



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EMPLEO DE LA TECNICA DE ELISA PARA LA
DETERMINACION DE ANTICUERPOS (IgG) CONTRA
Streptococcus suis SEROTIPO 2, EN CERDOS DE
DIFERENTES EDADES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

RAYMUNDO OROPEZA JIMENEZ

ASESORES: MC. ROSARIO ESPERANZA GALVAN PEREZ
DRA. PATRICIA TATO ZALDIVAR



MEXICO, D. F.

2005

m. 341882



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Oropeza Jiménez
Raymundo

FECHA: 7 - Marzo - 05

FIRMA: Oropeza

DEDICATORIA

A mis padres por todo su cariño, paciencia, comprensión y esfuerzo para brindarme una educación.

A mis hermanos por su tolerancia ante mi mal humor.

A mis asesores por toda su ayuda y colaboración para llevar a cabo este trabajo.

A mis profesores ya que lo que he aprendido de ellos ha sido muy importante para llegar a esta etapa.

A todas las personas que me han brindado su amistad, apoyo, optimismo y sinceridad.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores la MC. Rosario Esperanza Galván Pérez y la Dra. Patricia Tato Zaldívar, por toda su paciencia, aportaciones y tiempo invertido para la realización de este trabajo.

Por la asesoría técnica a Dra. Isabel Cortés Cuellar, MC. José Antonio Ramírez Barcenas, Dr. Alberto Gómez Priego y Dr. José Luis Molinari.

A todas las personas del Departamento de Producción Animal: Cerdos por el apoyo recibido durante la realización de este trabajo.

A todas las personas que directa o indirectamente influyeron para que esta meta se concretara.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
Hábitat natural.....	2
Historia.....	2
Epidemiología.....	3
Factores de virulencia.....	4
Patogenia.....	5
Signos Clínicos.....	6
Inmunidad.....	6
Patología.....	6
Infección en humanos.....	7
Prevención.....	8
Tratamiento.....	8
Control.....	9
Diagnóstico.....	10
Diagnóstico diferencial.....	10
II. JUSTIFICACIÓN	11
III. HIPÓTESIS	12
IV. OBJETIVOS	12
V. MATERIAL Y MÉTODOS	13
Cepa bacteriana.....	13
Cultivo de <i>S. suis</i> serotipo 2.....	13
Obtención de antígenos.....	13
Electroforesis (Page-SDS).....	14
Obtención de sueros de cerdos.....	15
Prueba de ELISA indirecta.....	15
Determinación del límite de referencia.....	16
Análisis estadístico del comportamiento de la prueba de ELISA indirecta..	17
Antígenos de <i>S. suis</i> serotipo 2 reconocidos por sueros de cerdos.....	19

	<u>Página</u>
VI. RESULTADOS	20
Concentración de proteína del extracto antigénico de <i>S. suis</i> serotipo 2..	20
Electroforesis (Page-SDS).....	20
ELISA indirecta.....	21
Análisis estadístico del comportamiento de la prueba de ELISA indirecta.	31
Antígenos de <i>S. suis</i> serotipo 2 reconocidos por sueros de cerdos.....	32
VII. DISCUSIÓN	34
VIII. CONCLUSIONES	38
IX. ANEXOS	39
X. LITERATURA CITADA	43

LISTA DE CUADROS

	<u>Página</u>
Cuadro 1. Sueros de cerdos por semanas de edad, número de parto, sementales y animales con aislamiento bacteriológico.....	15
Cuadro 2. Tabla de contingencia 2 x 2.....	17
Cuadro 3. Escala de concordancia para el índice kappa.....	18
Cuadro 4. Análisis de reactividad de sueros de cerdos de 0 a 24 semanas examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de <i>S. suis</i> serotipo 2.....	24
Cuadro 5. Análisis de reactividad de sueros de hembras de 0 a 8 partos examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de <i>S. suis</i> serotipo 2.....	27
Cuadro 6. Análisis de reactividad de sueros de cerdos clasificados por Estado de la Republica Mexicana, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de <i>S. suis</i> serotipo 2.....	30
Cuadro 7. Resultados de la evaluación diagnóstica del ELISA para detectar anticuerpos IgG contra <i>S. suis</i> serotipo 2, en cerdos de diferentes edades.....	31

LISTA DE FIGURAS

	<u>Página</u>
Figura 1. Análisis electroforético del extracto antigénico de <i>S. suis</i> 2.....	20
Figura 2. Análisis de reactividad expresada en porcentaje de sueros de cerdos de 0 a 10 semanas, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de <i>S. suis</i> serotipo 2.....	22
Figura 3. Densidades ópticas de los sueros de cerdos de 0 a 10 semanas de edad, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de <i>S. suis</i> serotipo 2.....	22
Figura 4. Análisis de reactividad expresada en porcentaje de sueros de cerdos de 10 a 24 semanas, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de <i>S. suis</i> serotipo 2.....	23
Figura 5. Densidades ópticas de los sueros de cerdos de 10 a 24 semanas de edad, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de <i>S. suis</i> serotipo 2.....	23
Figura 6. Curva de comportamiento de IgG ante <i>S. suis</i> serotipo 2 en sueros de cerdos de 0 a 24 semanas.....	24
Figura 7. Análisis de reactividad expresada en porcentaje de sueros de hembras de 0 a 8 partos, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de <i>S. suis</i> serotipo 2.....	26
Figura 8. Análisis de reactividad expresada en porcentaje de sueros de sementales, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de <i>S. suis</i> serotipo 2.....	26
Figura 9. Densidades ópticas de los sueros de hembras por número de parto y sementales, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de <i>S. suis</i> serotipo 2.....	27
Figura 10. Curva de comportamiento de IgG ante <i>S. suis</i> serotipo 2 en sueros de hembras de 0 a 8 partos y sementales.....	28
Figura 11. Análisis de reactividad expresada en porcentaje de sueros de cerdos de 0 a 24 semanas y cerdos reproductores, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de <i>S. suis</i> serotipo 2.....	29
Figura 12. Análisis por Inmunolectrotransferencia que muestra el reconocimiento de los antígenos de <i>S. suis</i> serotipo 2 por sueros de cerdos de diferentes edades.....	32

RESUMEN

RAYMUNDO OROPEZA JIMÉNEZ. Empleo de la técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos (IgG) contra *Streptococcus suis* serotipo 2, en cerdos de diferentes edades (bajo la asesoría de MC. Rosario Esperanza Galván Pérez y la Dra. Patricia Tato Zaldívar).

Se utilizó una cepa de referencia de *Streptococcus suis* serotipo 2 procedente de la Universidad de Minnesota, se cultivó y se obtuvo un extracto antigénico (antígenos protéicos) mediante el método de los polvos acéticos. Utilizando este extracto antigénico se estandarizó la técnica de ELISA indirecta para la determinación de anticuerpos IgG en sueros de cerdos de diferentes edades. Se determinó la especificidad de los anticuerpos IgG de los sueros de cerdos a diferentes edades hacia los antígenos protéicos de *S. suis* serotipo 2, por medio de inmunoelotransferencia.

Para la prueba de ELISA indirecta, sueros de cerdos de 0 a 10 semanas de edad mostraron una bajos títulos de IgG ante *S. suis*, se obtuvieron resultados negativos en un 73.5%, en contraste con los de 10 a 24 semanas con resultados positivos del 79.7%; observando un pico de IgG en la primera semana de edad, seguido de una disminución de entre la segunda y cuarta semana (destete). Los sueros de hembras reproductoras de 0 a 8 partos mostraron resultados positivos en un 73.5%, mientras que los sueros de sementales mostraron una positividad del 50%. Del total de sueros de cerdos analizados se observó que el 59.9% resultaron positivos.

Para la inmunoelotransferencia con sueros de cerdos a diferentes edades se obtuvieron bandas que pueden corresponder a 9 proteínas con pesos moleculares de 110 a 24.2 kDa. Se observaron bandas de 110 y 52 kDa que por su similitud pueden corresponder a los complejos antigénicos factor extracelular (EF) y suilisina respectivamente. Una banda con peso molecular similar al EF fue reconocida por el 95.24% de los sueros de cerdos analizados, otra banda con peso molecular similar a la suilisina fue reconocida por el 14.29 % de los sueros, mientras que aparentemente la proteína liberadora de muramidasa (MRP) no fue reconocida por los sueros de cerdos.

I. INTRODUCCIÓN

Streptococcus suis (*S. suis*), es una bacteria patógena de importancia mundial, es un coco Gram positivo (anaerobio facultativo, móvil y capsulado), que pertenece al grupo D de Lancefield (1). Es causante de encefalitis, septicemia, endocarditis, poliserositis, artritis, neumonía, muerte súbita en cerdos recién destetados y abortos (2). Las infecciones por *S. suis* son consideradas como uno de los principales problemas en la industria porcina, ya que ocasionan importantes pérdidas económicas por mortalidad, costos de tratamiento y profilaxis con antibióticos e inmunizaciones en los animales (3).

Hábitat natural.

El hábitat natural y sitio primario de colonización de *S. suis* es el tracto respiratorio superior, particularmente tonsilas y cavidad nasal (4, 5), que son sitios donde se puede aislar, así como nódulos linfáticos, pulmones, tracto genital y digestivo de cerdos (6); también se ha recuperado de leche y prepucio de animales sin manifestaciones clínicas (7). Se han aislado múltiples serotipos de *S. suis*, tanto en animales enfermos, como en portadores sanos (8, 9) y cada vez se aísla con mayor frecuencia de otros mamíferos y aves (10, 11, 12).

Historia.

Reportes iniciales de infecciones septicémicas en cerdos por *S. suis* fueron publicados en 1951 por Jansen y Van Dorssen en los Países Bajos, por Field en 1954 en Inglaterra. Posteriormente, *S. suis* fue caracterizado bioquímica y serológicamente por de Moor y Lancefield entre 1956 a 1963 designando los grupos R, S, RS y T (13).

En Inglaterra, Elliot (1966) sugirió que el grupo S de de Moor era similar a los dos miembros pertenecientes al grupo D de Lancefield, Elliot propuso el nombre de *S. suis* serotipo capsular 1 (grupo S).

En 1975, Windsor y Elliot aislaron otro *Streptococcus* porcino que corresponde al grupo R de de Moor y lo nombraron *S. suis* serotipo 2.

El serotipo 1 está asociado a meningitis en lechones, a diferencia del *S. suis* serotipo 2 que ataca a cualquier edad. Windsor y Elliot observaron una reacción cruzada de un antisuero contra los serotipos 1 y 2, designándolo serotipo capsular 1/2 (originalmente el grupo RS).

La designación de *S. suis* como nueva especie bacteriana se hizo oficial en 1987 por Kilper-Balz y Schleifer (14). Para 1989, Gottschalk toma como referencia el grupo T, para designar al *S. suis* serotipo capsular 15 (de aislamientos de hisopos tonsilares, vaginales y prepuciales, previamente reportados por Clifton-Hadley en 1984) (14). Entre 1983 y 1995, un total de 32 serotipos capsulares fueron descritos, conociéndose actualmente un total de 35 (15, 16).

La mayoría de los serotipos originan enfermedad en cerdos, salvo el serotipo capsular 14, aislado en humanos.

Se han aislado los serotipos capsulares 17, 18, 19 y 21 de cerdos clínicamente sanos, los serotipos capsulares 20 y 31 de terneros enfermos y el serotipo 33 de corderos (16). Bently y col. (1991) observaron que estos serotipos son genéticamente distintos y no tienen relación específica con otras especies de *Streptococcus* examinadas (14).

La diversidad genética entre miembros de *S. suis* es importante y esto debe tenerse en cuenta para el diagnóstico, vigilancia y control de la enfermedad (14).

Desde entonces, *S. suis* ha sido reportado en todos los países donde la industria porcina es importante y por más de una década, infecciones asociadas a este microorganismo han sido observadas en sistemas porcícolos tradicionales e intensivos modernos (14).

Epidemiología.

Su distribución es mundial, se han identificado 35 serotipos, basados en los diferentes polisacáridos capsulares (1/2 y 1 al 34) (15, 16). La mayoría de los *S. suis* aislados de cerdos enfermos corresponden a los serotipos 1 al 8 (17, 18, 19). De estos, el serotipo 2 es el de mayor frecuencia en casi todos los países (20), pero también se ha observado que los serotipos 1/2, 1, 7, 9 y 14 pueden causar enfermedad (21).

La frecuencia de los serotipos puede variar geográficamente, por ejemplo, el serotipo 9, es común en Bélgica, Holanda y Australia (22, 23), los serotipos 1, 2, 7 y

14, son comunes en el Reino Unido, mientras que en Dinamarca los serotipos 2 y 7 tienen una frecuencia alta (24). En Escandinavia, el serotipo capsular 7 predominó por varios años, pero en los noventa, el serotipo capsular 2 superó al serotipo 7 (21). En Japón, el serotipo capsular 2 también es el de mayor prevalencia (28%), seguido del serotipo capsular 7 (11%) (25).

Algunas cepas pertenecientes a serotipos capsulares poco comunes han sido asociadas en casos severos de infección. *S. suis* serotipo capsular 9 se ha asociado en brotes de septicemia, meningitis y neumonía en cerdos destetados (22). En 1996, MacLennan y col. reportaron el primer aislamiento del serotipo 14 en el Reino Unido. Ellos indicaron que aunque el serotipo capsular 2 predominaba (62%), el 25% de los aislamientos pertenecía al serotipo 14, que afecta cerdos de 2-4 semanas de edad, causando artritis, meningitis y septicemia (14). Ese mismo año, también en el Reino Unido, Heath y col. reportaron el aislamiento del serotipo 14 en 22 granjas con hallazgos clínico patológicos similares a los asociados al serotipo 2 (14). En México, los serotipos más frecuentemente aislados son 2, 4, 5 y 11 (26).

Factores de virulencia.

- a) *Polisacáridos capsulares* (CPS). La cápsula es un factor importante para la virulencia, está compuesta por: glucosa, galactosa, N-acetilglucosamida, ramnosa y ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) (27). Los serotipos 1, 1/2 y 2 de *S. suis*, poseen en su cápsula ácido siálico, que actúa como un inhibidor de la activación del complemento en ausencia de anticuerpos, confiriéndose además una carga neta negativa que repele a las células fagocíticas (28). Existe gran especificidad de unión del ácido siálico con el poli-N-acetilactosamina glicano de los eritrocitos, el tropismo de *S. suis* al sistema nervioso se asocia con su contenido en ácido siálico (29).
- b) *Proteína Liberadora de Muraminidasa* (MRP) y *Factor Extracelular* (EF). Son proteínas asociadas a la pared celular, la MRP con un peso molecular de 136 kD y el EF de 110 kD, estas proteínas favorecen la invasión de los tejidos del hospedador (30, 31).

- c) *Hemolisina*. Denominada suilisina es otra proteína extracelular de *S. suis* con peso molecular entre 54 y 62 kD (32, 33), pertenece al grupo de hemolisinas activadas por grupos thiol, siendo una toxina citolítica (34).
- d) *Adhesinas*. Galactosil-1-4-galactosa, proteína de unión de IgG y proteína de unión de fibronectina, son otros factores de virulencia importantes que median la unión de bacterias patógenas a carbohidratos específicos presentes en la superficie de las células del hospedador; las adhesinas son de naturaleza proteica por la sensibilidad que muestran a la tripsina y a las proteasas (35, 36).

Patogenia.

La enfermedad se manifiesta generalmente en lechones destetados (de 3 hasta 12 semanas de edad), pero en ocasiones se presenta en lechones entre 10 y 14 días de edad (generalmente no sobreviven a la enfermedad) (1). Los cerdos al destete pueden ser portadores de cepas patógenas, pudiendo presentar enfermedad al disminuir la inmunidad materna (4 a 6 semanas de edad) que predispone a una infección sistémica en estos animales (37, 38). A pesar de esto, puede haber muertes en animales de hasta 6 meses de edad (1).

Las vías de entrada de *S. suis* en los cerdos pueden ser la vía respiratoria, contacto directo, durante el parto o por ingestión de secreciones vaginales de la cerda portadora de *S. suis* (39).

S. suis se adhiere a los epitelios mediante sus adhesinas, evitando su eliminación, se multiplica en las criptas tonsilares e ingresa al torrente circulatorio. Es atacado por neutrófilos y macrófagos, pero al estar protegido de la fagocitosis por su cápsula polisacárida (40), se multiplica y distribuye para producir septicemia, pudiendo provocar la muerte de los animales en pocas horas o bien, se aloja principalmente en cerebro, corazón, pulmón y articulaciones, produciendo lesiones locales (1).

Al atravesar la barrera hematoencefálica produce daño nervioso, ya que en el fluido cerebroespinal estimula la producción de citocinas, que inducen la infiltración de células inflamatorias de la sangre al sistema nervioso central, bloqueando el flujo del líquido cerebroespinal, aumentando la presión intracraneal y produciendo los signos típicos de meningitis (3).

Signos clínicos.

Los signos observados en un brote epidémico incluyen fiebre, pelaje hirsuto, evidencias de septicemia, seguido de muerte súbita. Los animales que sobreviven presentan neumonía, signos nerviosos como: incoordinación, temblores, parálisis, opistótonos y espasmos tetánicos. Cerdos entre 10 y 14 días de edad pueden presentar artritis y ceguera, algunos animales pueden sobrevivir a pesar de la meningitis. Sin embargo, se han reportado casos de lechones afectados que mueren dentro de las 24 horas de vida (14).

La infección por *S. suis* en cerdas se ha relacionado con trastornos de la reproducción como: repeticiones a celo tanto regulares como irregulares, presentándose descargas vaginales de carácter mucopurulento, muy evidentes tras la micción. También son frecuentes los abortos, normalmente a final de gestación, con la expulsión de camadas completas y sin momificar, presentando los fetos abundante líquido serohemorrágico en cavidades (28).

Inmunidad.

La respuesta del sistema inmune ante una infección por *S. suis* está representada por las IgG, dirigidas contra la suilisina, la MRP y el EF principalmente (41, 42). Generalmente la concentración de IgG aumenta entre el 1º y 3º día en los cerdos lactantes (43); existe evidencia de que la placenta epiteliochorial de la cerda transporta selectivamente inmunoglobulinas, pudiendo estar presentes varios isotipos en suero fetal, pero su impacto en la inmunidad pasiva protectora es mínimo (44, 45). Las IgG, IgA e IgM pueden identificarse en suero fetal a los 38 días en útero, siendo la concentración de IgG 10 veces más alta a lo largo de la gestación. La transcripción de anticuerpos fetales se desarrolla por lo menos durante el último tercio de gestación, especialmente al formarse el timo (44).

Patología.

La piel y la canal suelen estar enrojecidas, las características patológicas más comunes son nódulos linfáticos tumefactos y congestionados, la presencia de fibrina, edema e infiltración celular en meninges y plexos coroideos, depleción linfocitaria en la pulpa esplénica blanca, necrosis de algunas células hepáticas,

sobre todo a nivel centrolobulillar y el acúmulo de neutrófilos polimorfonucleares en la mayoría de los órganos parenquimatosos. Se ha informado de necrosis cortical con cambios espongiiformes en cerebelo y tallo cerebral. Puede haber neuritis en los nervios craneales (1, 28).

En algunos brotes, son comunes las lesiones pulmonares, variando de una pleuresía localizada grave, hasta una neumonía con congestión y edema del tabique interlobular (46).

Durante la fase septicémica son escasas las lesiones, aunque suele haber meningitis purulenta cuando existe daño cerebral; en los casos de artritis hay inflamación alrededor de las articulaciones junto con líquido sinovial cremoso y mucoso, fundamentalmente las carpianas y tarsianas; en la endocarditis la presencia de los microorganismos constituye una característica notable de lesiones histológicas sobre las válvulas (1).

Se han observado casos de pulmonía fibrinohemorrágica, miocarditis necrótica, necrosis séptica, meningoencefalitis subaguda y meningoencefalomielitis. Se ha observado que ciertas cepas de *S. suis* pueden causar lesiones vasculares como dilatación de vasos sanguíneos y linfáticos (14).

Infección en humanos.

En humanos puede causar meningitis, septicemia, endocarditis y choque séptico; generalmente se asocia con trabajadores de rastro, veterinarios y personas que han tenido contacto con cerdos o sus productos (47), la vía de entrada más frecuente puede ser por abrasiones superficiales o heridas de la piel. (48).

Las personas a pesar de superar la infección por *S. suis* sufren a menudo consecuencias como artritis o sordera (49).

En España se reportaron 2 casos de carniceros con síndrome febril y signos de meningitis, hasta un estado comatoso, pero ambos respondieron bien al tratamiento, quedando con una secuela de hipoacucia ligera (28). En Francia se reportó un caso de una persona que falleció por choque séptico debido a *S. suis* serotipo 2, 15 años después de la infección inicial (50). En México debido a que la enfermedad es subdiagnosticada o es confundida con otros agentes (como *Enterococcus*, *Streptococcus bovis*, *Pneumococcus* o *Listeria*, los cuales

ocasionan signos nerviosos similares a *S. suis*), existen muy pocos informes de signología nerviosa por *S. suis* en humanos; Talavera reporta 4 aislamientos de amígdalas de trabajadores de rastro en el Valle de Toluca, que no presentaban manifestaciones clínicas (51).

Prevención.

El control de infecciones por *S. suis* y enfermedades asociadas es un reto bajo las condiciones de alojamiento en la mayoría de las granjas, ya que los factores que desencadenan la enfermedad son: fluctuaciones de temperatura excesivas, hacinamiento, humedad relativa alta y el agrupamiento de cerdos con edades mayores a dos semanas en la misma área, que trae como resultado estrés de destete y peleas entre cerdos (52). Puede realizarse un control mediante la corrección de estos factores, así como una desinfección adecuada, ya que *S. suis* es destruido por la mayoría de los desinfectantes como cloro, cloruro de benzalconio, fenoles, cresoles y cuaternarios de amonio. Se ha propuesto la administración de antibióticos como medida preventiva y el uso de bacterinas, que aplicadas en las cerdas pueden proporcionar inmunidad pasiva a los lechones, pero dichas prácticas incrementan substancialmente los costos de producción (14).

Tratamiento.

Si bien el fármaco más utilizado en el tratamiento parenteral de la enfermedad es la penicilina, también puede utilizarse enrofloxacin, ceftiofur, amoxicilina, ampicilina y lincomicina.

El tratamiento debe repetirse más de una vez y debe estar complementado por una terapia de sostén. Los cerdos afectados deben mantenerse aislados del resto de la población. Los animales paralizados se deshidratan en forma rápida y deben rehidratarse con solución salina por vía rectal. La recuperación suele ser más rápida en un ambiente fresco y seco. Los demás cerdos de los corrales afectados pueden recibir tratamiento preventivo inyectable individual o a través de medicamentos en el agua de bebida o en la ración (1).

Algunos autores han informado un alto grado de resistencia de cepas *S. suis* a algunos agentes antibacterianos como tetraciclina, clindamicina, eritromicina,

kanamicina, neomicina y estreptomycin. La susceptibilidad a las sulfas-trimetoprim puede ser variable.

En el caso de endocarditis en humanos puede utilizarse una combinación de penicilina y gentamicina (1, 14).

Control.

El control puede llevarse a cabo de varias maneras diferentes (1):

1. Medicación: Esta puede ser estratégica empleando penicilinas de acción prolongada, las cuales se administran al nacer y diez días después del destete, al momento del ingreso a los corrales de engorda o siete días antes de la fecha estimada del máximo de la enfermedad.

La medicación en la ración puede hacerse con penicilina, posiblemente la más eficaz y la que resiste mejor el procesamiento de la ración sea fenoximetil penicilina a razón de 75-100 g/ton, aunque la penicilina procaínica en dosis de 200-300 g/ton suele ser igualmente eficaz. En todos los casos es necesario emplear raciones que hayan sido medicadas en forma reciente.

2. Inmunización: Todas las bacterinas hasta ahora empleadas son de bacterias muertas y con adyuvantes, en algunos casos pueden proporcionar protección completa, pero en la mayoría no.

3. Medidas generales: Es necesario evitar los sistemas de producción continua, implementar medidas de "todo dentro-todo fuera", mezclar los lotes de animales lo menos posible y alojar a los cerdos en corrales limpios, bien ventilados y con valores bajos de humedad.

4. Detección de portadores: Este es un procedimiento importante, aunque los muestreos nasales, tonsilares o las pruebas serológicas no detectan a todos los animales portadores en el momento que surge un brote, es recomendable realizar muestreos periódicamente.

5. Sacrificio y repoblación: Es recomendable el sacrificio de los animales y la desinfección de las instalaciones para eliminar infecciones residuales en heces y polvo, seguidos de una repoblación con cerdos libres de la infección, que pueden obtenerse por histerectomía, destete precoz medicado o comprándolos de algún hato que esté libre de la enfermedad.

Diagnóstico.

El patógeno puede aislarse de tonsilas y fosas nasales por ser los sitios primarios de colonización; el diagnóstico en casos clínicos se realiza a partir de encéfalo, pulmón, líquido cefalorraquídeo y líquido articular (1). La identificación de las cepas de *S. suis* se basa en el aislamiento, morfología de colonias, pruebas bioquímicas y serológicas. La clasificación serológica se basa en las diferencias antigénicas de polisacáridos capsulares (53), la serotipificación de *S. suis* según Gottschalk, se realiza con tres técnicas diferentes: reacción capsular, precipitación capilar y coaglutinación (15). Sin embargo, la prueba de coaglutinación es la más empleada por los distintos laboratorios, siendo recomendada por su rapidez y facilidad de realización. Esta prueba se basa en la unión de los estreptococos con anticuerpos específicos para cada serotipo (obtenidos por hiperinmunización de conejos), acoplados a *Staphylococcus* a través de la proteína A, observándose grumos o conglomerados de bacterias (54). Existen técnicas más específicas como el aislamiento inmunomagnético (4), aglutinación de ácido siálico mediante lectinas (55), hemaglutinación de adhesinas mediante anticuerpos policlonales (36), ribotipificación (56), mapeo genómico (57), hibridación de DNA (58), inmunofluorescencia (14), electroforesis (19, 59) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (60, 61), entre otras; pero algunas son muy sofisticadas y requieren equipo costoso.

Diagnóstico diferencial.

Quizá la enfermedad de Glässer (*Haemophilus parasuis*) sea el diferencial más importante ya que los signos clínicos son semejantes (tos, disnea, temblores, incoordinación, además de inflamación en articulaciones y aborto).

Otras enfermedades bacterianas importantes que también deben tomarse en cuenta son: rinitis atrófica, micoplasmosis neumónica, erisipela, pleuroneumonía, salmonelosis septicémica, enfermedad del edema y leptospirosis. También deben descartarse enfermedades de origen viral como: enfermedad de Aujeszky, rabia, enfermedad del ojo azul, el síndrome respiratorio-reproductivo porcino y el envenenamiento por sal, originado por un mal manejo (14, 28).

Justificación.

S. suis ha recibido en los últimos años una mayor atención, por su gran difusión en países de cría porcina industrial, su implicación en diversos procesos clínicos, pérdidas económicas y su repercusión sanitaria al ser considerada una infección zoonótica. (3, 28).

En la actualidad en México no existen pruebas que permitan conocer el estado inmunológico de los cerdos hacia *S. suis*, las pruebas diagnósticas que son empleadas se limitan solo al aislamiento, identificación y tipificación del agente.

Los estudios realizados a nivel de biología molecular para descubrir las variantes entre serotipos (p. ej. diferencias a nivel genético y expresión de factores de virulencia), pueden ser difícilmente empleados como una prueba diagnóstica por su complejidad o excesivo costo.

Hasta la fecha se han empleado las pruebas serológicas (ELISA, hemaglutinación, inhibición de la hemaglutinación, Western blot) para evaluar las propiedades inmunogénicas de los antígenos de *S. suis* (esto con el fin de la elaboración de vacunas) o para revelar como y que elementos intervienen en la respuesta inmune.

Dada la necesidad de un método de diagnóstico rápido, específico y a un costo accesible para los porcicultores, es importante desarrollar una prueba de diagnóstico útil, para conocer el estado inmunológico de los animales ante *S. suis*, por lo que el propósito de este estudio fue estandarizar la técnica de ELISA indirecta para la determinación de anticuerpos contra *S. suis* serotipo 2 en cerdos de diferentes edades.

HIPÓTESIS.

Si se conoce la respuesta inmune humoral contra los antígenos protéicos de *S. suis* serotipo 2 en sueros de cerdos de diferentes edades, será posible establecer los límites de referencia para el diagnóstico de infecciones por *S. suis* serotipo 2, a través una prueba serológica.

OBJETIVOS.

Objetivo General:

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la respuesta inmune humoral contra los antígenos protéicos de *S. suis* serotipo 2 en sueros de cerdos de diferentes edades, para establecer límites de referencia útiles en el diagnóstico serológico de infecciones producidas por *S. suis*.

Objetivos específicos:

- Obtener antígenos protéicos de *S. suis* serotipo 2.
- Estandarizar la técnica de ELISA indirecta usando los antígenos protéicos de *S. suis* serotipo 2.
- Establecer los límites de referencia para la respuesta inmune humoral de cerdos de diferentes edades.
- Determinar la especificidad de los anticuerpos (IgG) hacia los antígenos protéicos de *S. suis* serotipo 2, por medio de inmunoelectrotransferencia.

II. MATERIAL y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico (área de Bacteriología) del Departamento de Producción Animal: Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Cepa bacteriana.

Se utilizó una cepa de referencia de *Streptococcus suis* serotipo 2 (proporcionada por el Dr. Carlos Pijoan Aguade, Universidad de Minnesota), por ser la serovariedad de mayor frecuencia en México y que al compartir con los serotipos 4, 5 y 11 al menos 6 proteínas (con pesos moleculares de 70, 54, 40 y 33 kD), existe la posibilidad que los resultados obtenidos puedan corresponder a reacciones cruzadas entre dichos serotipos (62).

Cultivo de *S. suis* serotipo 2.

La cepa de *S. suis* serotipo 2 se cultivó en agar sangre (conteniendo 8% de sangre de bovino), a 37°C, en condiciones de aerobiosis durante 24 h.

Con las colonias de *S. suis* serotipo 2 (mucoides, claras de 1 mm de diámetro y β -hemolíticas) se realizó frotis con tinción de Gram y pruebas bioquímica y serológica. La serotipificación se llevó a cabo mediante la prueba de coaglutinación para el serotipo 2 (54) (reactivo proporcionado por el laboratorio de diagnóstico del Departamento de Producción Animal: Cerdos).

Obtención de antígenos.

Los antígenos protéicos se obtuvieron por el *método de los polvos acétonicos* (63). Brevemente:

- Se sembró una colonia de *S. suis* serotipo 2 en 50 ml de caldo Todd-Hewitt que se incubó a 37°C durante 18 h, pasándose a un volumen 2 litros, cuando este alcanzó la fase logarítmica de crecimiento, determinada a través de la absorbancia en un espectrofotómetro, utilizando un filtro de 590 nm (540 nm, 5 horas) (63), se detuvo su crecimiento en refrigeración a 4°C.

- El cultivo se centrifugó a 10,000 rpm / 15 min, el sedimento obtenido se lavó 3 veces con solución salina al 0.85% pH 7.2.
- Posteriormente, para liberar las proteínas de la membrana, se lavó 3 veces con acetona fría deshidratada con cloruro de calcio, el material obtenido se colocó en una caja de Petri dentro de una cámara de desecación por 3 días a 4°C hasta su completo secado.
- Para la extracción se disolvieron los polvos acétonicos en un amortiguador de extracción (Anexo 2) que se incubó por 2 h a 37°C en baño María, con agitación constante.
- El material se colocó en una membrana de diálisis (de 12-14 kDa), contra un amortiguador de fosfatos (Anexo 1), con agitación constante y en refrigeración, durante 3 días, con 3 cambios de amortiguador por día.
- Finalmente, el material dializado se centrifugó a 3,500 rpm por 15 min, se colectó el sobrenadante y se filtró utilizando una membrana Millipore de 0.22µm. El material obtenido se liofilizó y se conservó a -70°C hasta su uso.

La concentración de proteína se determinó utilizando el método descrito por Bradford (64).

Electroforesis (Page-SDS).

Se realizó una electroforesis en gel de bis-acrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes y reductoras, por el método descrito por Laemmli (19, 59) (Anexos 3, 4, 5 y 6), para conocer las proteínas y los pesos moleculares aproximados de los antígenos protéicos de *S. suis* serotipo 2.

- Para preparar las muestras se agregaron 2 mg/peso seco del extracto antigénico en 200 µl de agua desmineralizada y 30 µl de amortiguador de muestra (Anexo 7), esto se calentó por 5 min en baño María.
- Se colocaron 5, 10, 15 y 20 µl (10.2, 20.3, 30.5 y 40.7 µg de proteína) por carril respectivamente, incluyendo 5 µl de estándares de peso molecular (Bio-Rad® Laboratories).
- La electroforesis se corrió a 110 voltios.

- Los geles se tiñieron con azul de Coomassie al 0.1%, posteriormente se colocaron los geles en solución desteñidora (Anexo 8).

Se calculó el peso molecular de las bandas obtenidas a partir de los estándares de peso molecular mediante el software LabWorks™ (Análisis software UVP®. Versión 3.0.02.00. 1993-1999. Media Cybernetics).

Obtención de sueros de cerdos.

Se obtuvieron 272 sueros de cerdos procedentes de granjas de los estados de Jalisco (149), Yucatán (36), Coahuila (26), Tabasco (19), Estado de México (16) Puebla (10), Michoacán (9), Sonora (6) y Distrito Federal (1); se agruparon por edades de 0 a 24 semanas, hembras reproductoras de 0 a 8 partos, sementales y animales con aislamiento bacteriológico para *S. suis*, como se muestra en el siguiente Cuadro:

Cuadro 1. Sueros de cerdos por semanas de edad, número de parto, sementales y cerdos con aislamiento bacteriológico.

Línea de Producción.				Hembras	
Edad (semanas)	Nº de animales	Edad (semanas)	Nº de animales	Nº parto	Nº de animales
Suero fetal	1	9	8	0	8
1	16	10	8	1	9
2	17	12	8	2	8
3	8	14	8	3	8
4	8	16	8	4	8
5	8	18	8	5	8
6	8	20	8	6	8
7	8	22	8	7	8
8	8	24	8	8	4
			Total		154
Cerdos con aislamiento bacteriológico					41
				Sementales	8
				Total	77

Prueba de ELISA indirecta.

El ELISA se realizó siguiendo la metodología previamente descrita por del Campo Sepulveda (25, 65).

Brevemente:

- Se sensibilizaron inmunoplasmas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con una solución de 3 µg del extracto antigénico de *S. suis* serotipo 2 por ml de amortiguador de carbonatos (Anexo 9) colocando 250 µl por pozo. Se dejó incubar la placa en refrigeración a 4°C durante toda la noche.

- Se le agregó 250 μ l a cada pozo de solución bloqueadora (Anexo 11). Incubándose la placa por 30 min a 37°C.
- Después se lavó 3 veces con una solución PBS / Tween (Anexo 10) 3 min por lavado con agitación, desechando la solución de golpe.
- Se colocaron 100 μ l por pozo de sueros de cerdo (cada uno por duplicado) utilizando diluciones 1:50, 1:100 y 1:200 con PBS/ Tween; dejando dos pares de pozos libres como controles de sustrato y conjugado. La placa se dejó incubar 90 minutos.
- Se lavó 3 veces con PBS / Tween, como se describió anteriormente.
- Se colocaron 100 μ l por pozo de un anticuerpo peroxidado (anti IgG de cerdo) diluido 1:8000 en PBS / Tween. Se dejó incubar por 30 minutos a 37°C.
- Se lavó 3 veces con PBS / Tween, como se describió anteriormente.
- Se colocaron en la placa 250 μ l por pozo de solución reveladora (Anexo 12).
- Se detuvo la reacción con 25 μ l de ácido sulfúrico al 2.5 M. Se realizó la lectura utilizando un filtro de 492 nm en un lector de ELISA.

Determinación del límite de referencia.

Utilizando como prueba de referencia muestras de cerdos que resultaron negativos al aislamiento bacteriano para *S. suis*, se calculó la línea de corte a partir de la media de las densidades ópticas obtenidas por ELISA de sueros de estos animales. A esta media se le sumaron 2 desviaciones estándar (esto para evitar el error de omisión y ajustar lo más posible a la realidad), marcando así el límite de referencia para establecer si los sueros analizados son positivos (valores superiores a la línea de corte) o negativos (valores inferiores a la línea de corte).

Análisis estadístico del comportamiento de la prueba de ELISA indirecta.

Para evaluar el comportamiento de la prueba de ELISA indirecta, se tomó como prueba de referencia a sueros de cerdos con aislamiento bacteriano para *S. suis*.

Para el análisis del comportamiento de la prueba de ELISA indirecta se utilizó una tabla de contingencia de 2 x 2 (Cuadro 2), (66).

Cuadro 2. Tabla de contingencia 2 x 2.

		Prueba de referencia		
		Positivos	Negativos	Total
Prueba en Evaluación	Positivos	a	b	e
	Negativos	c	d	f
	Total	g	i	n

Con base en la tabla, se realizaron los siguientes cálculos:

- **Sensibilidad.** Es la capacidad de la prueba expresada en porcentaje, para dar un resultado positivo, entre individuos que realmente tienen *S. suis*.

$$S = (a/g)*100$$

- **Especificidad.** Es la capacidad de la prueba expresada en porcentaje, para dar un resultado negativo, entre individuos que realmente no tienen *S. suis*.

$$E = (d/i)*100$$

- **Valor de predicción positivo.** Es la capacidad de la prueba expresada en porcentaje, para detectar individuos con *S. suis*, entre individuos con resultado positivo.

$$V. P. + = (a/e)*100$$

- **Valor de predicción negativo.** Es la capacidad de la prueba expresada en porcentaje, para detectar individuos sin *S. suis*, entre individuos con resultado negativo.

$$V. P. - = (d/f)*100$$

- **Eficiencia (exactitud).** Es la capacidad de la prueba expresada en porcentaje, de decir que tantos resultados verdaderos se tiene en ambos grupos, entre el total de individuos (donde *a* = verdaderos positivos y *d* = verdaderos negativos).

$$EF = ((a+d)/n)*100$$

- *Índice kappa* (concordancia). Es la capacidad de la prueba de decir que tanto concuerda nuestra prueba en evaluación, comparada con la prueba de referencia.

$$\kappa = (P_o - P_e)/(1 - P_e)$$

$$P = (e/n)(g/n)(n)$$

$$N = f - (g - P)$$

$$P_e = (P + N)/n$$

$$P_o = (a+d)/n$$

El resultado del índice kappa se comparó con la escala de concordancia según Altman ⁽⁶⁶⁾ está se muestra en el Cuadro 3:

Cuadro 3. Escala de concordancia para el índice kappa.

DEFICIENTE =	0 — 0.20
REGULAR =	0.21 — 0.40
MODERADA =	0.41 — 0.60
BUENA =	0.61 — 0.80
MUY BUENA =	0.81 — 1.00

- *Reactividad*. Nos indica el porcentaje de individuos con resultado positivo, entre el total de individuos.

$$R = (e/n) * 100$$

Antígenos de *S. suis* serotipo 2 reconocidos por sueros de cerdos.

Para este fin se realizó Inmunolectrotransferencia con la metodología previamente descrita (67):

- Utilizando un sistema de cámara semiseca de transferencia, a partir de un gel de bis-acrilamida (como se describió anteriormente, pero sin teñir), se transfirieron los antígenos protéicos a papel de nitrocelulosa.
- El papel de nitrocelulosa se incubó por 30 min en amortiguador de transferencia (Anexo 13).
- Se sometió a 18 voltios por 45 min.
- Después de la transferencia, se aplicó una solución bloqueadora al papel de nitrocelulosa (Anexo 14) a 4°C toda la noche (el gel se tiñió para verificar el éxito de la transferencia). Se realizaron ciclos de lavado de 5 min, 3 veces con PBS / Tween y 2 veces con PBS (Anexo 10).
- El papel se cortó en tiras que se incubaron toda la noche a 4°C con los sueros a una dilución 1:25 en PBS / Tween (0.5 ml por cada tira de papel); dejando 3 tiras como controles negativo, sustrato y conjugado, pasado este tiempo realizándose 5 ciclos de lavado.
- Posteriormente se agregó conjugado peroxidado (anti-IgG de cerdo) diluido 1:8000 en PBS / Tween (0.5 ml por cada tira de papel), se incubaron por 2 h con agitación constante, realizándose 5 ciclos de lavado.
- Se colocaron 0.5 ml de solución reveladora (Anexo 15).

Las bandas reconocidas se analizaron mediante el software LabWorks™. Se realizó un análisis descriptivo, determinando los antígenos reconocidos por los anticuerpos de sueros de cerdo, con base al peso molecular, densidades ópticas obtenidas por ELISA y diferencia por edad.

III. RESULTADOS

Concentración de proteína del extracto antigénico *S. suis* serotipo 2.

- La concentración de proteína del extracto antigénico de *S. suis* serotipo 2 fue de 233.8 μg de proteína por mg de peso seco de acuerdo al método descrito por Bradford (65), mediante este resultado se calcularon las cantidades en peso seco a utilizarse en electroforesis, ELISA e inmunoelectrotransferencia.

Electroforesis (Page-SDS).

El patrón de electroforesis del extracto antigénico de *S. suis* serotipo 2 nos indica los pesos moleculares aproximados de los diferentes antígenos protéicos de *S. suis* 2, obtenidos a partir de los estándares de pesos moleculares, mediante el software LabWorks™. Esto puede observarse en la Figura 1.

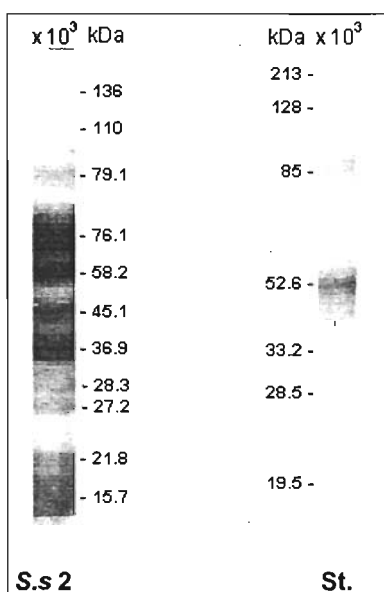


Figura 1. Análisis electroforético del extracto antigénico de *S. suis* 2.
- **S.s 2.** Proteínas de *S. suis* serotipo 2.
- **St.** Estándares de pesos moleculares.

Las bandas corresponden a 11 proteínas de 136 a 15.7 kDa (pesos moleculares aproximados). Se reconocen proteínas con pesos moleculares aproximados de 136, 110 y 58 kDa que pueden corresponder a MRP, EF y suilisina respectivamente.

ELISA indirecta.

Se calculó el límite de referencia para diferenciar sueros positivos y negativos por la prueba de ELISA indirecta, utilizando como prueba de referencia muestras de cerdos que resultaron negativos al aislamiento bacteriano para *S. suis*.

El límite de referencia se calculó como sigue:

Media de las densidades ópticas de sueros negativos al aislamiento	= 0.4169
Desviación estándar de densidades ópticas de sueros negativos al aislamiento bacteriano	= 0.1036
Media + 2 desviaciones estándar. = 0.6243	

Nota: Se eliminaron del cálculo de la media 5 sueros de sementales, debido a que pueden sesgar el límite de referencia para discriminar positivos de negativos.

Con base en el cálculo anterior se obtuvieron los siguientes resultados:

Los sueros de cerdos de 0 a 10 semanas de edad mostraron una baja reactividad ante *S. suis* serotipo 2, debido a que se obtuvieron resultados negativos en la mayoría de los sueros analizados (73.5%), esto puede observarse en las Figuras 2 y 3.

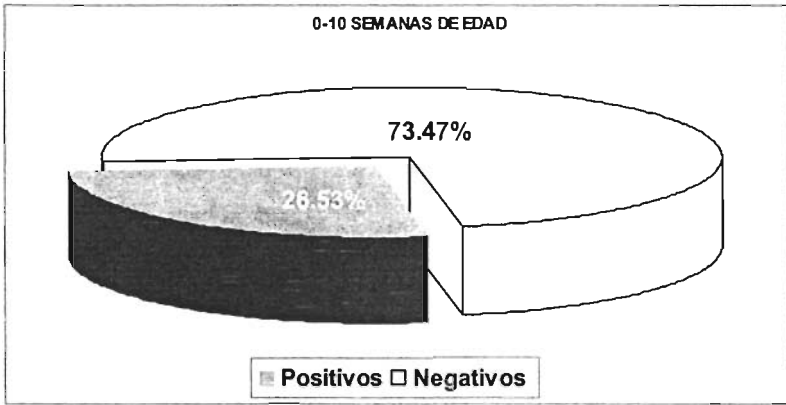


Figura 2. Análisis de reactividad expresada en porcentaje de sueros de cerdos de 0 a 10 semanas, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de *S. suis* serotipo 2.

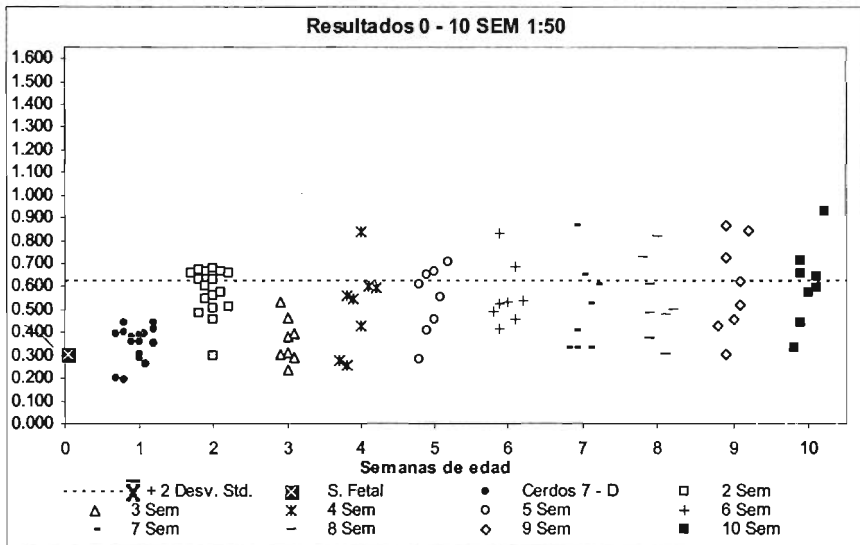


Figura 3. Densidades ópticas de los sueros de cerdos de 0 a 10 semanas de edad, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de *S. suis* serotipo 2.

Nota: La línea punteada muestra el límite de referencia para discriminar positivos de negativos.

Los sueros de cerdos de 10 a 24 semanas de edad mostraron una alta reactividad ante *S. suis* serotipo 2 (en contraste con los de 0 a 10 semanas) y se obtuvieron resultados positivos en la mayoría de los sueros analizados (79.7%), esto puede observarse en las Figuras 4 y 5.

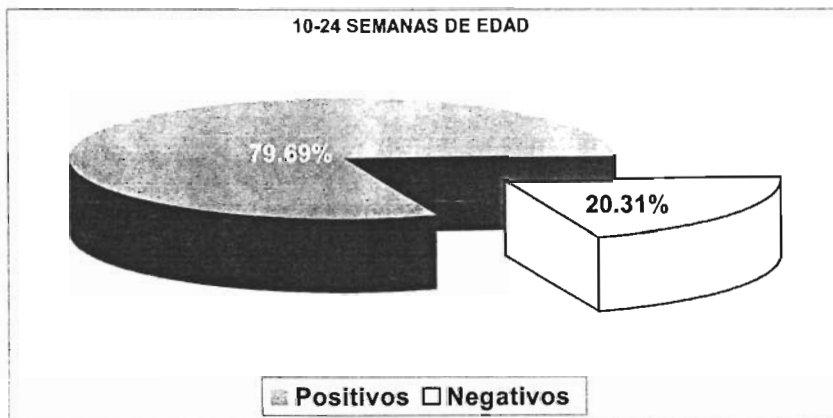


Figura 4. Análisis de reactividad expresada en porcentaje de sueros de cerdos de 10 a 24 semanas, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de *S. suis* serotipo 2.

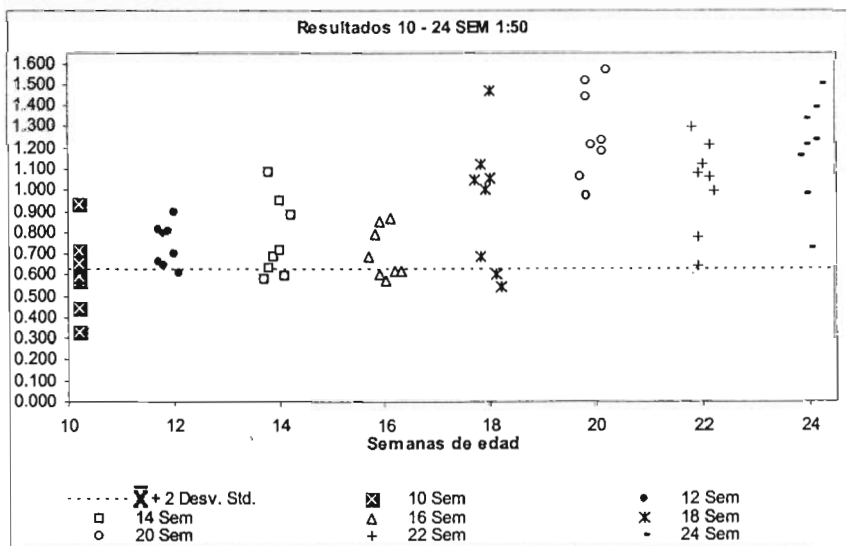


Figura 5. Densidades ópticas de los sueros de cerdos de 10 a 24 semanas de edad, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de *S. suis* serotipo 2.

Nota: La línea punteada muestra el límite de referencia para discriminar positivos de negativos.

Los resultados anteriores se condensaron para obtener el número de sueros de cerdos positivos y negativos de 0 a 24 semanas de edad, así como el porcentaje de los mismos. Como puede observarse en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Análisis de reactividad de sueros de cerdos de 0 a 24 semanas examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de *S. suis* serotipo 2.

Sem. de Edad	Muestras analizadas	Positivos	%/Sem	%/TOTAL (272)	Negativos	%/Sem	%/TOTAL (272)		
0	1	0	0.0	0.0	1	100.0	0.4		
1	16	0	0.0	0.0	16	100.0	5.9		
2	17	8	47.1	2.9	9	52.9	3.3		
3	8	0	0.0	0.0	8	100.0	2.9		
4	8	1	12.5	0.4	7	87.5	2.6		
5	8	3	37.5	1.1	5	62.5	1.8		
6	8	2	25.0	0.7	6	75.0	2.2		
7	8	2	25.0	0.7	6	75.0	2.2		
8	8	2	25.0	0.7	6	75.0	2.2		
9	8	4	50.0	1.5	4	50.0	1.5		
10	8	4	50.0	1.5	4	50.0	1.5		
12	8	7	87.5	2.6	1	12.5	0.4		
14	8	6	75.0	2.2	2	25.0	0.7		
16	8	4	50.0	1.5	4	50.0	1.5		
18	8	6	75.0	2.2	2	25.0	0.7		
20	8	8	100.0	2.9	0	0.0	0.0		
22	8	8	100.0	2.9	0	0.0	0.0		
24	8	8	100.0	2.9	0	0.0	0.0		
TOTAL	154	73	47.4	26.8	81	52.6	29.8	TOTAL	
								%/sem	%/Tot
								100.0	56.6

Se calcularon las medias de las densidades ópticas de los sueros de cerdos por grupo de edad (en semanas), para representar la curva de comportamiento de la respuesta inmune humoral medida por IgG de los cerdos de 0 a 24 semanas de edad ante *S. suis* serotipo 2, Figura 6.

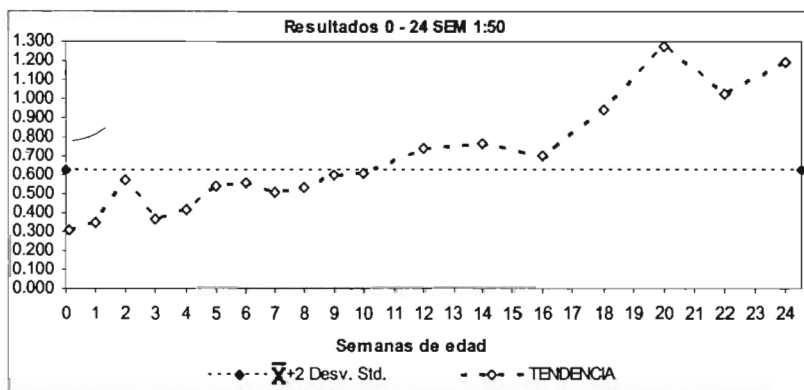


Figura 6. Curva de comportamiento de IgG ante *S. suis* serotipo 2 en sueros de cerdos de 0 a 24 semanas.

La curva de comportamiento de la respuesta inmune humoral medida por IgG ante *S. suis* en sueros de cerdos de 0 a 24 semanas, permite apreciar un pico de IgG en la 1ª semana de edad, seguido de una disminución de IgG entre la 2ª y 4ª semana (período o fase de destete), pasando a un aumento gradual de IgG, de tal forma, que a las 10 semanas de edad la gran mayoría de los sueros analizados resultan positivos a la prueba de ELISA indirecta.

Los sueros de hembras reproductoras de 0 a 8 partos mostraron una alta reactividad ante *S. suis*, se obtuvieron resultados positivos en la mayoría de los sueros analizados (88.4%), mientras que en los sueros de sementales se mantuvo a la par (50 y 50%), esto puede observarse en las Figuras 7, 8 y 9.

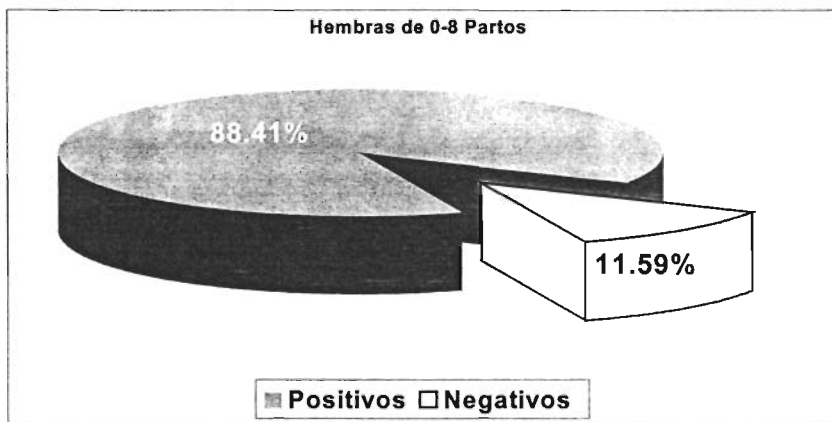


Figura 7. Análisis de reactividad expresada en porcentaje de sueros de hembras de 0 a 8 partos, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de *S. suis* serotipo 2.

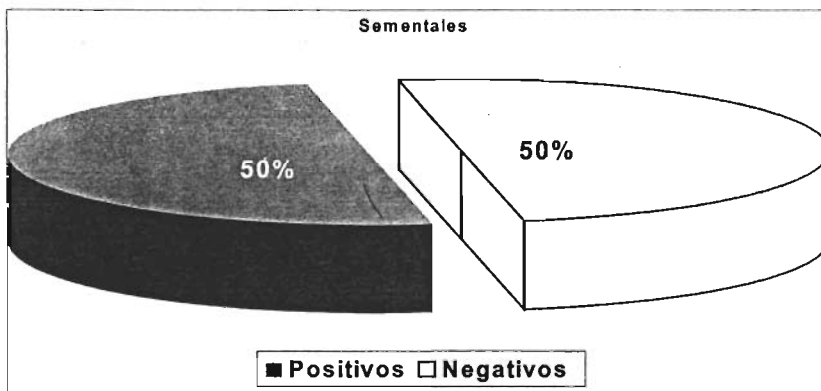


Figura 8. Análisis de reactividad expresada en porcentaje de sueros de sementales, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de *S. suis* serotipo 2.

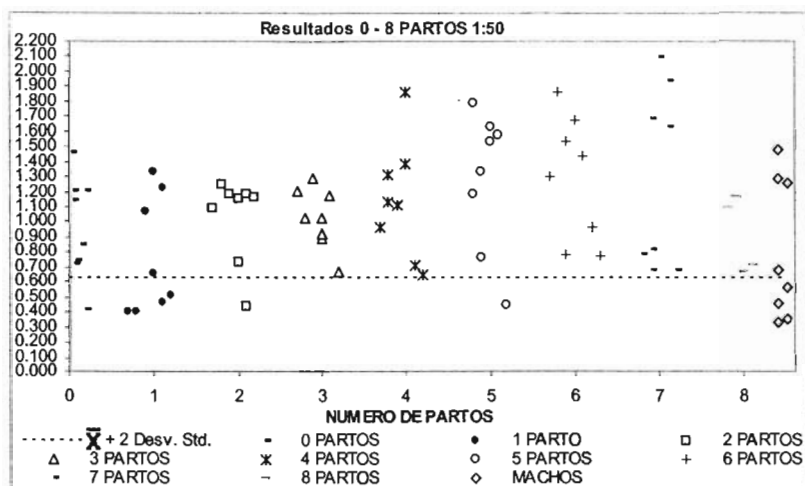


Figura 9. Densidades ópticas de los sueros de hembras por número de parto y sementales examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de *S. suis* serotipo 2.

Nota: La línea punteada muestra el límite de referencia para discriminar positivos de negativos.

Los resultados se condensaron para obtener el número de sueros de cerdos positivos y negativos de hembras de 0 a 24 semanas de edad y sementales, así como el porcentaje de los mismos. Como puede observarse en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Análisis de reactividad de sueros de hembras de 0 a 8 partos examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de *S. suis* serotipo 2.

Nº de Parto	Muestras analizadas	Positivos	%/Sem	%/TOTAL (272)	Negativos	%/Sem	%/TOTAL (272)		
0	8	7	87.5	2.6	1	12.5	0.4		
1	9	4	44.4	1.5	5	55.6	1.8		
2	8	7	87.5	2.6	1	12.5	0.4		
3	8	8	100.0	2.9	0	0.0	0.0		
4	8	8	100.0	2.9	0	0.0	0.0		
5	8	7	87.5	2.6	1	12.5	0.4		
6	8	8	100.0	2.9	0	0.0	0.0		
7	8	8	100.0	2.9	0	0.0	0.0		
8	4	4	100.0	1.5	0	0.0	0.0		
♂	8	4	50.0	9.2	4	50.0	1.5	TOTAL	
TOTAL	77	65	84.4	33.1	12	15.6	10.3	%/NP	%/Tot
								100.0	43.4

Se calcularon las medias de las densidades ópticas de sueros de hembras gestantes de 0 a 8 partos y sementales, para representar la curva de comportamiento de la respuesta inmune humoral medida por IgG ante *S. suis* serotipo 2, Figura 10.

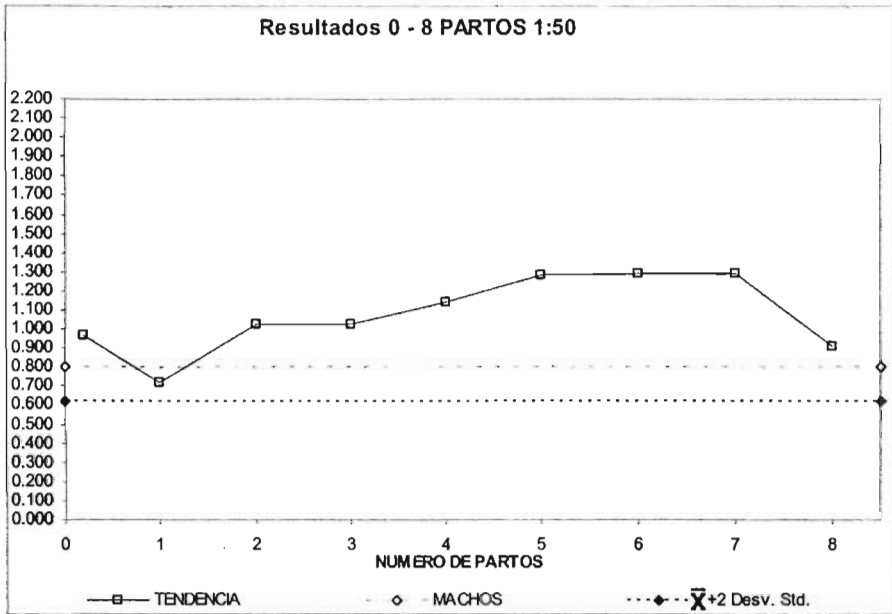
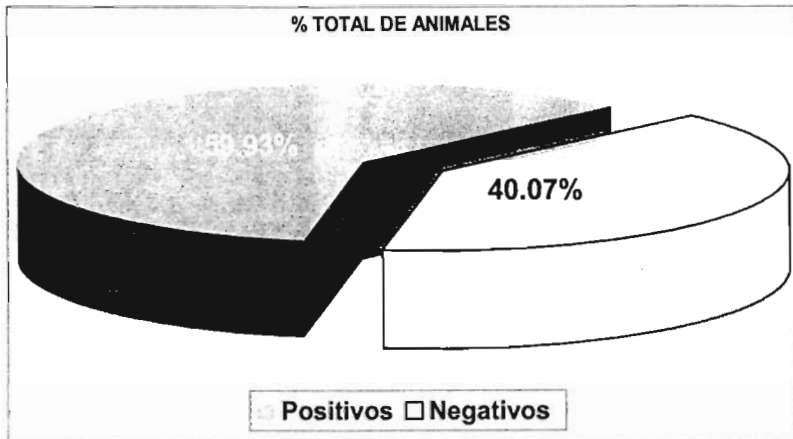


Figura 10. Curva de comportamiento de IgG ante *S. suis* en sueros de hembras de 0 a 8 partos y sementales

La curva de comportamiento de la respuesta inmune humoral medida por IgG ante *S. suis* serotipo 2 en sueros de hembras gestantes de 0 a 8 partos, permite observar que las cerdas de primer parto tienen una tasa menor de anticuerpos, aunque en la mayoría de estas resultaron positivas a la prueba.

Del total de sueros de cerdos analizados se observó que el 59.9% resultaron positivos al ELISA (Figura 11).



	Muestras analizadas	Positivos	%	Negativos	%
GRAN TOTAL	272	163	59.93	109	40.07

Figura 11. Análisis de reactividad expresada en porcentaje de sueros de cerdos de 0 a 24 semanas y cerdos reproductores, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de *S. suis* serotipo 2.

Como se mostró previamente la mayoría de los sueros negativos corresponden a animales menores a 10 semanas de edad, así mismo la mayoría de los sueros positivos corresponden a animales mayores a 10 semanas de edad.

Los resultados se agruparon para obtener el número de sueros de cerdos positivos y negativos de los diferentes Estados de la República Mexicana, así como el porcentaje de los mismos. Como puede observarse en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Análisis de reactividad de sueros de cerdos clasificados por Estado de la República Mexicana, examinados por ELISA indirecta, utilizando antígeno de *S. suis* serotipo 2.

Estado	Muestras analizadas	Positivos	%	Negativos	%
Jalisco	149	121	81.2	28	18.8
Yucatán	36	3	8.3	33	91.7
Coahuila	26	10	38.5	16	61.5
Tabasco	19	12	63.2	7	36.8
Edo. México	16	2	12.5	14	87.5
Puebla	10	6	60.0	4	40.0
Michoacán	9	3	33.3	6	66.7
Sonora	6	6	100.0	0	0.0
Distrito Federal	1	0	0.0	1	100.0

Análisis estadístico de la prueba de ELISA indirecta.

Se observaron 25 sueros de cerdos con aislamiento bacteriano positivo para *S. suis* y 11 con aislamiento bacteriano negativo (al igual que en el cálculo del límite de referencia se omitieron 5 sueros de sementales), de los cuales:

- 23 de los 25 sueros con aislamiento bacteriano positivo fueron positivos en ELISA.
- 10 de los 11 sueros con aislamiento bacteriano negativo fueron negativos en ELISA.

Ordenando esta información para fines de la evaluación diagnóstica, los datos quedaron como se muestra en el Cuadro 7:

Cuadro 7. Resultados de la evaluación diagnóstica del ELISA para detectar anticuerpos IgG contra *S. suis* serotipo 2, en cerdos de diferentes edades.

Parámetro	Valor
Sensibilidad	92.00%
Especificidad	90.91%
Valor predictivo positivo	95.83%
Valor predictivo negativo	83.33%
Eficiencia (exactitud)	91.67%
Índice kappa (concordancia)*	0.81
Reactividad	66.67%
	Altman, 1991 (66).

* Muy buena concordancia

Antígenos de *S. suis* reconocidos por sueros de cerdos.

Se realizó la inmunoelectrotransferencia con la finalidad de observar el reconocimiento de IgG de los sueros de cerdos hacia los antígenos protéicos, para evaluar los pesos moleculares aproximados, su patrón de presentación por edad y la correlación con el resultado obtenido por ELISA.

El patrón de inmunoelectrotransferencia de *S. suis* serotipo 2 nos indica los pesos moleculares de los diferentes antígenos protéicos, reconocidos por las IgG presentes en sueros de cerdos a diferentes edades, utilizando el software LabWorks™. Esto puede observarse en la Figura 12.

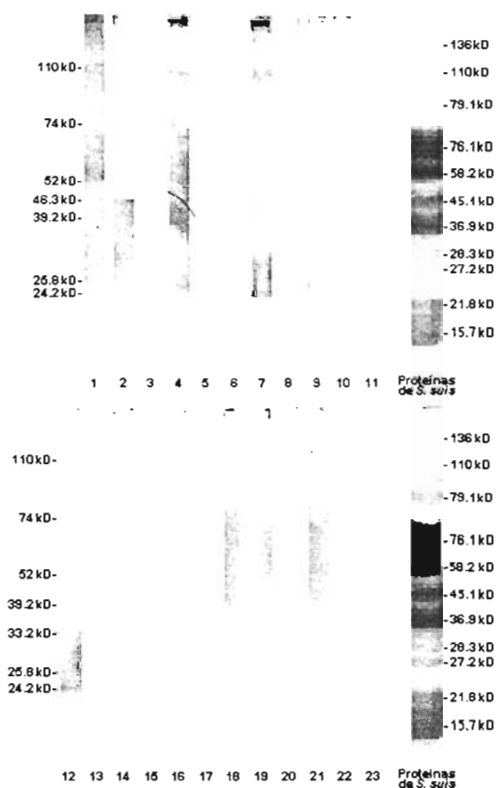


Figura 12. Análisis por Inmunoelectrotransferencia que muestra el reconocimiento de los antígenos de *S. suis* 2 por sueros de cerdos de diferentes edades.

- **S.s 2.** Pesos moleculares en kilodaltons de las proteínas de *S. suis* 2.
- **Líneas 1 y 2.** Sueros de cerdos de 1 sem.
- **Líneas 3 a 10.** Sueros de cerdos de 2 a 10 sem (línea 3 control negativo).
- **Línea 12.** Suero de cerdo de 12 sem.
- **Líneas 13 a 20.** Sueros de hembras gestantes de 0 a 7 partos.
- **Línea 21.** Suero de semental. - **Líneas 22 y 23.** Controles sustrato y conjugado.

Las bandas obtenidas por inmunoelectrotransferencia pueden corresponder a 9 proteínas con pesos moleculares aproximados de 110 a 24.2 kDa. Pueden reconocerse proteínas con pesos moleculares aproximados de 110 y 52 kDa que son similares a los complejos antigénicos EF y suilisina respectivamente.

La proteína más reconocida fue la de aproximadamente de 110 kDa (reconocida por 20 de los 21 sueros de cerdos analizados), seguido de las proteínas de 74, 39.2 y 25.8 kDa (reconocidos por 5, 4 y 4 sueros respectivamente); mientras que una proteína con peso molecular similar a la suilisina solo fue reconocida por 3 de los 21 sueros analizados. La MRP de 136 kDa al parecer no fue reconocida por los sueros de cerdos.

El suero de cerdo que reconoció más proteínas de *S. suis* serotipo 2 fue el de la línea 1 (cerdo de 1 semana de edad) con 7 proteínas reconocidas, seguido de los sueros 4, 7 y 18 (3 y 6 semanas de edad y hembra gestante de quinto parto) con 6, 5 y 5 proteínas reconocidas. El suero de la línea 3 (cerdo de 2 semanas de edad) no reconoció proteínas de *S. suis* serotipo 2 (cabe mencionar que este se utilizó como control negativo).

En cuanto a la comparación de las densidades ópticas obtenidas por ELISA con el reconocimiento de antígenos de *S. suis* serotipo 2, no se encontró alguna correlación, ya que sueros de animales adultos (positivos en ELISA), mostraron pocas bandas; mientras que sueros de 1 a 4 semanas (negativos en ELISA), mostraron una mayor cantidad de bandas.

IV. DISCUSIÓN

S. suis es un patógeno del cerdo importante que causa pérdidas económicas significativas a productores. Además, esta bacteria representa un riesgo de salud para aquéllos involucrados en la industria del cerdo (28). Coloniza la superficie del tracto respiratorio superior y puede causar infecciones severas como meningitis y septicemia, las cepas más virulentas pueden invadir tejidos más profundos y alcanzar la circulación sanguínea, por consiguiente tienen que adaptarse a ambientes diferentes durante la infección (14).

En las infecciones de *S. suis* en cerdos se debe tomar en cuenta, entre otras cosas, el estado inmunológico de los animales, la ruta de infección, el tamaño del inóculo, y la presencia de *S. suis* como habitante normal del tracto respiratorio superior. La presencia de niveles altos de bacterias en el torrente sanguíneo de animales se pone en correlación con los signos y síntomas clínicos (51).

Tomando la definición de que un individuo portador asintomático es aquel que no presenta manifestaciones clínicas de una enfermedad y que sólo se puede demostrar aislando e identificando el agente infeccioso (28), entonces se puede considerar que los individuos que resultaron positivos a *S. suis* serotipo 2 por ELISA son portadores que pueden propagar el agente y actuar como fuente de infección, sin olvidar que todo portador puede ser atacado por el microorganismo cuando su resistencia disminuye por enfermedades recurrentes, inmunodepresoras, desnutrición u otros factores, recordando que los cerdos pueden verse afectados hasta los 6 meses de edad (1).

Los resultados de este estudio muestran que el 26.5% de los sueros analizados de cerdos de 0 a 10 semanas tuvieron títulos de IgG altos contra *S. suis* serotipo 2 medidos por ELISA, en contraste con animales de 10 a 24 semanas con un 79.7%; hembras reproductoras un 88.4%, mientras que los sementales mostraron una positividad del 50%.

Esto demuestra la curva de exposición de los cerdos a *S. suis* serotipo 2, se puede apreciar un número considerable de animales adultos con resultado

negativo por ELISA, debido a la gran variación que existe entre el estado sanitario de las granjas de cerdo en México, pudiendo encontrar granjas con animales expuestos a *S. suis* en prácticamente todas las etapas productivas, granjas con exposición en etapas productivas específicas (marcadas los diferentes tipos de alojamiento, densidad de población y medidas de bioseguridad que pueden variar dentro de una misma granja) o en algunos casos granjas con excelentes medidas de bioseguridad que representan un bajo nivel de exposición de los animales.

Sin embargo, la simple presencia de *S. suis* en la granja, en hisopos nasales y tonsilares no es un buen indicador de enfermedad, ya que es un microorganismo muy común en cerdos (considerado como flora normal), con una tasa muy alta entre la mayoría de las granjas en México. Sin embargo, sólo algunas de estas infecciones producen enfermedad clínica (51).

Fueron comparados por el índice kappa un número limitado de muestras con aislamiento bacteriano los resultados de ELISA de animales infectados y no infectados, resultando ser de 0.81, quedando entonces en la escala según Altman (1991) como una prueba con "Muy Buena Concordancia" al ser comparada con los resultados del aislamiento bacteriano (66).

En el presente estudio el 91.7% de los sueros probados fueron diagnosticados confiablemente, los resultados del aislamiento y ELISA no coincidieron en 3 ocasiones. Esta divergencia puede deberse a la inespecificidad que pueden presentar las pruebas o bien cualquier variación en el desarrollo de las mismas.

La concordancia observada en este trabajo se considera alta, pues se usaron métodos suficientemente sensibles y específicos.

Se encontraron animales positivos en la mayoría de las edades y etapas productivas, aunque en algunos casos el aporte de muestras fue reducido, debe considerarse que hay una gran variabilidad en los tipos de explotación de los que provienen.

El análisis de inmunoelectrotransferencia reveló 9 proteínas con pesos moleculares aproximados de 110 a 24.2 kDa. Encontrando así que proteínas con

pesos moleculares de 110 y 52 kDa que por su similitud, pudieran tratarse de los complejos antigénicos EF y suilisina respectivamente.

La proteína más reconocida en la mayoría de los sueros analizados (95.42%) fue una similar al EF, mientras que otra proteína con peso molecular semejante la suilisina fue reconocida por pocos sueros (14.29%) y la MRP al parecer no fue reconocida por los sueros de cerdos, resultado que es semejante a los reportes de Quessy y Vecht (30,68).

El suero de cerdo que reconoció más proteínas de *S. suis* serotipo 2 fue el de un cerdo de una semana de edad, seguido por el de una hembra gestante de quinto parto. Esto puede explicarse por que la cerda gestante proporciona la mayor cantidad y diversidad posible de inmunoglobulinas por medio del calostro y del transporte selectivo por placenta de varias subclases de IgG (aunque no es significativo en cuanto a protección) (44, 45), por tanto, se observa un reconocimiento de diversas proteínas en sus lechones, el cual disminuye conforme baja la inmunidad materna (1, 43), observando un reconocimiento más específico en animales de mayor edad.

La patogénesis de infecciones por *S. suis* involucra una interacción entre múltiples factores de virulencia: MRP, EF, suilisina, cápsula, adhesinas y otros atributos bacterianos. Sin embargo, existe controversia sobre la importancia de estos durante la infección, particularmente con las proteínas MRP y EF, varios estudios han informado que ambas proteínas contribuyen y otros informan que no contribuyen en la virulencia de las cepas (30,31).

Aunque al parecer no fue reconocida la MRP por los sueros de cerdos, no se puede definir a las cepas que indujeron la respuesta de IgG en estos animales como de baja virulencia, ya que se ha demostrado que fenotipos de *S. suis* MRP negativos causan también el cuadro clínico (27).

Las ventajas principales de una prueba como el ELISA son sus capacidades para detectar IgG contra *S. suis* a partir de suero, reducir el tiempo requerido para identificar individuos positivos, e incrementar el número de casos analizados al mismo tiempo.

Resulta difícil trabajar múltiples muestras para aislamiento, considerando que los aislamientos bacteriológicos requieren 3 días por lo menos (incluso el aislamiento primario, identificación bioquímica y serotipificación). La dificultad mayor del aislamiento bacteriológico es localizar colonias de *S. suis* en muestras multi-infectadas.

Si se compara el diagnóstico de *S. suis* mediante la prueba de PCR con la de ELISA indirecta, pudiera resultar el PCR más conveniente por su especificidad y rapidez, pero al compararlo con el ELISA resulta excesivamente costoso, además que el ELISA utilizado en este estudio es lo suficientemente rápido, sensible y específico.

La prueba de ELISA para *S. suis* serotipo 2 distingue cerdos expuestos de los no expuestos. La sensibilidad y especificidad de esta prueba son buenas, para que ésta pueda ser de utilidad por que puede determinar la exposición de cerdos al *S. suis*.

La contribución más importante de este estudio fue conocer la respuesta inmune humoral medida por IgG ante *S. suis* serotipo 2 en cerdos de diferentes edades, pero es importante realizar estudios más extensos, como puede ser la determinación de anticuerpos IgM, esto con el fin de diferenciar el tiempo en que los cerdos son capaces de producir sus propios anticuerpos contra el *S. suis*.

V. CONCLUSIONES

- Se encontró que los cerdos dentro de las 2 primeras semanas de edad presentan un pico de IgG, aportado en mayor parte por la inmunidad pasiva de la madre (vía placentaria e ingestión de calostro).
- Entre la 3ª y 4ª semana se observó una caída de IgG, que es desaparición de la inmunidad pasiva materna, correspondiente a la etapa crítica de la presentación de la enfermedad (la etapa de destete).
- Se encontró que cerdos a partir de las 10-semanas de edad con prolongada exposición a *S. suis*, resultan positivos a la prueba de ELISA indirecta (no importando si presentaron o no manifestaciones clínicas).
- En hembras reproductoras se aprecia un aumento gradual por parto, con una leve disminución al llegar a 8 partos; los sementales se comportaron de manera heterogénea, pero como se describió anteriormente esto se debe a la variación que existe en cuanto al estado sanitario de las granjas y de los alojamientos de estos animales con respecto a los destinados para abasto.
- Aparentemente la especificidad de los anticuerpos IgG de los cerdos tienen una mayor afinidad por el EF de *S. suis* serotipo 2, mientras que los anticuerpos IgG de los sueros de cerdos utilizados en este estudio no presentan reconocimiento de proteínas similares al MRP de *S. suis* (al menos del serotipo 2)

Los resultados obtenidos con la técnica de ELISA usada en este estudio se puede concluir, que puede usarse eficazmente durante las investigaciones epidemiológicas extensas y de transmisión en las infecciones de *S. suis* y contribuir a los esfuerzos por controlar o erradicar infecciones, con objetivos profilácticos e intervención terapéutica continúa.

VI. ANEXOS

ANEXO 1.

Amortiguador de fosfatos, pH 7.2.

Sol. A.

- | | | |
|---------------------------------------|-----|-----------|
| - Fosfato de potasio monobásico 1.0 M | | 136.09 g. |
| - Agua bidestilada | cbp | 1000 ml. |

Sol. B.

- | | | |
|-----------------------------------|-----|-----------|
| - Fosfato de sodio dibásico 1.0 M | | 141.96 g. |
| - Agua bidestilada | cbp | 1000 ml. |

Se mezclan ambas soluciones como sigue:

Sol. Stock

- | | | |
|-----------|--|---------|
| - Sol. A. | | 100 ml. |
| - Sol. B. | | 900 ml. |

La Sol. Stock se diluye 1:100 con agua bidestilada

ANEXO 2.

Amortiguador de extracción.

- | | | |
|---|-----|----------|
| - Cloruro de magnesio 0.012M | | 2.44 g. |
| - Sacarosa 0.25M | | 85.25 g. |
| - Desoxicolato (ácido desoxicólico) | | 4.00 g. |
| - Cloruro de potasio 0.1M | | 7.45 g. |
| - DNAsa (Desoxirribonucleasa) Se añade al momento de usarla | | 10 mg. |
| - Sol. Stock (amortiguador de fosfatos) diluida 1:10 con agua bidestilada | cbp | 1000 ml. |

ANEXO 3.

Soluciones para preparar Gel de Bis-acrilamida al 10%.

- | | | |
|--|-----|-----------|
| - Sol. Bis-acrilamida 30:0.8
(Filtrar por 0.45 y mantener en fco. ambar a 4°C) | | |
| Archilamida | | 30 g. |
| Bisacrilamida | | 0.8 g. |
| Agua bidestilada | cbp | 100 ml. |
| - Sol. Triz al 1.5M pH 8.8
(Filtrar por 0.45 y mantener en fco. ambar a 4°C) | | |
| Trizma base | | 18.165 g. |
| Lauril sulfato (SDS) | | 0.4 g. |
| Agua bidestilada | cbp | 100 ml. |
| - Sol. Persulfato de amonio (APS) al 10% | | |
| APS | | 1 g. |
| Agua bidestilada | cbp | 10 ml. |
| - Sol. Triz al 0.5M pH 6.8. mantener a 4°C | | |
| Trizma base | | 6.055 g. |
| Agua bidestilada | cbp | 100 ml. |
| - Sol. Lauril sulfato de sodio (SDS) al 10% mantener a 4°C | | |
| SDS | | 1 g. |
| Agua bidestilada | cbp | 10 ml. |
| Glicerol al 80 % | | |

ANEXO 4.**Gel Separador 10%**

Se homogenizan las sustancias en recipiente oscuro:

- Agua bidestilada	1.330 ml.
- Sol. Bis-acrilamida	1.450 ml.
- Sol. Triz pH 8.8.	1.125 ml.
- Glicerol	600 µl.
- Temed	5 µl.
- Sol. APS Siempre al final	10 µl.

ANEXO 5.**Gel concentrador 5%.**

Se homogenizan las sustancias en recipiente oscuro:

- Agua bidestilada	1.4 ml.
- Sol. Bis-acrilamida	333 µl.
- Temed	2 µl.
- Sol. Triz pH 6.8.	250 µl.
- Sol. SDS	20 µl.
- Sol. APS. Siempre al final	20 µl.

ANEXO 6.**Amortiguador de electroforesis.**

- Trizma base	3 g.
- Glicina (Ácido aminoacético)	14.4 g.
- SDS	1 g.
- Agua bidestilada	cbp 1000 ml.

ANEXO 7.**Amortiguador de muestra.**

- Sol. Triz pH 6.8.	1.6 ml.
- Sol. SDS	2 ml.
- Glicerol 10%	1 ml.
- Agua bidestilada	5.4 ml.
- Azul de bromofenol (0.1%)	10 µl.
- 2-β-mercaptoetanol	1 ml.

ANEXO 8.**Sol. desteñidora.**

- Ácido acético al 10%	100 ml.
- Metanol al 15%	150 ml.
- Agua bidestilada	cbp 1000 ml.

ANEXO 9.**Amortiguador de carbonatos 6.4 mM, pH 9.6.****Sol. 1.**

- Bicarbonato de sodio 1.0 M		8.40 g.
- Agua desmineralizada	cbp	100 ml.

Sol. 2

- Carbonato de sodio 1.0 M		10.6 g.
- Agua desmineralizada	cbp	100 ml.

Se mezclan ambas soluciones como sigue:

- Sol. 1		4.56 ml.
- Sol. 2		1.84 ml.
- Agua desmineralizada	cbp	100 ml.

ANEXO 10.**PBS (Solución amortiguadora de fosfatos) pH 7.4.****Sol. Stock 1.(10X)**

- Cloruro de sodio		80 g.
- Cloruro de potasio		2 g.
- Cloruro de calcio		1 g.
- Cloruro de magnesio		1 g.
- Agua bidestilada	cbp	1000 ml.

Sol. Stock 2.(10X)

- Fosfato de sodio monobásico		11.9 g.
- Fosfato de sodio dibásico		11 g.
- Agua bidestilada	cbp	1000 ml.

PBS (1X)

- Sol. A.		100 ml.
- Sol. B.		100 ml.
- Agua desmineralizada	cbp	1000 ml.

PBS para ELISA / Tween 0.05%

- Tween 20		500 µl
- PBS 1X		1000 ml

PBS para Inmunoelctrotansferencia /Tween 0.3%

- Tween 20		3 ml
- PBS 1X		1000 ml.

ANEXO 11.**Sol. Bloqueadora para ELISA.**

- Leche descremada		3 g
- PBS / Tween 0.05%	cbp	100 ml.

ANEXO 12.**Sol. Reveladora para ELISA.****Sol. Stock A.**

- Fosfato de sodio dibásico		2.84 g.
- Agua bidestilada	cbp	100 ml.

Sol. Stock B.

- Ácido cítrico		1.92 g.
• Agua bidestilada	100 ml.	50 ml.

Solución de citrato-fosfato

- Sol. Stock A.		12.8 ml.
- Sol. Stock B		12.2 ml.
- Agua bidestilada	cbp	50 ml.

Se ajusta pH 5.0 y resuspender

- Orto-fenilenediamida (OPD)		400 µg/ml.
- Peroxido de hidrogeno al 3%		2 µl/ml.

ANEXO 13.**Amortiguador de transferencia.**

- Trizma base 25 mM		3.03 g
- Glicina		14.4 g
- Agua bidestilada		800 ml
- Metanol * grado analítico		200 ml

*Primero se deben disolver en el agua el trizma y la glicina, después agregar el metanol

ANEXO 14.**Sol. Bloqueadora para Inmunoelctrotransferencia.**

- Leche descremada		50 g
- PBS / Tween 0.3%		1000 ml

ANEXO 15.**Sol. Reveladora para Inmunoelctrotransferencia.****Sol. Stock 6X**

- Ortocloronaftol		3 mg
- Metanol	cbp	1 ml

Sol. Reveladora.

- Sol. Stock		2 ml
- PBS		10 ml
- Peroxido de hidrogeno		4 µl

VII. LITERATURA CITADA

1. Taylor, D.J. Pig Diseases. Printed in Great Britain by St. Edmundsbury Press Ltd, Bury St. Edmunds Suffolk. 1999. 7th. Edition. pp. 232-237.
2. Chanter, N., Jones, P.W. and Alexander, T.J. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis* a speculative review. Vet. Microbiol. 1993. 36:39-55.
3. Chengappa, M.M., Maddux, R.L., Kadel, W.L., Greer, S.C. and Herrin, C. E. *Streptococcus suis* infection in pigs: incidence and experimental reproduction of the syndrome. In Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Veterinary Diagnosticians Inc. Reynolds Printing Co., Brookings, S. Dak. 1986. pp. 25-38.
4. Gottschalk, M., Lacouture, S. and Odierno, L. Immunomagnetic isolation of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 from swine tonsils. J. Clin. Microbiol. 1999. 37:2877-2881.
5. Williams, M.D., Lawson, G.H. and Rowland, A.C. Streptococcal infection in piglets: the palatine tonsils as portals of entry for *Streptococcus suis*. Res. Vet. Sci. 1973. 15:352-362.
6. Hogg, A., Amass, S.F., Hoffman, L.J., Wu, C.C. and Clark, L.K. A survey of *Streptococcus suis* isolations by serotype and tissue of origin. In Proc. Am. Assoc. Swine Pract. 1996. pp. 79-81.
7. Robertson, I.D. and Blackmore, D.K. Prevalence of *Streptococcus suis* types I and II in domestic pigs in Australia and New Zealand. Vet. Rec. 1989. 124:391-394.
8. Amass, S.F. Eradication, prevention, and treatment of meningitis in weaned pigs caused by *Streptococcus suis*. In Proc Am Assoc Swine Pract, 1997, pp. 411-414. Quebec, Canada.
9. Reams, R.Y., Harrington, D.D., Glickman, L.T., Thacker, H.L. and Bowersock, T.L. Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. J. Vet. Diagn. Invest. 1996. 8:119-121.
10. Devriese, L.A. and Haesebrouck, F. *Streptococcus suis* in horses and cats. Vet. Rec. 1992. 130:380.

11. Devriese, L.A., Cruz Colque, J.I., de Herdt, P. and Haesebrouck, F. Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. *J. Appl. Bacteriol.* 1992. 73:421–425.
12. Devriese, L.A., Haesebrouck, F., de Herdt, P., Dom, P., Ducatelle, R., Desmidt, M., Messier, S. and Higgins, R. *Streptococcus suis* infections in birds. *Avian. Pathol.* 1994. 23:721–724.
13. de Moor, C.E. Septicaemic infections in pigs caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R, S and T. Antoine van Leeuwenhoek. 1963. 29:272-280.
14. Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L. and Taylor, D.J. Diseases of swine. Iowa state University Press / Ames, Iowa U.S.A. 1999. 8 th edition. p.p. 563-570.
15. Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M., Beaudoin, M. and Henrichsen, J. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 1991. 29:2590–2594.
16. Higgins, R., Gottschalk, M., Boudreau, M., Lebrun, A. and Henrichsen, J. Description of six new capsular types (20 through 34) of *Streptococcus suis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1995. 7:405–406.
17. Galina, L., Vecht, U., Wisselink, H.J. and Pijoan, C. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muraminidase-released protein and extra cellular factor. *Can. J. Vet. Res.* 1996. 60:72–74.
18. Higgins, R. and Gottschalk, M. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1998. *Can. Vet. J.* 1999. 40:277.
19. Vela, A.I., Goyache, J., Tarradas, C., Luque, I., Mateos, A., Moreno, M.A., Borge, C., Perea, J.A., Domínguez, L. and Fernández-Garayzábal, J.F. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 2003. 41:2498-2502.
20. Staats, J.J., Feder, I., Okwumabua, O. and Chengappa, M.M. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet. Res. Commun.* 1997. 21:381-407.
21. MacLennan, M., Foster, G., Dick, K., Smith, W.J. and Nielsen, B. *Streptococcus suis* serotypes 7, 8 and 14 from diseased pigs in Scotland. *Vet. Rec.* 1996. 139:423–424.

22. Gogolewski, R.P., Cook, R.W. and O'Connell C.J. *Streptococcus suis* serotypes associated with disease in weaned pigs. Aust. Vet. J. 1990. 67:202-204.
23. Wisselink, H.J., Smith, H.E., Stockhofe-Zurwieden, N., Peperkamp, K. and Vecht, U. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. Vet. Microbiol. 2000. 74:237-248.
24. Rasmussen, S., Aarestrup, F., Jensen, N. and Jorsal, S. Associations of *Streptococcus suis* Serotype 2 Ribotype Profiles with Clinical Disease and Antimicrobial Resistance. J. Clin. Microbiol. 1999. Vol. 37, No. 2 pp. 404-408.
25. Kataoka, Y., Yamashita, T., Sunaga, S., Imada, Y., Ishikawa, H., Kishima, M. and Nakazawa, M. An enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody against *Streptococcus suis* type 2 in infected pigs. J. Vet. Med. Sci. 1996. 58:369–372.
26. Galván, P.E., Martínez, M.J., Jiménez, E., Negrete, G., Mercadillo, A., Haro, M., Pijoan, C. y Ramírez, G. Uso de la prueba de coagulación, para la tipificación de *Streptococcus suis*. XXXII CN-AMVEC. 1997. pp. 108.
27. Smith, H.E., Damman, M., Van Der Velde, J., Wagenaar, F., Wisselink, H.J., Stockhofe-Zurwieden, N. and Smits, M.A. 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. 1999. 67:1750-1756.
28. Perea, J.A. Estreptococias porcinas: importancia y estrategias de control. Departamento de Sanidad Animal. Facultad Veterinaria. Universidad de Córdoba www.revista-anaporc.com. 2000.
29. Edwards, M.S., Kasper, D.L., Jennings, H.J., Baker, C.J. and Nicholson-Weller, A. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. J. Immunol. 1982. 128:1278–1283.
30. Vecht, U., Wisselink, H.J., van Dijk, J.E. and Smith, H.E. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germ free pigs depends on phenotype. Infect. Immun. 1992. 60:550–556.

31. Vecht, U., Wisselink, H.J., Jellema, M.L. and Smith, H.E. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect. Immun.* 1991. 59:3156–3162.
32. Feder, I., Chengappa, M.M., Fenwick, B., Rider, M. and Staats J. Partial characterization of *Streptococcus suis* type 2 haemolysin. *J. Clin. Microbiol.* 1994. 32:1256-1260.
33. Gottschalk, M., Lacouture, S. and Dubreuil J.D. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology.* 1995. 141:189-195.
34. Jacobs, A., van den Berg, J.G., Baars, J., Nielsen, B. and Johannsen, L.W. Production of suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*, by field isolates from diseased pigs. *Vet. Rec.* 1995. 137:295-296.
35. Haataja, S., Tikkanen, K., Liukkonen, J., François-Gerard, C. and Finne, J. Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 1993. 268:4311–4317.
36. Tikkanen, K., Haataja, S. and Finne, J. Galactosyl-(α 1-4)-galactose-binding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies. *Infect. Immun.* 1996. Vol. 64:3659-3665.
37. Pijoan, C. Bacterial respiratory pathogens: What is their impact? In *Proc 4th Annu. Swine Dis. Conf. Swine Pract.* 1996. pp. 45–47.
38. Torremorell, M. Exposure of Pigs to *Streptococcus suis* for Disease Prevention. *Can. J. Vet. Res.* 2000. 63.
39. Amass, S.F., San Miguel, P. and Clark, L.K. Demonstration of vertical transmission of *Streptococcus suis* in swine by genomic fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 1997. 35:1595–1959.
40. Vallejo, J.G., Baker, C.J. and Edwards, M.S. Roles of the bacterial cell wall and capsule in induction of tumor necrosis factor alpha by type III group B streptococci. *Infect. Immun.* 1996. 64:5042-5046.
41. de Greeff, A., Van Alphen, L. and Smith, H. Selection of recombinant antibodies specific for pathogenic *Streptococcus suis* by subtractive phage display. *Infect. Immun.* 2000. 68:3949-3955.

42. Serhir, B., Dubreuil D., Higgins, R. and Jacques, M. Purification and characterization of a 52- kilodalton immunoglobulin G-binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. J. Bacteriol. 1995. 177:3830–3836.
43. Butler, J.E., Larson, B.L. and Smith, V. Immunoglobulins of the mammary secretions. in lactation: A comprehensive treatise. 1974. Vol. III:217-255. Academic Press, NY.
44. Butler, J.E., Sun, J., Weber, P., Ford, S., Rehakova, Z., Sinkora, J. and Lager, K. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. IV. Switch recombination, primarily in fetal thymus, occurs independent of environmental antigen and is only weakly associated with repertoire diversification. J. Immun. 2001. 167:3239-3249.
45. Klobasa, F., Werhahn, E. and Butler, J.E. Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulin of maternal origin. Res. Vet. Sci. 1981. 31:195.
46. Clifton-Hadley, F.A. Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. Ph.D. Thesis. University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom. 1981.
47. Robertson, I.D. and Blackmore, D.K. Occupational exposure to *Streptococcus suis* type 2. Epidemiol. Infect. 1989. 103:157-164.
48. Michaud, S., Duperval, R., and Higgins, R. *Streptococcus suis* meningitis: First case reported in Quebec. Can. J. Infect Dis. 1996. 7:329–331.
49. Walsh, B., Williams, A. E. and Satsangi, J. *Streptococcus suis* type 2: pathogenesis and clinical disease. Rev. Med. Microbiol. 1992 3:65-71.
50. François, B., Gissot, V., Ploy, M.C. and Vignon P. Recurrent septic shock due to *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol. 1998. 36:2395-2395.
51. Talavera, M., Gottschalk, M. and Velázquez, V. Evaluación de la virulencia y serotipos de *Streptococcus suis* aislados de trabajadores de rastros del valle de Toluca, Estado de México, México. Vet. Méx. 2001. 32(3):201-205.
52. Shawna, D. Strains of *Streptococcus suis* with a diversity of serotypes share common protein antigens. AgriCarta. Veterinary Infectious Disease Organization 1997. www.aginfonet.com
53. Hommez, J., Devriese, L.E., Henrichsen, J. and Castryck, F. Identification and characterization of *Streptococcus suis*. Vet. Microbiol. 1986. 11:349–355.

54. Mittal, K.R., Higgins, R. and Larivier, S. J. Identification and serotyping of a *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. Clin. Microbiol. 1983. 18:1351-1354.
55. Charland, N., Kellens, J., Caya, F. and Gottschalk, M. Agglutination of *Streptococcus suis* by Sialic Acid Binding Lectins. J. Clin. Microbiol, 1995. 33:2220–2221.
56. Staats, J.J., Plattner, B.L., Nietfeld, J., Dritz, S. and Chengappa, M.M. Use of ribotyping and hemolysin activity to identify highly virulent *Streptococcus suis* type 2 isolates. J. Clin. Microbiol. 1998. 36:15-19.
57. Mogollón, J.D., Pijoan, C., Murtaugh, M.P.; Collins, J.E. and Cleary, P.P. "Identification of epidemic trains of *Streptococcus suis*", genomic fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 1991. 29:782-787.
58. Beaudoin, M., Harel, J., Higgins, R., Gottschalk, M., Frenette, M. and McInnes, J.I. Molecular analysis of isolates of *Streptococcus suis* capsular type 2 by restriction-
endonuclease-digested DNA separated on SDS-PAGE and by hybridization with an rDNA probe. J. Gen. Microbiol. 1992. 138:2639.
59. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970. 227:680-695
60. Sambrook, J. and Russel, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2001 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
61. Wisselink, H.J., Joosten, J.J. and Smith, H.E. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. J. Clin. Microbiol. 2002. 40:2922-2929.
62. Galván, P.E., Estudio de antígenos de *Streptococcus suis*. Tesis de maestría en ciencias de la producción y de la salud animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M. México, D.F. 2002. p.p. 30-42.
63. Tato, P., Flisser, A., Gavilanes, M and Molinari, J.I. Immunogenic complexes obtained from *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* Ty2 by the bacterial acetone powder method. Ann. Microbiol. 1987. 130:47-60.

64. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. 72:248-254.
65. del Campo Sepulveda, E. M., Altman, E., Kobisch, M., D'Allaire, S. and Gottschalk, M. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Vet. Microbiol.* 1996. 52:113–125.
66. Altman, D.A. *Practical statistics for medical research.* Chapman and Hall, London, England. pp. 455-460.
67. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. 76:4350–4354.
68. Quessy, S., Dubreuil, J.D. Caya, M. and Higgins, R. Discrimination of virulent and avirulent *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates from different geographical origins. *Infect. Immun.* 1995. 63:1975-1979.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA