa, 11 de estas proteínas, fueron reconocidas en todas las preparaciones antigénicas (74, 65, 54, 49, 40, 38, 33, 30, 24, 20 y 15 kDa) (Cuadro 7 y Figura 5).

Cuadro 7. Reconocimiento de antígenos de los diferentes complejos antigénicos de las cepas de referencia de *S.suis* por suero anti-serotipo 5.

Peso Molecular (kDa)	Serotipos			
	5	2	4	11
198	+	+	+	
141	+	+	+	
120	+	+	+	
118	+		+	
112		+	+	
107	+	+	+	
102			+	
85	+		+	
81	+		+	
74	+	+	+	+
65	+	+	+	+
54	+	+	+	+
49	+	+	+	+
40	+	+	+	+
38	+	+	+	+
33	+	+	+	+
30	+	+	+	+
28				+
24	+	+	+	+
20	+	+	+	+
15	+	+	+	+

+ indica presencia de banda

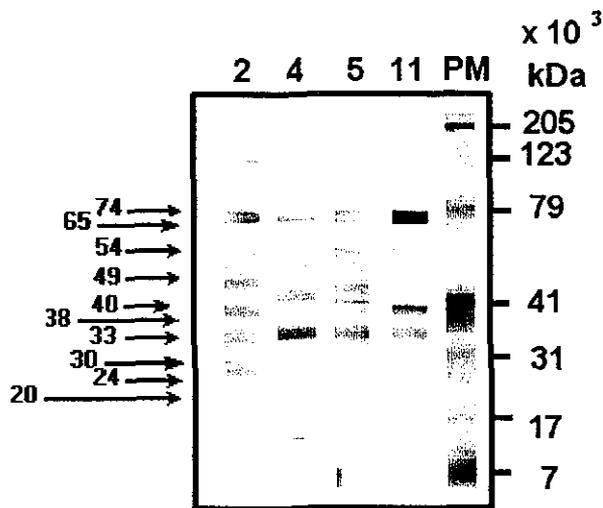


Figura 5. Reconocimiento de antígenos por sueros heterólogos. Las preparaciones antigénicas de las cepas de referencia (2,4,5 y 11) se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se confrontaron con el suero antiserotipo 5. Las flechas muestran las proteínas compartidas por las diferentes preparaciones antigénicas y a la derecha se muestran los estándares de peso molecular.

El suero anti-serotipo 11 reconoció en los antígenos del serotipo 2, 19 bandas con pesos moleculares aproximados entre 24 y 156 kDa; en el serotipo 4, 13 con pesos entre 24 y 198 kDa; y en el serotipo 5, 17 bandas con pesos entre 15 y 156 kDa. Ocho de estas proteínas fueron reconocidas por el suero anti-serotipo 11 en todas las preparaciones antigénicas (76, 74, 54, 49, 40, 38, 33, 24 kDa) (Cuadro 8 y Figura 6).

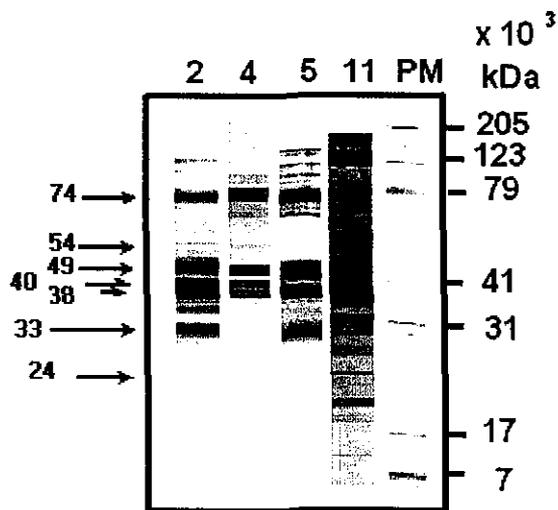


Figura 6. Reconocimiento de antígenos por sueros heterólogos. Las preparaciones antigénicas de las cepas de referencia (2,4,5 y 11) se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se confrontaron con el suero antiserotipo 11. Las flechas muestran las proteínas compartidas por las diferentes preparaciones antigénicas. A la derecha se muestran los estándares de peso molecular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 8. Reconocimiento de antígenos de los diferentes complejos antigénicos de las cepas de referencia de *S. suis* por suero anti-serotipo 11.

Peso Molecular (kDa)	Serotipos			
	11	2	4	5
198			+	
156		+	+	+
136		+		+
120	+			
107		+	+	+
95		+	+	+
88		+		+
81				+
76	+	+	+	+
74	+	+	+	+
70	+	+		+
65	+	+		
62	+	+	+	
60		+		
54	+	+	+	+
49	+	+	+	+
45		+		+
40	+	+	+	+
38	+	+	+	+
33	+	+	+	+
24	+	+	+	+
20		+		
15	+			+

+ indica presencia de banda

Como se puede observar, en las Figuras 4, 5 y 6, las 6 proteínas que se reconocieron por los sueros homólogos también fueron reconocidas en los ensayos de reactividad cruzada (sueros heterólogos).

4. Reactividad de los sueros hiperinmunes contra bacterias completas hacia las preparaciones antigénicas.

Se realizaron ensayos de inmunoelectrotransferencia con el fin de determinar cuantas bandas eran reconocidas en las preparaciones antigénicas de los serotipos 2, 4, 5 y 11 por los sueros hiperinmunes preparados contra bacterias completas en el complejo antigénico del mismo serotipo. Los resultados mostraron que, el suero obtenido de bacterias completas anti-serotipo 2 reconoció 18 bandas con pesos moleculares aproximados entre 15 y 210 kDa; el suero anti-serotipo 4, 15 bandas con pesos aproximados entre 24 y 145 kDa; el suero anti-serotipo 5, 15 bandas entre 20 y 210 kDa; y el suero anti-serotipo 11, 15 bandas con pesos aproximados entre 20 y 136 kDa (Cuadro 9 y Figura 7).

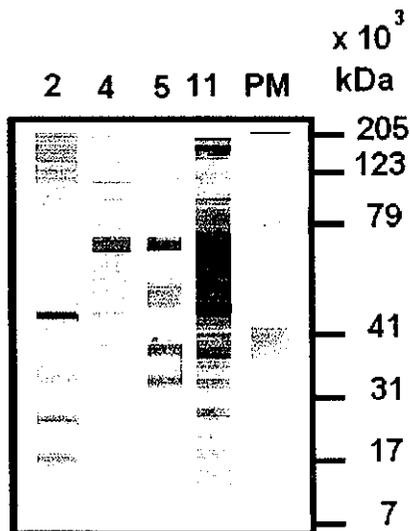


Figura 7. Reconocimiento de antígenos en las preparaciones antigénicas de cepas de referencia (2,4,5 y 11) se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se confrontaron con sueros contra bacterias completas de serotipo homólogos. A la derecha de la figura se muestran los estándares de peso molecular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 9. Reconocimiento de antígenos de los diferentes complejos antigénicos de las cepas de referencia de *S. suis* por antiseros homólogos contra bacterias completas.

Peso Molecular (kDa)	Serotipos			
	2	4	5	11
210	+		+	
145	+	+		
120	+	+	+	+
110	+		+	+
101		+	+	
95	+			
86		+		+
80	+			+
74	+	+	+	+
70	+	+	+	+
68	+	+		
64	+	+		+
60	+	+	+	+
54	+	+	+	
42		+		+
40	+	+	+	+
38	+			+
36	+	+	+	+
33	+	+	+	+
30			+	
24	+	+	+	+
22			+	
20			+	+
15	+			

Los resultados mostraron que 8 proteínas de 120, 74, 70, 60, 40, 36, 33 y 24 kDa fueron reconocidas por todos los sueros; 3 de ellas corresponden a los antígenos inmunodominantes observados en las reacciones con las preparaciones antigénicas y sus sueros homólogos (74, 40 y 33 kDa).

5. Determinación de la presencia de factor extracelular

Con el fin de determinar si en nuestras preparaciones antigénicas teníamos factor extracelular, se determinó su presencia utilizando un anticuerpo anti-EF, encontrándose que en el serotipo 2, el anticuerpo reconoció una proteína de aproximadamente 110 kDa y 3 proteínas de menor peso molecular (98, 45 y 32 kDa). Las proteínas de 45 y 32 kDa también fueron reconocidas en el serotipo 5. En los serotipos 2, 5 y 11 se reconoció además una proteína de 30 kDa que también apareció en los controles incubados solo con el segundo anticuerpo (Figura 8).

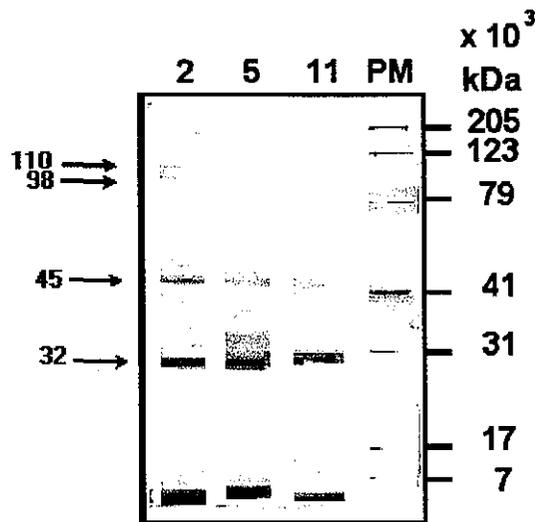


Figura 8. Determinación de EF en las preparaciones antigénicas de cepas de referencia de *S. suis*. Las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se confrontaron con un antisuero anti-factor extracelular. Las flechas muestran la proteínas reconocidas en los diferentes complejos, a la derecha se muestran los estándares de peso molecular.

6. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo de *Streptococcus suis* por sueros hiperinmunes anti-complejos inmunes obtenidos de las cepas de referencia 2, 4, 5 y 11.

Se obtuvieron 25 cepas de campo, 8 de las cuales se identificaron como del serotipo 2; 6 del serotipo 4; 6 del serotipo 5 y 5 del serotipo 11. Se realizaron ensayos de inmunoelectrotransferencia con antígenos obtenidos de las cepas de campo y se revelaron con sueros hiperinmunes homólogos obtenidos en conejos contra las proteínas de las cepas de referencia (serotipos 2, 4, 5 y 11). Los resultados mostraron que hubo reconocimiento de bandas como se puede observar en la Cuadro 10. Los sueros anti-serotipo 2, 4 y 5 reconocieron, con diferente frecuencia, bandas entre 15 y 160 KDa, mientras que el suero anti-serotipo 11 entre 15 y 120 KDa.

Cuadro 10. Porcentaje de reconocimiento de los diferentes antígenos en las preparaciones antigénicas de las cepas de campo por antisueros homólogos.

Peso Molecular KDa	Serotipos (%)			
	2	4	5	11
160	37.5	33.3	33.3	0
145	25	50	33.3	0
120	100	33.3	100	20
110	37.5	66.6	50	40
90	37.5	33.3	83.3	40
80	75	83.3	100	60
74	87.5	83.3	83.3	80
60	62.5	100	83.3	60
54	62.5	100	100	80
40	62.5	66.6	100	100
38	87.5	66.6	66.6	40
36	87.5	66.6	83.3	80
33	75	33.3	83.3	40
30	87.5	66.6	83.3	40
24	62.5	33.3	33.3	20
15	62.5	66.6	33.3	60

Con el serotipo 2, se observaron 7 bandas con mayor frecuencia, la de 120 (100% de las cepas); 74, 38, 36 y 30 (87.5% de las cepas), 80 y 33 (75% de las cepas) (Figura 9).

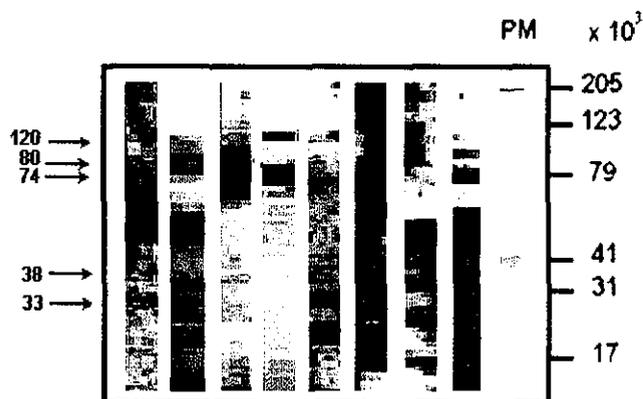


Figura 9. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo de *S. suis* serotipo 2 por antisuero de la cepa de referencia del serotipo 2. Las flechas muestran la proteínas reconocidas con mayor frecuencia y a la derecha se muestran los estándares de peso molecular.

El suero anti-serotipo 4, reconoció 10 bandas con mayor frecuencia, la de 60 y 54 kDa, (100 % de las cepas); las de 80 y 74 kDa (83.3%), y las de 110, 40, 38, 36, 33 y 15 kDa (66.6% las cepas). (Figura 10).

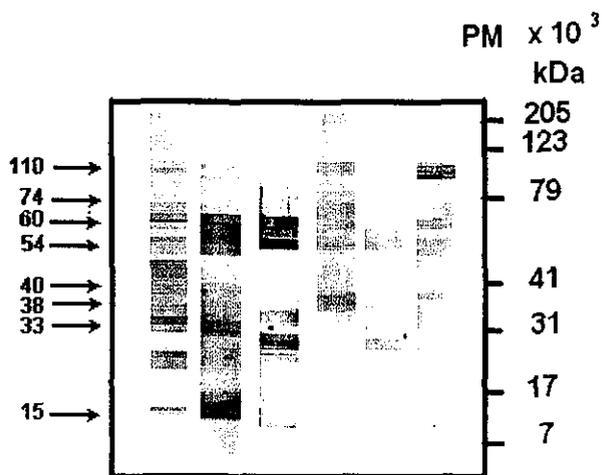


Figura10. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo de *S. suis* serotipo 4 por suero hiperinmune anti-preparaciones antigénicas de la cepa de referencia del serotipo 4. Las flechas muestran la proteínas reconocidas en los diferentes complejos, a la derecha se muestran los estándares de peso molecular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con el suero anti-serotipo 5, 11 bandas fueron reconocidas con mayor frecuencia, 4 de ellas con peso molecular de 120, 80, 54 y 40 kDa (100% de las cepas); las de 90, 74, 60, 36, 33 y 30 kDa (83.3 % de las cepas) y 1 bandas de 38 kDa en el 66.6 %.(Figura 11).

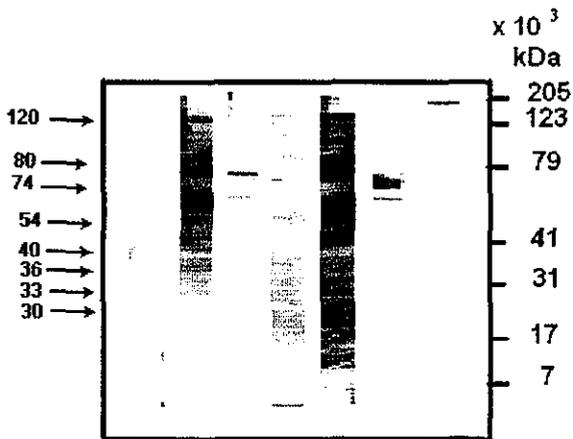


Figura 11. Reconocimiento de Ags. de cepas de campo de *S. suis* serotipo 5 por antisuero de la cepa de referencia del serotipo 5. Las flechas indican proteínas reconocidas con mayor frecuencia, a la derecha se muestran los estándares de peso molecular

En el suero anti-serotipo 11, la banda de 40 kDa fue la única que se encontró en el 100% de las cepas; 3 bandas de 74, 54 y 36 kDa en un 80%; y 3 bandas de 80, 60 y 15 kDa en un 60% (Figura 12).

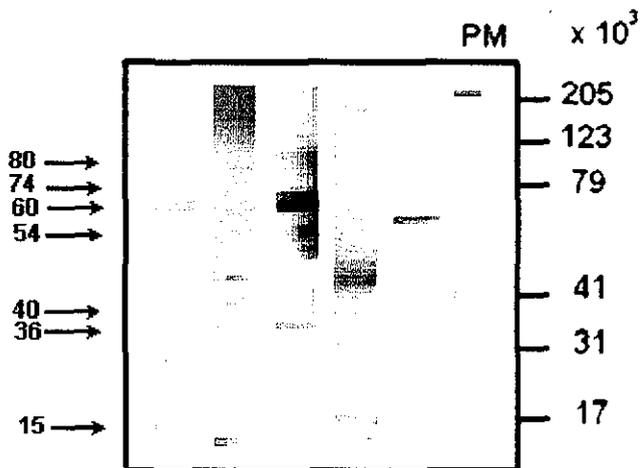


Figura 12. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo de *S. suis* serotipo 11 por antisuero de la cepa de referencia del serotipo 11. Las flechas indican las proteínas reconocidas con mayor frecuencia, a la derecha se indican los estándares de peso molecular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La proteína de 120 kDa fue reconocida por el 100% de las cepas de los serotipos 2 y 5, pero solo por el 33.3 y 20% de los serotipos 4 y 11 respectivamente. Mientras que, la proteína de 80 kDa fue reconocida por el 100, 83.3, 75 y 60% de las cepas de los serotipos 5, 4, 2 y 11 respectivamente. La proteína de 36 kDa fue reconocida él el 87.5, 83.3, 80, y 66.6% de las cepas de los serotipos 2, 5, 11 y 4 respectivamente. Finalmente, la proteína de 38 kDa, que había sido reconocida por todos los tipos en los ensayos realizados con las cepas de referencia, solo se reconoció con el 87.5, 66.6, 66.6, y 40% de las cepas de los serotipos 2, 4, 5 y 11 respectivamente.

De las proteínas compartidas por las cepas de referencia, solo 3 fueron reconocidas con alta frecuencia como se puede observar en la Figura 7. La de 74 kDa fue reconocida por el 87.5, 83.3, 83.3 y 80%; la de 54 kDa por el 62.5, 100, 100, 80%; y la de 40 kDa por el 62.5, 66.6, 100, 100% de las cepas 2, 4, 5 y 11 respectivamente (Cuadro 10).

7. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo de *Streptococcus suis* por sueros hiperinmunes anti-bacteria completa.

Se obtuvieron antígenos de 8 cepas de campo del serotipo 2; 6 del 4; 6 del 5; y 5 del 11. Al utilizar estos antígenos en ensayos de inmunoelectrotransferencia y revelarlos con sueros hiperinmunes homólogos obtenidos en conejos contra bacterias de los serotipos 2, 4, 5 y 11 de cepas se referencia, se observó reconocimiento de proteínas (Cuadro 11).

El suero anti-serotipo 2 reconoció con diferente frecuencia bandas entre 15 y 160 kDa. Las proteínas mas reconocidas fueron: 145, 38 y 24 (en 62.5% de las cepas); 120 60, 54, 40 y 33 (en 75% de las cepas); y 80 (en el 87.5% de las cepas). (Figura 13).

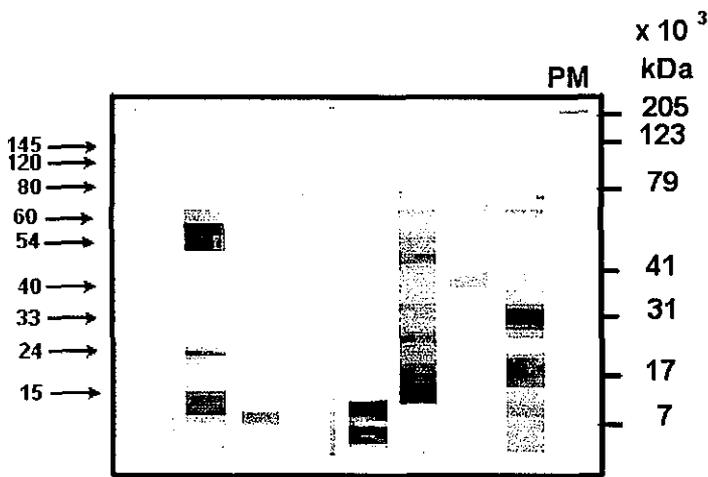


Figura 13.

Reconocimiento de antígenos de cepas de campo de *S. suis* serotipo 2 por antisueros anti-bacteria completa serotipo 2. Las flechas indican las proteínas reconocidas con mayor frecuencia, a la derecha se muestran los estándares de peso molecular.

El suero anti-serotipo 4 reconoció con diferente frecuencia bandas entre 15 y 160 kDa. Las proteínas mas reconocidas fueron: 120 y 110 (en 66.6% de las cepas); 80, 60, 54, 40 y 38 (en 83.3% de las cepas); y 74 (en el 100% de las cepas). (Figura 14).

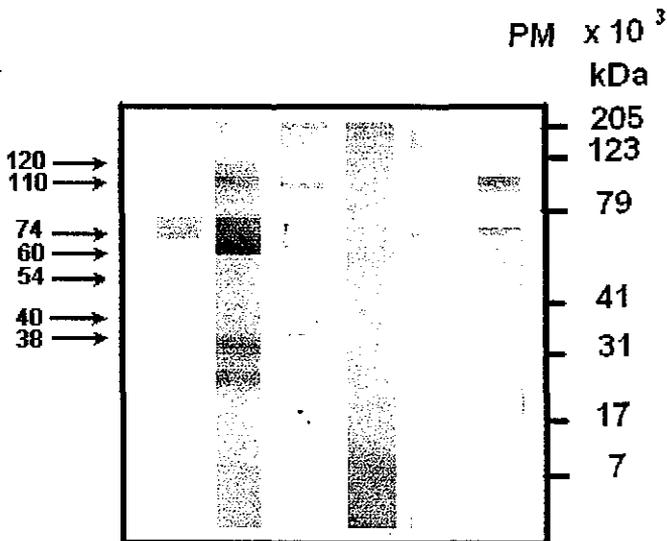


Figura 14. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo de *Streptococcus suis* serotipo 4 por sueros hiperinmunes anti-bacteria completa serotipo 4. Las flechas indican las proteínas reconocidas con mayor frecuencia, a la derecha se muestran los estándares de peso molecular.

El suero anti-serotipo 5 reconoció con diferente frecuencia bandas entre 15 y 160 kDa. Las proteínas mas reconocidas fueron: 38 (en 66.6% de las cepas); 90, 74, 60, 36, 33 y 30 (en 83.3% de las cepas); y 120, 80, 54 y 40 (en el 100% de las cepas). (Figura 15).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

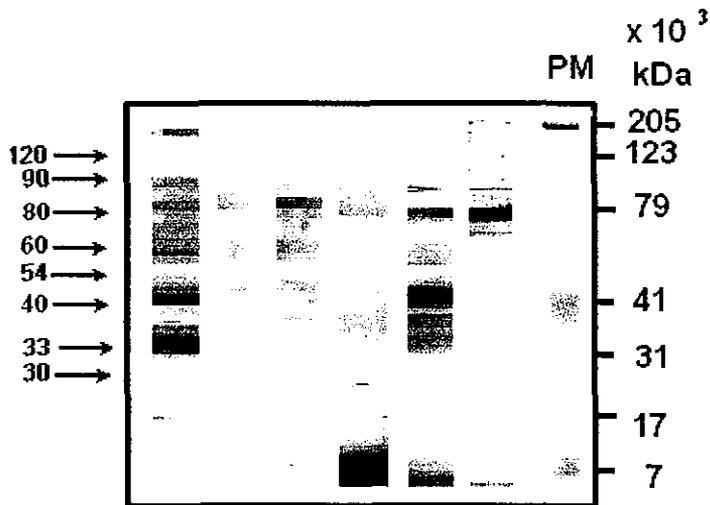


Figura 15. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo de *S. suis* serotipo 5 por antisueros anti-bacteria completa serotipo 5. Las flechas indican las proteínas reconocidas con mayor frecuencia, a la derecha se muestran los estándares de peso molecular.

El suero anti-serotipo 11 reconoció con diferente frecuencia bandas entre 15 y 90 kDa. Las proteínas más reconocidas fueron: 90 y 36 (en 60% de las cepas); y 80, 74, 54, 40, 38, 30, 24 y 15 (en 40% de las cepas). (Figura 16).

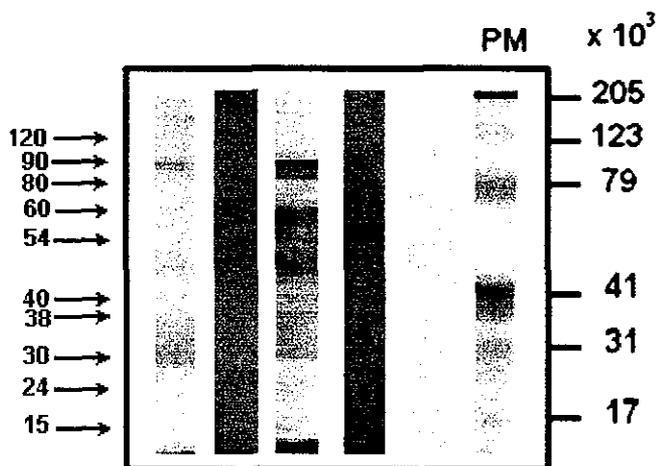


Figura 16. Reconocimiento de antígenos de cepas de campo de *S. suis* serotipo 11 por antisueros anti-bacteria completa serotipo 11. Las flechas indican las proteínas reconocidas con mayor frecuencia, a la derecha se muestran los estándares de peso molecular.

Las proteínas que fueron reconocidas en todas las cepas con mayor frecuencia fueron: 80, 74, 60, 54, 40 y 38. Cuatro de estas proteínas, 74, 54, 40 y 38 kDa, fueron reconocidas en los ensayos con antígenos y sueros de todas las cepas de referencia y 3 de ellas son antígenos inmunodominantes (74, 54 y 40 kDa). (Cuadro 11).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 11. Porcentaje de reconocimiento de antígenos de las diferentes preparaciones antigénicas de las cepas de campo por antisueros anti-bacteria completa.

Peso Molecular KDa	Serotipos (%)			
	2	4	5	11
160	25	50	33.3	0
145	62.5	50	33.3	0
120	75	66.6	100	0
110	50	66.6	50	0
90	37.5	50	83.3	60
80	87.5	83.3	100	40
74	37.5	100	83.3	40
60	75	83.3	83.3	20
54	75	83.3	100	40
40	75	83.3	100	40
38	62.5	83.3	66.6	40
36	50	50	83.3	60
33	75	50	83.3	0
30	50	33.3	83.3	40
24	62.5	33.3	33.3	40
15	50	33.3	33.3	40

DISCUSION

Pocos estudios se han realizado acerca de las proteínas de matriz y de superficie que expresan los diferentes serotipos de *Streptococcus suis*. Estos estudios principalmente se han enfocado en la proteína liberadora de muramidasa (MRP) que tiene un peso molecular de 136 kDa, el factor extracelular (EF) que tiene un peso molecular de 110 kDa (Vecht *et al.* 1991) y en la suilisina que tiene un peso molecular de 54 kDa (Jacobs *et al.* 1994). Proteínas que unen a las inmunoglobulinas (IBPs) por su fracción cristalizable (Fc) y que se ha determinado que tienen pesos moleculares entre 52 y 60 kDa han sido descritas recientemente en el serotipo 2 (Serhir *et al.* 1995; Boudjeroua *et al.* 1998).

En este trabajo se reportan una serie de proteínas que se encuentran en 4 serotipos de *S. suis* y que fueron reconocidas en las preparaciones antigénicas de cada serotipo por sueros homólogos y heterólogos. En los ensayos realizados con sueros homólogos se encontró que todos los sueros reconocieron 6 proteínas con pesos moleculares aparentes de 74, 54, 40, 38, 33 y 24 kDa; este patrón de reconocimiento se mantuvo cuando las preparaciones antigénicas se probaron con los sueros heterólogos. Los resultados sugieren que estas proteínas son conservadas en los diferentes serotipos y muestran que algunas de ellas son antígenos inmunodominantes (74, 54, 40 y 33 kDa). De estas proteínas, la de 54 kDa podría corresponder a la suilisina que se ha descrito que se encuentra en los serotipos 2, 4 y 5 pero no en el serotipo 11 (Feder *et al.* 1994). También, podría corresponder a las IBPs (pesos moleculares entre 52 y 60 kDa) que han sido descritas en el serotipo 2, pero no para los otros serotipos, por lo que habría que realizar ensayos para determinar si esta proteína une inespecíficamente

inmunoglobulinas de cerdo o humano como ha sido descrito (Serhir *et al.* 1995).

Por otro lado, se ha reportado una proteína de choque térmico que tiene un PM de 60 kDa en los serotipos 1, 1/2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 10 y que da reacción cruzada con otras proteínas de esta familia en bacterias Gram + y con Gram - (Benkirane *et al.* 1997). Los autores refieren que es el primer antígeno común encontrado en *S. suis*. Esta proteína de choque térmico de 60 kDa podría corresponder a las proteínas encontradas en los serotipos 2, 4 y 11 de las cepas de referencia y en los serotipos 2, 4, 5, y 11 de las cepas de campo.

Se han purificado y clonado 3 proteínas asociadas a pared celular de *S. suis* una de ellas, corresponde a la MRP y las otras 2, una de 80 y otra de 32 kDa a 5'nucleotidasas (Osaki *et al.* 2000). Nuestros resultados mostraron que los antisueros contra los diferentes serotipos reconocen proteínas de 33 kDa en cepas de campo y referencia y de 80 kDa en las cepas de campo. Estas proteínas podrían ser las reportadas por Osaki *et al.* (2000). Finalmente, en ensayos de inmunotransferencia se ha identificado una proteína de 45 kDa del serotipo 2 que corresponde a la glutamato deshidrogenasa, que es una proteína que se encuentra expuesta en la superficie de las células intactas (Okwumabua *et al.* 2001). Nuestros resultados muestran una proteína de ese peso molecular que fue reconocida por el suero anti-serotipo 11 en las preparaciones antigénicas de los serotipos 2 y 5, pero que sin embargo no fue reconocida por los sueros homólogos.

Con el fin de determinar si las preparaciones antigénicas contenían factor extracelular, los antígenos en las bandas de nitrocelulosa se incubaron con un suero anti-EF. Los resultados mostraron reactividad con proteínas de menor peso molecular al reportado para el EF en todas las preparaciones antigénicas de las cepas de referencia probadas (serotipos 2, 4, 5 y 11). En la preparación

antigénica del serotipo 2 se reconoció también una proteína de 110 kDa, lo cual indica que esta preparación contiene factor extracelular, lo cual está de acuerdo a lo reportado. (Vecht *et al.* 1991; Gottschalk *et al.* 1998). El reconocimiento de proteínas de menor peso molecular puede deberse a reacciones cruzadas con otras proteínas de todas las cepas o bien al reconocimiento de productos de degradación del EF. En el segundo caso, esto sugeriría que el EF está presente en todas las cepas y que estas proteínas son digeridas por enzimas presentes en el extracto antigénico. Sin embargo, es importante mencionar que no se ha reportado la presencia del EF en los serotipos 4, 5 y 11, por lo que sería importante investigar si este antígeno se encuentra presente en todos los serotipos. En lo que se refiere a la presencia de la proteína de 30 kDa que es reconocida por el anti-EF en los serotipos 2, 5 y 11 y en los controles incubados solo con el segundo anticuerpo, sugiere que el segundo anticuerpo se está uniendo inespecíficamente a este antígeno.

Es importante mencionar que en nuestras preparaciones antigénicas pueden no estar incluidas proteínas que solo son expresadas en el huésped y no se expresan en medios de cultivo y que pudieran ser importantes en la virulencia.

También se obtuvieron sueros con las bacterias completas y se probaron con los complejos antigénicos homólogos con la intención de determinar que proteínas eran reconocidas por los anticuerpos inducidos con las bacterias completas. Los resultados mostraron que 8 proteínas son reconocidas por todos los sueros, 3 de ellas fueron las reconocidas por los sueros homólogos inducidos con las preparaciones antigénicas (74, 40 y 33 kDa). Un hallazgo interesante es que todos los sueros anti-bacterias completas reconocen una proteína de 120 kDa que también fue reconocida por los sueros anti-complejos antigénicos de los serotipos 2, 5 y 11.

El hallazgo de proteínas que se comparten por las diferentes cepas pudiera ser útil diseñar ensayos de diagnóstico, como un ELISA de captura, utilizando estas proteínas con el fin de identificar antígenos en líquidos cefalorraquídeos o sueros de lechones en fases tempranas de la infección. Este conocimiento también podría usarse para determinar si algunas de las proteínas compartidas tienen capacidad protectora para el control de infecciones de cerdos por cualquier serotipo de *S. suis*, ya que las vacunas que se han probado hasta ahora (Holt *et al.*, 1988; 1990; Kebede *et al.* 1990; Jacobs *et al.* 1996; Busque *et al.*, 1997; Wisselink *et al.* 2001) no han mostrado ser eficientes para el desafío con cepas heterólogas.

A pesar de que la cápsula es un importante factor de virulencia para *S. suis* serotipo 2 (Charland *et al.* 1998; Smith *et al.* 1999), su papel en la protección no es claro. Los intentos para estimular una respuesta inmune con polisacáridos capsulares no han sido exitosos (Elliott *et al.* 1980). Se ha sugerido que respuestas mixtas de anticuerpos dirigidos contra polisacáridos y otros componentes celulares contribuyen a la protección (Holt *et al.* 1990; Del Campo Sepúlveda *et al.* 1996). Es más, Jacobs *et al.* (1996) and Wisselink *et al.* (2001) han mostrado que vacunas de subunidades basadas en proteínas purificadas protegen eficientemente a cerdos contra el desafío con *S. suis* serotipo 2. Por otro lado, se ha encontrado que las capsulas de polisacárido bacterianas pueden interferir en el reconocimiento inmune de las proteínas, en el caso de *S. suis* se ha reportado que mutantes no capsuladas inducen protección parcial contra el desafío del microorganismo virulento ya que presentan algunos signos clínicos de enfermedad mientras que, las cepas capsuladas formalinizadas protegen completamente al 100% de los animales (Wisselink *et al.* 2002). Sin embargo, estos autores sugieren que probablemente incrementando la dosis del antígeno vacunal se podrían mejorar la protección. Por otro lado, la MRP, que es una proteína asociada a membrana, y el EF son los principales antígenos reconocidos por sueros de

cerdos convalescientes o infectados (Vecht et al. 1991). Mas aun, en ensayos de vacunación utilizando estas proteínas se ha podido inducir protección (Wisselink et al. 2001), de tal forma que en este caso parece no interferir la cápsula en la inmunidad inducida con estas proteínas.

Consideramos que la contribución de este trabajo, que fue el haber encontrado proteínas que se comparten entre 4 diferentes serotipos, es importante, aunque sería muy conveniente estudiar los antígenos de otros serotipos con el fin de determinar sí el patrón de reconcomiento que estamos reportando se sigue conservando, principalmente el de las proteínas inmunodominantes. En este trabajo no se reporta la localización de estas proteínas en la célula bacteriana por lo que, también sería de interés determinarlo con el fin de saber si son proteínas de la membrana celular o de matriz. Las aplicaciones de este conocimiento pueden ser diversas como lo hemos mencionado y dependen básicamente de la creatividad de los investigadores.

CONCLUSIONES

1. Se encontró que hay 6 proteínas que son reconocidas en todas las cepas de referencia por los sueros hiperinmunes homólogos obtenidos en conejos por la inmunización con los complejos antigénicos de *S. suis*.
2. Cuatro de estas proteínas (74, 54, 40 y 33 kDa) fueron antígenos inmunodominantes en todas las preparaciones.
3. Las 6 proteínas reconocidas por los sueros homólogos se reconocieron también en los ensayos de reactividad cruzada.
4. Los complejos antigénicos de *S. suis* del serotipo 2 contienen factor extracelular.
5. Los sueros anti-complejos antigénicos de las cepas de referencia reconocieron, con diferente frecuencia, proteínas en las cepas de campo.
6. Las 3 proteínas que fueron reconocidas con mayor frecuencia en las cepas de campo tenían pesos moleculares de 74, 54 y 40 kDa.
7. De estas mismas proteínas, 2 fueron reconocidas por los sueros obtenidos en conejos por la inmunización con bacterias completas de las cepas de referencia.

Bibliografia:

Aarestrup, F.M., Jorsal, S.E., Jensen, N. E. 1998. Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. Vet. Microbiol. 60: 59-66.

Alexander, T.J.L., Thornton, K., Boon, G., Lysons, R.J., and Gush, A.F. 1980. Medicated early weaning to obtain in pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. Vet. Rec 106:114-119

Alexander, T.J.L. 1995. *Streptococcus suis*: pathogenesis and host response. p. 49-53. In Proceedings of the Allen D. Leman Swine Conference. University of Minnesota, Minneapolis.

Amass, S.F., Clark, L.R. and Wu, C.C. 1995. Source and timing of *Streptococcus suis* infection in neonatal pigs: Implications for early weaning procedures. Swine Health Prod. 3:189-193.

Amass, S.F., Wu, C.C. and Clark, L.R., 1996. Evaluation of antibiotics for the elimination of the tonsils carrier state of *Streptococcus suis* in pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 8:64-67

Amass, S.F.P. San Miguel and Clark, L.K. 1997. Demonstration of vertical transmission of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 35:1595-1596

Arends, J.P. and Zanen, H.C. 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. Rev Infect Dis. 10:131-137.

Beaudoin, M., Higgins, R., Harel, J. and Gottschalk, M. 1992. Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates. FEMS Microbiol. Letters. 99:111-116

Benkirane, R., Gottschalk, M. and Debreuil, J.D. 1997. Identification of a *Streptococcus suis* 60 Kda heat-shock protein using Western blotting. FEMS Microbiol. Letters. 153:379-385

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Boudjeroua, K., Benkirane, R., Paradis, S.E., Gottschalk, M. Jacques, M., Harel, J. and Debreuil, J.D. 1998. A *Streptococcus suis* serotype 2 immunoglobulin-binding protein: overall characteristics and uses as a tool for the purification of chicken IGY by affinity chromatography. In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society, Birmingham, England, 3. pp.159 .

Busque, P., Higgins, R., Caya, F. and Quessy, S. 1997. Immunization of Pigs against *Streptococcus suis* serotype 2. Infection using a live avirulent strain. Can. J. Vet. Res. 61:275-279.

Chanter, N., Jones, P.W. and Alexander T.J.L. 1993. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis* a speculative review. Vet. Microbiol. 36:39-55.

Charland, N.M., Kobisch, R., Martineau-Dotzè, B., Jacques, M., and Gottschalk, M. 1996. Role of sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. FEMS Immun. Med. Microbiol 14:195-203.

Charland, N.M., Harel, J., Kobisch, M., Lacasse, S., and Gottschalk, M. 1998 *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. Microbiol. 144:325-332.

Charland, N.M., Nizet, V., Rubens, C., Kim, K., Lacouture, S. and Gottschalk, M. 2000. *Streptococcus suis* interactions with human brain microvascular endothelial cells. Infect. Immun. 68:637-643.

Clifton-Hadley, F.A. 1983. *Streptococcus suis* type 2 infections. Br. Vet. J. 139:1-5.

Clifton-Hadley, F A., Alexanders, T. J., Upton, I. and Duffus, H.P. 1984. Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. Vet. Rec. 114:513-518.

Clifton-Hadley, F.A., Alexander, T.J.L., Enright, M.R. and Lindsay, H.J. 1986. Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2 cross reactions and variations in virulence. In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society, Barcelona. p 359.

Christensen, P., Kahlmeter, G., Johnson, S. and Kronvall, G. 1973 New method for the serological grouping of streptococci with specific antibodies adsorbed to protein A containing staphylococci. Infect. Immun. 7:881-885

De Moor, C.E. 1963. Septicemic infections in pigs caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designed R. S. and T. Antonie Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol. 29:272-280.

Dee, S.A. Carlson, A.R., Winkelman, N.L. and Corey, M. 1993. Effect of management practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine. J.Am.Vet.Med.Assoc. 203:295-299

Del Campo Sepúlveda, E.M. Altman, E., Kobisch, M., D'Allaire, S. and Gottschalk, M. 1996 Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. Vet Microbiol. 52:113-125

Del Castillo, J., Martineau, G.P., Messier, S. and Higgins, R. 1995 The use of pharmacokinetics to implement penicillin prophylaxis for streptococcal diseases. In Proc Allen. D. Lemay Swine Conf. p 93-96 Minnesota.

Devriese, L. A., Sustronk, B., Maenhout, T. and Haesebrouck, F. 1990. *Streptococcus suis* in a horse. Vet. Rec. 127:68

Devriese, L., Ceysens, K., Hommez, J., Kilpper-Balz, R. and Scheifer, H., 1991. Characteristics of different *Streptococcus suis* serovars and description of a simplified identification system. Vet. Microbiol. 26:141-150.

Devriese, L.A., Desmidt, M., Roels, S., Hoorens, J. and Haesebrouck, F. 1993. *Streptococcus suis* infections in a fallow deer. Vet. Rec. 132:283

Devriese, L.A., Haesebrouck, F., De Herdt, P., Dom, R., Ducatelle, R., Desmidt, M., Messier, S. and Higgins, R. 1994. *Streptococcus suis* infection in birds. Avian Path. 23:721-724.

Elliot, S.D. 1966 Type and group polysaccharides of group D streptococci. J Exp Med. 111:621-625.

Elliott, S.D., Clifton-Hadley, F.A. and Tai, J.Y. 1980. Streptococcal infection in young pigs V An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against the streptococcal meningitis in pigs. J.Hyg. Camb. 85:275-285

Feder, L. M., Chengappa, M., Fenwick, B., Rider, M. and Staas, J. 1994. Partial characterization of *Streptococcus suis* hemolysin. J.Clin.Microbiol. 32:1256-1260.

- Field , H.L.**, Bontain, D. and Done, J.T. 1954. Studies on piglet mortality Streptococcal meningitis and arthritis. Vet. Rec. 66:453-455
- Foster, N.**, Staats, J.J., Chengappa, M.M., 1994. Isolation, characterization and protection studies in mice of a streptomycin-dependent mutant of *Streptococcus suis* type ½. Vet. Res. Commun. 18:155-163.
- Galina, L.**, Collins, J.E., and Pijoan, C. 1992. Porcine *Streptococcus suis* in Minnesota, J. Vet. Diagnostic Invest. 4:195-196.
- Galina, L.**, Pijoan, C., Sirjar, M., Christianson, W.T., Rossow, K. and Collins J.E. 1994. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. Vet. Rec. 134:60-64.
- Galina, L.**, Vecht, U., Wisselink, H .J. and Pijoan, C. 1996. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in USA, based on the presence of muramidase released protein and extracellular factor. Can. J. Vet. Res. 60:72-74.
- Galván, P.E**, Martínez, S.J.M, Jiménez, G.E, Negrete, C.J.E, Mercadillo, S.A, Haro, T.M.E, Pijoan, A.C, y Ramírez, H.G. 1997. El uso de la prueba de coagulación para la tipificación de *Streptococcus suis*. Memorias del XXXII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Especialistas en Cerdos A.C, p. 108.
- Gogolewski, R.P.**, Cook, R.W., O'Connell, C.J.: 1990. *Streptococcus suis* serotypes associated with disease in weaned pigs. Aust. Vet. J. 67:202-204.
- Gottschalk, M.**, Higgins R., Jacques M., Mittal, R. and Henrichsen, J. 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol. 27:2633-2636.
- Gottschalk, M.**, Higgins R. 1990. Hemagglutination properties of *Streptococcus suis* .J. Clin. Microbiol 28:2156-2158
- Gottschalk, M.**, Higgins, R., Jacques M., Beaudoin M. and Henrichsen J. 1991. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol 29:2590-2594.
- Gottschalk, M.**, Higgins, R., Jacques, M. and Dubreuil, D. 1992. Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. Vet. Microbiol. 30:59-71

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

Gottschalk, M.G., Lacouture S., and Dubreuil, J.D. 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. Microbiol.141:189-195.

Gottschalk, M.G. 1996 Virulence factors of *Streptococcus suis*. In Proc Allen. D. Lemay Swine Conf. p 21-25. Minnesota.

Gottschalk, M.G. Lebrun, A., Wisselink, H., Dubreuil, D., Smith, H. and Vecht, U. 1998. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. Can. J. Vet. Res. 62:75-79.

Gottschalk, M.G. 1999. Dilemma of the Virulence of *Streptococcus suis* strains. J. Clin. Microbiol., Dec: 4202-4203.

Gottschalk, M.G.and Segura, M. 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. Vet. Microbiol.76:259-276

Hampson, D.J., Trott,IL., ClarkeC.G., Mwaniki,G. and Robertson. 1993 Population of structure of Australian isolates of *Streptococcus suis* . J. Clin Microbiol. 31:2895-2900

Han, D.U., Choi, C., Ham, H.G.,Jung, J.H., Cho, W.S., Kim, J., Higgins, R. and Chae, C. 2001 Prevalence, capsular type and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* aislated from slaughter pigs in Korea. Can.J of Vet. Res. 65:151-155

Higgins, R.,Gottschalk M., Jacques, M. and Boudreau, M. 1990. *Streptococcus suis* infection in swine: A sixteen month study. Can J Vet Res. 54:170-173.

Higgins, R., and Gottschalk M. 1990 An update in *Streptococcus suis* identification. J Vet Diagn. Invest. 2:249-252.

Higgins, R., Gottschalk M. Boudreau, M. and Rawluk, S.A: 1992. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types to Quebec and wester Canada. Can. Vet. J. 33:27-30

Higgins, R. Gottschalk M., Boudreau, M., Lebrun, M., and Henrichsen, J. 1995 Description of six new capsular types (29 through 34) of *Streptococcus suis*. J. Vet. Diagn. Invest. 7:405-406

Higgins, R. and Gottschalk M. 1999 Streptococcal diseases. p.563-570. In A. D. Leman, B.E., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S. and Taylor, D.J. (ed). Diseases of swine. 8th. Ed. Iowa State University Press Ames.

Higgins, R. and Gottschalk, M. 2000. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1999. Can.Vet.J. 41:414

Hommeez, J., Wullepit,J., Cassimon, P. Castryck,F., Ceysens,K. and Devriese, L.A.1988 *Streptococcus suis* and other streptococcal species as a cause of extramammary infection in ruminants. Vet.Rec.123:626-627

Holt , M.E., Enright,M.R. and Alexander,T.J.L. 1988. Immunization of pigs with live cultivates of *Streptococcus suis* type 2. Res. Vet. Sci.45:345-352

Holt M.E., Enright,M.R. and Alexander, T.I.L. 1990. Protective effects of sera raised against different fractions of *Streptococcus suis* type 2 J. Comp.Pathol.103:85-94

Iglesias, G., Trujano, M. And Xu, J. 1992. Inoculation of pigs with *Streptococcus suis* type 2 alone or in combination with pseudorabies virus. Am J. Vet. Res. 53:364-367

Jacobs, A. 1994 Identification of a thiol-activated hemolysin (suilyisin) of *Streptococcus suis*. Infect. Immun. 62:1742-1748

Jacobs, A.A.C., Van Den Berg, A.J.G., Baars, J.C., Nielsen, I. and Johannsen, L.W. 1995. Production of suilyisin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*, by field isolates from diseased pigs. Vet. Rec. 16:295-296.

Jacobs, A.A.C., Van Den Berg, A.J.G. and Storm, P. 1996. Production of experimentally infected pigs by suilyisin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. Vet. Rec. 139:225-228.

Jansen, E.J. and Van Dorsen, C.A.1951 Meningoencephalitis by markers doors streptococcen. Tijdschr Diergeneeskd 76:315-322

Kataoka, Y., Yamashita, T. Sunaga, S. Imada, Y., Ishikawa, H., Kishima, M. and Nakazawa, M. 1996 An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody against *Streptococcus suis* type 2 in infected pigs. J. Vet Med. Sci. 58:369-372

- Kataoka, Y., Akiba, M., Yoshida, T., and Sawada, T.** 2000. Molecular epidemiology of *Streptococcus suis* type 2 using pulsed-field gel electrophoresis. Proceedings of the 16th IPVS Congress, Melbourne, Australia, 17-20 Sept.
- Kebede, M., Chengapa, M. and Stuart, J.**1990. Isolation and characterization of temperature sensitive mutants of *Streptococcus suis* efficacy trial of the vaccine in mice. Vet. Microbiol 22:249-257
- Keymer, L.F., Heath, S.E., and Wood, J.G.P.**1983. *Streptococcus suis* type II infection in a raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*). Family Canidae. Vet. Rec 113:624.
- Kilpper-Balz, R. and Shieffer, K.H.** 1987. *Streptococcus suis* sp. Int.J.Syst. Bacteriol. 37:160-162
- Kobisch, M.** 1995. Infection experimentale de porcelets par *Streptococcus suis* serovar 2. Journées Rech Porcine en France 27:97-102
- Laemmli, U.K.** 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 680-685.
- Lalonde, M., Segura, M., Lacouture, S. and Gottschalk, M.** 2000. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. Microbiol. 146:1913-1921.
- Luque, C., Tarradas, R., Astorga, A., and Perea, A.**1998. The presence of muramidase released protein and extracellular factor protein in various serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased and healthy pigs in Spain. Res. Vet. Sci.66:69-72
- Martel, A., Baele, M., Devriese, L.A., Goossens, H., Wisselink, H.J., Decostere, A. and Haesebrouck, F.** 2001. Prevalence and mechanism of resistance against macrolides and lincosamides in *Streptococcus suis* isolates. Vet. Microbiol. 83:287-297.
- Martínez, S.J.M.** 1997. Susceptibilidad de *Streptococcus suis* a quince antimicrobianos de uso común. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- MacKellar, Q.A., Baxter, P., Taylor, D. And Bogan, J.A.** 1987. Penicillin therapy of spontaneous streptococcal meningitis in pigs. Vet. Rec. 121:347-350

MacLennan, M., Foster, G., Dick, K., Smith, W.J. and Nielsen, B. 1996. *Streptococcus suis* serotypes 7, 8 and 14 from diseased pigs in Scotland. Vet. Rec. 139:423-424

Michaud, S., Duperval, R., and Higgins, R. 1996. *Streptococcus suis* meningitis first case reported in Quebec, Can.J. Infect..Dis 7:329-331

Mogollon, J.D., Pijoan, C., Murtaugh, M.P., Collins, J.E. and Cleary, P.P. 1990. Characterization of prototype and clinacally defined strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. J Clin Microbiol. 28:2462-2466.

Mwaniki, C., Robertson, I.D. and Hampson, D.J. 1994. The prevalence of *Streptococcus suis* in Western Australian piggeries. Austr. Vet. J. 71:385-386.

Norton, P.M., Rolph, C., Ward, P.N., Bentley, R.W. and Leigh, J.A. 1999. Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* enhanced by the presence of suilysin. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 26:25-35 .

Okwumabua, O., Persaud, J.S. and Reddy, P.G. 2000. Cloning and characterization of the gene encoding the glutamate dehydrogenase of *Streptococcus suis* serotype 2. Clin. Diag.Lab. Immun. 8:251-257

Osaki, M., Takamatsu, D., and Sekizaki, T. 2000. Cloning and characterization of the gene encoding O-acetylserine lyase from *Streptococcus suis*. Curr. Mcrobiol. 40:67-71

Perch, B., Pedersen, K.B, and Henrichsen, J. 1983. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: Six new serotypes of *Streptococcus suis*. J.Clin.Microbiol.17:993-996

Pijoan, C. 1996. Bacterial respiratory pathogens. What is their impact? In Proc. 4th Amm Swine Dis Conf. Swine Pract, pp 45-47

Prieto, C., Peña, J. Suarez, P., Imaz, M., Castro, J.M. 1993. Isolation and distribution of *Streptococcus suis* capsular types from diseased pigs in Spain. J.Vet. Med 40:544-548

Prieto, C., Garcia, F.J., Suarez, P., Imaz, M.,Castro, J.M. 1994. Biochemical traits and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughtered pigs. J. Vet. Med. B 41, 608-617.

Quessy., S. 1994. Facteurs de virulence et inmunitè reliès aux infections dues a *Streptococcus suis* type 2 Ph.D Thesis 1994. University of Montreal.

Quessy, S., Busque, P., Higgins, R., Jacques, M., and Debreuil, J.D. 1997. Description of an albumin binding activity for *Streptococcus suis* serotype 2. FEMS Microbiol Lett. 147:245-250

Reams, R.Y., Harrington, D.D., Glickman, L.L., Thacher, H.L. and Bowersock, T.L. 1996. Multiple serotype and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. J. Vet Diagn. Invest. 8:119-121

Rosendal, S., Breton, J., Henrichsen, J. 1986. Isolation of *S.suis* using a selective medio. Can J Vet. Res 50: 537-539.

Robertson, I.D., Blackmore, D.K., Hampson, D.J. and Fu, Z.F. 1991 A longitudinal study of natural study of natural infection of piglets with *Streptococcus suis* type 1 and 2 Epidemiol. Infect. 107:119-126

Salasia, S.J., Lammler, C., Devriese, L.A. 1994. Serotypes and putative virulence markers of *Streptococcus suis*. Isolates from dogs and cats. Res.Vet.Sci. 57:259-261

Segura, M.A., Clèroux, P. And Gottschalk, M. 1998. *Streptococcus suis* and group B Streptococcus differ in their interactions with murine macrophages. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 21:189-195.

Serhir, B. Higgins, R., Foiry, B. and Jacques, M. 1993 Detection of immunoglobulin-G-binding proteins in *S. suis* J.G.Microbiol. 139:2953-2958.

Serhir, B., Dubreuil, D., Higgins, R. and Jacques, M. 1995. Purification and characterization of a 52-Kilodalton immunoglobulin G-binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. J. Bacteriol. 177, 3830-3836.

Sihvonen, L., Kurl, D.N., Henrichsen, J.: 1988. *Streptococcus suis* isolated from pigs in Finland. Acta Vet. Scand. 29:9-13.

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E and Holt, J.G. *Bergey's Manual of Septicemic Bacteriology*. Vol.2 Edit. Board and Baltimore 1999.

St. Geme, J.W., III and Cutter, D. 1996. Influence of pili, fibrils and capsule on *in vitro* adherence by *Haemophilus influenzae* type b. Mol. Microbiol. 21:21-31.

Staats, J.J. 1995. Expression of cloned *Streptococcus suis* type 2 hemolysin gene in *Bacillus subtilis* and protection by the gene product in mice against lethal *S. suis* type 2 challenge. *Proceedings of the Conference of Research Workers in Animal Diseases* 76:14.

Smith, H.E., Damman, M., Van der Velde, J., Wagenaar, F., Wisselink, H.J., Stockhofe-Zurwieden, N., Smits, M.A., 1999. Identification and characterization 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

Tarradas , M.C., Arenas, A., Maldonado, A., Vicente, S., Miranda, A. and Perea, A. 1994.. Susceptibility of *Streptococcus suis* to various antimicrobial agents. J.Vet.Med. 41:685-688

Tato, P., Flisser A., Gavilanes M, and Molinari JL. 1979. Immunogenic complexes obtained from *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* Ty2 by the bacterial acetone powder method. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 130:47-60.

Timoney, J.F. 1992. Streptococcus. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. (Gyles CL. and Thoen CO, eds.), Iowa State University Press/AMES, Second Edition, pp. 3-20.

Touil, F., Higgins R. and Nadeau M. 1988. Isolation of *Streptococcus suis* from diseased pigs in Canada. Vet Microbiol. 17:171-177.

Tikanen, K., Haataja, S. and Finne, J. 1996. The galactosyl (alpha 1-4) galactosa-binding adhesin of *Streptococcus suis*: Occurrence in strains of different hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies. Infect Immun. 64:3659-3665

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedures and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350.

Trottier, S., Higgins, R., Brochu, G. and Gottschalk, M. 1991. A case of human endocarditis due to *Streptococcus suis* in North America. Rev. Infect. Dis. 13:1251-1252

Turgeon, P.L., Higgins, R., Gottschalk, M. and Beaudoin, M. 1994 Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated. Br. Vet. J. 150:263-269

Vecht, U., Arends, M.D., Van Der Molen, E.J. and Van Leengoed, L.A.M.G. 1989. Difference in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after experimentally induced infection of new germ-free pigs. Am. J. Vet. Res. 50:1037-1043.

Vecht, U., Wisselink HJ, Jellema ML, and Smith HE. 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. Infect. Immun. 59:3156-3162.

Vecht, U., Wisselink J.E., Duk V. and Smith E.H. 1992. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. Infect. Immun. 60: 550-556.

Vecht, U., Wisselink J.E., Anakotta, J. and Smith E.H. 1993 Discrimination between virulent and non-virulent *Streptococcus suis* type 2 strains by enzyme-linked immunosorbent assay. Vet. Microbiol. 34:71:82

Williams, A.E. 1990. Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. Microb. Pathog. 8: 189-196.

Windsor, R.S. and Elliot, S.D. 1975. Streptococcal infection in young pigs. An outbreak of Streptococcal meningitis in weaned pigs. J Hyg Camb75:69-78

Wisselink, J.H., Smith, H.E., Stockhofe-Zurwieden, N., Peperkamp, K., and 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. 74:237-248.

Wisselink, J.H., Vecht, U., Smith, H.E. and Stockhofe-Zurwieden, N. 2001. Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. Vet. Rec. 148:473-477

Wisselink, J.H., Stockhofe-Zurwieden, N., Hilgers, L.A.T. and Smith, H.E. 2002. Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. Vet. Microbiol. 84:155-168
