



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

PROGRAMA DE POSGRADO EN  
CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL.

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.**

**“Aislamiento y caracterización de cepas de *Streptococcus suis* en granjas porcinas”**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

**QFB ARIANNA ROMERO FLORES.**

**TUTOR:**

**Dra. Susana E. Mendoza Elvira**

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC).  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).  
Estado de México.

**COMITÉ TUTOR:**

**M en C. Rosalba Carreón Nápoles**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ).  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).  
México D.F

**Dr. Rogelio Alonso Morales.**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ).  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).  
México D.F

**Dr. Marcelo Gottschalk Segura**

Facultad de Medicina Veterinaria.  
Universidad de Montreal.  
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la  
Producción y de la Salud Animal.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) et/and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Faculté de Médecine Vétérinaire; Université de Montréal. Québec Canada. Instituciones en las cuales este proyecto se desarrolló y en las cuales tuve la oportunidad de aprender mucho.

Dra. Susy Mendoza: Gracias por aceptarme como parte de su grupo de trabajo, por creer en mí y por todo su apoyo, es una gran tutora y un gran ser humano del cual aprendo todos los días, es un gran honor trabajar con usted.

Dr. Marcelo Gottschalk: Gracias por el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo y por recibirme en su laboratorio, aprendí muchas cosas y fue una gran experiencia que cambio mi panorama completamente.

A cada uno de los miembros del comité tutorial, por todo el apoyo brindado a lo largo de este proyecto.

M en C. Esperanza Galván: Del departamento de cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, por la donación de muestras que fueron imprescindibles para el desarrollo de este estudio, gracias por la cooperación y el entusiasmo.

Sonia Lacouture: Por todo el apoyo técnico durante mi estancia.

Dr. Víctor Quintero: Por el apoyo en la toma de muestras.

MVZ Juan Edgardo Camacho: Por el apoyo brindado en la toma de muestras.

M en C Ana E. Sánchez: Por el apoyo técnico brindado, mil gracias Anix.

M en C Sofía González Gallardo: Por toda la ayuda brindada.

Ing. Fernando Sotres: Gracias por enseñarnos tanto.

Al PAEP (Programa de apoyos económicos a los estudios de posgrado): Por el apoyo económico brindado para la estancia de investigación.

## AGRADECIMIENTOS

Dra Susy Mendoza: No tengo la manera de agradecer cada uno de los buenos gestos que tiene conmigo, gracias por apoyarme en muchos aspectos del día a día, es un gran ser humano y agradezco por haber llegado con usted.

Familia Romero Flores: Gracias por todo su apoyo y por enseñarme las bondades de la vida, por seguir unidos a pesar de todo, la vida ha sido generosa con nosotros y es algo que agradezco.

A mi mamá: Gracias por las lecciones de vida que me das, en realidad no sé que sería de mí sin ellas, gracias por tu apoyo.

Familia Vázquez Valadez: No tengo manera de externar todo mi aprecio y cariño para ustedes, son grandes seres humanos y soy muy afortunada por conocerlos, mil gracias por ser tan cálidos conmigo.

Familia Romero Martínez: Gracias por su compañía y apoyo son especiales para mí

Michael: Por pintar mi vida de colores y de alegrías mi corazón, mi chaparrito hermoso.

Hugo: Gracias por tu entusiasmo y por todo el apoyo brindado, realmente soy afortunada por contar con tu apoyo y compañía, en realidad no tengo manera de agradecer todo lo que haces por mí.

Al equipo del laboratorio 3 de virología de posgrado de la FESC.

pQFB Belem Montoya y pMVZ Omar Cuahutle: Gracias por el apoyo técnico durante parte de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 3 de posgrado: MVZ Juan Edgardo Camacho Medina, MVZ Lidia Serrano Jaimes, M en C Gabriela Vega, MVZ Rocío Lara, pQFB: Perla Xochitl, pMVZ Michelle Gracias porque con ustedes he pasado momentos muy amenos y también he aprendido muchas cosas.

Amigos los cuales no escribí sus nombres aquí ustedes saben que no tengo forma de externar todo lo que significan para mí.

En realidad le debo mucho a la vida y a Dios por poner a personas tan lindas a mi lado que confían en mí y que siempre me apoyan para poder cumplir con mis objetivos además de ser feliz con todos y cada uno de ustedes. Son muy especiales para mí y realmente mi vida no tendría la misma luz si alguno de uds no se hubiera cruzado en mi camino.

## JURARO DE EXAMEN

Presidente: Dr. Francisco Suárez Güemes

Profesor investigador.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ)  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).  
México D.F

Secretario: Dra. Susana E. Mendoza Elvira

Profesor Investigador

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC).  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).  
Estado de México.

Vocal: Dra. Clara Inés Álvarez Manrique

Profesor Investigador

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC).  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).  
Estado de México.

Suplente: Dr. Alfredo Sahagún Ruiz.

Profesor investigador.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FESC)  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).  
México D.F

Suplente: Dr. Victor Rubén Tenorio Gutiérrez

Investigador

CENID-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y  
Pecuarías (INIFAP).  
SAGARPA  
México D.F

TUTOR PRINCIPAL:

*Dra. Susana E. Mendoza Elvira.*

Virología y Microbiología de las enfermedades respiratorias del cerdo.  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC).  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).  
Estado de México.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

*Dr. Rogelio Alonso Morales.*

Departamento de Genética y Bioestadística. Genética Molecular.  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ).  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).  
México D.F

*M en C Rosalba Carreón Nápoles.*

Diagnóstico del área de virología del Departamento de Medicina y  
Zootecnia de cerdos.  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ).  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).  
México D.F

*Dr. Marcelo Gottschalk Segura.*

Enfermedades bacterianas del cerdo, con especialización en *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.  
Facultad de Medicina Veterinaria.  
Universidad de Montreal.  
Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP)  
et/and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP) Université de  
Montréal

PROFESOR INVITADO:

*Dr. Abel Ciprian Carrasco.*

Virología y Microbiología de las enfermedades respiratorias del cerdo.  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
Estado de México.

El presente trabajo fue realizado en:

Laboratorio 3 de Virología y Microbiología de las enfermedades Respiratorias del cerdo; en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM en colaboración y por medio de una estancia de investigación realizada en: Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) et/and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP) Université de Montréal, College of Veterinary Medicine/Faculté de Médecine Vétérinaire Quebec, Canada.

Número de becario CONACYT: 492133.

PAPIIT ITE218711-3 and CONS-23.

Apoyo PAEP: Programa de Apoyo Económico a los Estudios de Posgrado.

**INDICE:**

	<b>PAG</b>
Tablas y figuras.....	I
Lista de abreviaturas .....	II
Resumen.....	III
1.0 Introducción.....	1
1.1 Historia de <i>Streptococcus suis</i> .....	1
1.2 Etiología.....	2
1.3 Factores de virulencia.....	3
1.3.1 Colonización: adherencia e invasión de superficies epiteliales.....	4
1.3.2 Sobrevivencia en sangre y diseminación.....	6
1.3.3 Invasión al SNC y meningitis.....	7
1.4 Epidemiología.....	9
1.5 Patogenia.....	10
1.6 Virulencia.....	12
1.7 Diagnóstico.....	13
1.8 Tratamiento.....	16
2.0 Justificación.....	19
3.0 Hipótesis.....	20
4.0 Objetivos.....	20
5.0 Material y métodos.....	21
5.1 Diseño experimental.....	22
6.0 Resultados.....	31
7.0 Discusión.....	41
8.0 Conclusiones.....	47
9.0 Referencias consultadas.....	48



<b>TABLA</b>	<b>PAG.</b>
Tabla 1. Viabilidad de <i>Streptococcus suis</i> .....	10
Tabla 2. Anticuerpos para tipificación.....	15
Tabla 3. Serotipos incluidos en cada grupo de homología (HG).....	16
Tabla 4. Mezcla para PCR- <i>gdh</i> .....	25
Tabla 5. Condiciones para termociclador PCR- <i>gdh</i> .....	25
Tabla 6. Mezcla para Grouping-PCR.....	27
Tabla 7. Condiciones para termociclador Grouping-PCR.....	27
Tabla 8. Mezcla para Typing-PCR.....	28
Tabla 9. Condiciones para termociclador Typing-PCR.....	28
Tabla 10. Secuencia de los primer (5´ a 3´) Grouping-PCR y Typing-PCR.....	29
Tabla 11. Serotipos caracterizados en animales enfermos de granjas de la República Mexicana.....	36
<b>FIGURA</b>	<b>PAG.</b>
Fig. 1 Factores de virulencia.....	7
Fig. 2 Invasión al SNC.....	8
Fig. 3 Geles agarosa al 2 % PCR- <i>gdh</i> animales enfermos.....	31
Fig. 4 Gel agarosa 2 % Grouping-PCRanimales enfermos.....	32
Fig. 5 Gel agarosa 2 % Grouping-PCRanimales enfermos.....	33
Fig. 6 Gel agarosa 2 % Grouping-PCRanimales enfermos.....	34
Fig. 7 Gel agarosa 2 % Typing-PCRanimales enfermos.....	35
Fig. 8 Geles agarosa 2 % PCR- <i>gdh</i> animales sanos.....	37
Fig. 9 Geles agarosa 2 % PCR- <i>gdh</i> humanos.....	38
Fig. 10 Esquema de la tipificación de cepas ( <i>cps</i> ) usando una PCR multiplex de dos pasos.....	40

**LISTA DE ABREVIATURAS:**

AS: Agar Sangre.

BBB: Barrera Hematoencefálica.

BME: Células endoteliales microvasculares.

BHI: Infusión cerebro corazón.

pb: pares de bases.

CME: Componentes de la matriz extracelular.

CPEC: Células epiteliales del plexo coroideo.

CPS: Polisacárido capsular.

CSF: Fluido Cerebroespinal.

EE.UU: Estados Unidos de Norteamérica.

EF: Factor externo.

Fab: Fragmento que adhiere al antígeno.

GADPH: Deshidrogenasa gliceraldeído 3-fosfato.

GDH: Glutamato deshidrogenasa.

HCl: Ácido clorhídrico.

IgA: Inmunoglobulina A.

IgG: Inmunoglobulina G.

Kd: Kilodaltones.

MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio.

MRP: Proteína liberadora de muramidasa.

NaCl: Cloruro de Sodio.

PBMEC's: Células endoteliales microvasculares de cerebro porcino inmortalizadas.

PCR: Reacción en Cadena de la polimerasa.

SNC: Sistema nervioso central.

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .

VP: Vogues Proskauer.

ST: Serotipo.

**RESUMEN:**

*Streptococcus suis* (*S. suis*) es un importante patógeno de cerdos, se sabe que la mayoría de los cerdos son portadores de múltiples serotipos en su tracto respiratorio superior y es causante de meningitis, artritis y septicemia, afecta todos los niveles de la producción porcina, causando pérdidas económicas importantes. *S. suis* es un agente zoonótico que afecta a personas que trabajan estrechamente con los cerdos. Respecto al diagnóstico, en cerdos este es presuntivo y se apoya generalmente en los signos clínicos, la edad del animal, y en las lesiones macroscópicas; en humanos generalmente no se realiza de manera rutinaria Y el diagnóstico se realiza con pruebas bioquímicas para identificar a *S. suis*, seguido de la serotipificación para la caracterización de cepas. La desventaja del uso de estas técnicas es que son engañosas y la producción de antisueros es costosa y tediosa. En el presente trabajo se realizó la caracterización de cepas de *S. suis* utilizando biología molecular para lo cual se establecieron tres grupos; el primer grupo correspondió a cerdos sanos se analizaron 85 tonsilas, el siguiente grupo fue el de cerdos enfermos se analizaron 77 muestras diferentes, y en el tercer grupo se trabajaron 60 exudados faríngeos de humanos, las muestras provinieron de algunas granjas de México, se aislaron y purificaron cepas de *Streptococcus* que posteriormente fueron procesadas en una primer etapa por PCR-*gdh* para identificar a *S. suis*, muestras positivas en esta etapa fueron sometidas a una PCR-multiplex de dos pasos (*cps*-PCR) para determinar el serotipo, el primer paso fue Grouping-PCR y el segundo paso fue Typing-PCR. Se determinó que las muestras provenientes de los animales sanos y de humanos fueron negativas a *S. suis* por lo que no fue posible determinar animales portadores sanos ni la zoonosis, mientras que en el grupo de los animales enfermos se caracterizaron 6 cepas dos del serotipo 7, una del serotipo 3, dos del serotipo 2 aisladas de encéfalos y una del serotipo 1/2 aislada de pulmón. Determinando que, en algunas granjas de México hay presencia de *S. suis* el cual puede ser responsable de la muerte de algunos animales y utilizando por primera vez estas PCR's (PCR-*gdh* y *cps*-PCR) en México para caracterización de cepas de *S. suis*.

## **1.0 INTRODUCCION:**

### **1.1 HISTORIA:**

A partir de cerdos, los cuales presentaban septicemia entre 1956 y 1963 Moor aisló *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos, la caracterización fue por medio de pruebas bioquímicas y serológicas [De Moor, 1963]. En Inglaterra, Elliot en 1966 sugirió que el microorganismo de Moor era similar a un *Streptococcus* aislado por él y que ambos pertenecían al grupo D de Lancefield; él propuso el nombre de *Streptococcus suis* (*S. suis*) tipo capsular 1 [Elliott, 1966]. En 1975, Windsor y Elliot aislaron otro estreptococo porcino el cual fue nombrado *S. suis* tipo 2.

Entre 1983 y 1995 se describieron los 32 serotipos restantes [Straw, *et al.*, 1995]. La mayoría de estas cepas de referencia fueron obtenidas de cerdos enfermos; el tipo capsular 14 fue proveniente de un aislamiento humano, los tipos capsulares 17, 18, 19 y 21 fueron aislados de cerdos clínicamente sanos, los tipos capsulares 20 y 31 fueron obtenidos de terneros y el tipo 33 de un cordero enfermo [Higgins, *et al.*, 1989]. Durante los siguientes años, se describieron 26 nuevos tipos o serotipos capsulares, alcanzando un total de 35 en 1995 [Blast, 2013].

La determinación oficial de *S. suis* como una nueva especie bacteriana se realizó en el año de 1987 por Kilpper-Balzand Schleifer. Reportes iniciales de infecciones de *S. suis* fueron publicados por Jansen y Van Dorssen en Los Países Bajos en 1951 y por Field *et al.*, en 1954 en Inglaterra. Desde entonces, *S. suis* ha sido reportado en todos los países donde la industria porcina es importante y por más de una década, infecciones asociadas con este microorganismo fueron observadas en explotaciones porcinas intensivas tradicionales y modernas [Straw, *et al.*, 1995].

Actualmente son 35 serotipos los que se conocen de *S. suis*, considerándose el tipo 2 el predominante en todos los países [Higgins, *et al.*, 1999]. Se han realizado estudios en Japón y la prevalencia del serotipo 2 fue del 28% seguido del serotipo 7 que fue del 11%; en 1996 MacLennan reportó el primer aislamiento de *S. suis* en Reino Unido en donde predominó el serotipo 2 teniendo prevalencia del

62% y el 25% de los aislamientos correspondió al serotipo 14; estudios en Canadá demostraron la presencia del serotipo 2 en un 12% del total de las muestras tomadas de los cerdos enfermos [Higgins, *et al.*, 1999].

En la industria porcina *S. suis* se ha considerado uno de los mayores problemas en los últimos 15 años. A pesar de que es considerado como patógeno en cerdos, se ha aislado cada vez más a partir de una amplia gama de mamíferos y aves. Estos hallazgos sugieren la existencia de un complejo patrón epidemiológico de la infección, y en humanos las infecciones son esporádicas en las personas que trabajan con cerdos o productos derivados de los cerdos. El primer reporte de *S. suis* en humanos se realizó en Dinamarca en 1968 y se han documentado otros aislamientos en países de Europa, Asia, así como en algunos países de Norte y Sur América, Australia y Nueva Zelanda [Fittipaldi, *et al.*, 2012].

Sin embargo, el brote importante en China que ocurrió en 2005 y que afectó a más de 200 personas con una tasa de mortalidad de casi el 20% cambió la perspectiva de la amenaza de *S. suis* para la salud humana [Gottschalk, *et al.*, 2010], y se ha visto que este microorganismo es la primer causa de meningitis en adultos en Vietnam, el segundo en Tailandia y la tercer causa más común de meningitis bacteriana en Hong Kong [Fittipaldi, *et al.*, 2012]. Las infecciones ocurren principalmente en personas que trabajan con cerdos, constituyendo una enfermedad zoonótica. También se han reportado casos en los Países Bajos, Dinamarca, Italia, Alemania, Bélgica, Reino Unido, Francia, España, Suecia, Irlanda, Austria, Hungría, Hong Kong, Croacia, Japón, Singapur, Taiwán, Nueva Zelanda y Argentina. Sólo unos pocos casos han sido reportados en Canadá y ninguno en EE.UU. [Fittipaldi, *et al.*, 2012].

### **1.2 ETIOLOGIA:**

Se sabe que *S. suis* es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, que posee una cápsula con determinantes antigénicos que permite la identificación de los 35 serotipos, siendo el serotipo 2 el que se aísla mayormente en cuadros de meningitis, tanto en cerdos como en humanos; aunque algunas cepas aisladas de casos clínicos se han denominado como no tipificables, ya que no presentan estos

determinantes antigénicos (Polisacáridos de la cápsula). El serotipo 2 también es responsable de infecciones graves en los seres humanos, especialmente en las personas que están en contacto cercano con los cerdos o productos de carne de cerdo [Gottschalk, 2004]. Aislamientos de cepas reaccionantes con los antisueros tipo 1 y 2 fueron catalogados como tipo capsular 1/2. Se han descrito 35 serotipos diferentes basándose en los polisacáridos capsulares [Higgins, *et al.*, 1999], y con ayuda de las herramientas moleculares se han podido establecer con más precisión estos serotipos.

*S. suis* crece en agar sangre (A.S.) de cordero como pequeñas colonias α-hemolíticas en con un diámetro de 0,5-1 mm, grisáceas o transparentes y levemente mucoides; en la tinción de Gram se observan cocos que pueden aparecer aisladas, en pares y en cadenas cortas, es anaerobio facultativo, inmóvil, catalasa negativo, oxidasa negativo, presenta metabolismo fermentativo produciendo ácido a partir de algunos azúcares como el Manitol, Amilasa Positivo, VP negativo, NaCl positivo [MacFadín, 2000]; es resistente a optoquina. El genoma de *S. suis* contiene alrededor de 2'095.000 bp con un contenido de G + C de 41%, una región codificante del 86% y 2253 genes [Norton,*et al.*,1990]. Aunque las funciones del 20 al 30% de los genes son desconocidas, muchos genes que pueden jugar un papel en la patogénesis de la infección de *S. suis* han sido estudiados, incluyendo la producción de polisacárido, transporte capsular, factores de restricción de hierro, suilisina, proteínas asociadas a la virulencia, varias enzimas, sistema arginina desaminasa y proteínas de unión IgG [Fittipaldi, *et al.*, 2012; Higgins, *et al.*,1993].

### **1.3 FACTORES DE VIRULENCIA:**

La virulencia de *S. suis* difiere entre serotipos y entre las diferentes cepas del mismo serotipo. La mayoría de estudios sobre la virulencia de *S. suis* se han hecho con el serotipo 2. Varios factores de virulencia se han descrito, incluyendo la cápsula [Norton, *et al.*,1990], MRP (proteína liberada por la muramidasa) y EF (factor proteico extracelular), suilisina y adhesinas [Fittipaldi, *et al.*, 2012; Wisselink, *et al.*, 2000].

Muchos cerdos adquieren la infección de *S. suis* por ambas vías vertical y horizontal. Los animales generalmente portan al microorganismo en sus tonsilas y muchos de ellos no desarrollan la enfermedad (animales portadores). Inversamente algunos lechones pueden desarrollar eventualmente bacteremia, septicemia y/o meningitis debido a la diseminación de *S. suis* de tonsilas y/o otras superficies, comúnmente cuando los anticuerpos maternos decrecen. Más específicamente, para causar enfermedad la bacteria debe atravesar barreras epiteliales, ingresar y sobrevivir en sangre, invadir diferentes órganos y causar una inflamación exacerbada. En humanos se cree que la infección se adquiere por medio de heridas en la piel o por vía oral seguido de la colonización, invasión, bacteremia y septicemia con o sin meningitis, pero estos procesos dependerán de cada individuo y de la cepa de *S. suis* [Fittipaldi, *et al.*, 2012].

### **1.3.1 Colonización: adherencia e invasión de superficies epiteliales.**

El mecanismo temprano utilizado por *S. suis* para colonizar al hospedero es poco conocido, el patógeno puede sobrevivir en las tonsilas del cerdo por periodos prolongados. En cerdos el tejido linfoide tonsilar está recubierto por epitelio mucoso, particularmente el área de superficie palatina esta incrementada marcadamente por invaginaciones epiteliales profundas dentro del tejido linfoide formando numerosas criptas ramificadas. Es posible que después de la adhesión y la invasión de células epiteliales en las tonsilas, las bacterias permanezcan escondidas del sistema inmune. Sin embargo, aún es desconocido como *S. suis* permanece en las tonsilas del cerdo sin signos clínicos, pero puede cruzar la primer línea de defensa del hospedador para iniciar la enfermedad [Fittipaldi, *et al.*, 2012].

La hipótesis más aceptada es, que el patógeno alcanza el epitelio mucoso en el tracto respiratorio superior de los cerdos mientras que, en humanos, *S. suis* puede interactuar con células epiteliales ya sea en la superficie epidérmica o en el intestino (ruta oral de infección), aunque la adhesión bacteriana y la invasión de las células epiteliales no es necesariamente sinónimo de colonización, sin embargo están asociadas con los primeros pasos de la colonización por los

patógenos mucosales. Están disponibles muy pocos estudios en relación a la interacción entre *S. suis* y las células epiteliales, con excepción de las células epiteliales del plexo coroideo. Se ha reportado que las cepas virulentas de *S. suis* pueden adherirse a las células epiteliales del tracto respiratorio de los humanos [Fittipaldi, *et al.*, 2012].

Las adhesinas de *S. suis* están cubiertas por el Polisacárido Capsular (CPS), ya que mutantes de *S. suis* deficientes en CPS se adhieren mejor que la cepa capsulada a las líneas celulares porcinas, caninas y humanas. Bonifait, *et al.*, 2010 determinaron que *S. suis* tiene una baja regulación de la expresión de CPS durante las etapas tempranas de la infección en respuesta a señales del medio ambiente, resultando en una mejor interacción entre las adhesinas bacterianas y los receptores del hospedero, pero sugieren realizar más estudios al respecto [Bonifait, *et al.*, 2010]. La cápsula del *S. suis* tipo 2 está compuesta de ramnosa, galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico, éste último parece que aumenta su capacidad invasiva en el encéfalo. El ácido siálico puede también conferir protección frente a la ruta alterna del complemento y protege a la bacteria de la fagocitosis [Arends, y Zanen, 1988; Fittipaldi, *et al.*, 2012].

*S. suis* interactúa con los componentes de la matriz extracelular (CME) tal como la fibronectina y el plasminógeno, en estudios experimentales se determinó que la fibronectina se une a la proteína FBps y que en realidad esta unión entre ella no es requerida para la colonización de las tonsilas pero que puede jugar un papel en la colonización de órganos específicos involucrados en la infección de *S. suis*.

Las enolasas en la superficie de los patógenos bacterianos permiten la unión bacteriana al plasminógeno. La enolasa de *S. suis* se une no sólo al plasminógeno sino también a la fibronectina. Otras proteínas de *S. suis* han sido identificadas como adhesinas incluyendo a la GAPDH (deshidrogenasa gliceraldehído 3-fosfato) de 39 kd. La contribución de GAPDH a la virulencia de *S. suis* aún está por ser caracterizada, sin embargo, se ha reportado que *S. suis* incrementa la regulación de la expresión del gen que codifica esta proteína *in vivo* en diferentes órganos porcinos; además, GAPDH ha mostrado ser altamente inmunogénica en cerdos.

La invasión de las células epiteliales puede solo ser un paso adicional en la colonización, sin consecuencias adicionales, sin embargo, la invasión de células



epiteliales puede también representar el inicio de la diseminación y enfermedad sistémica. Por otra parte la invasión de las células epiteliales diferentes a CPEC (Células Epiteliales del Plexo Coroideo) por *S. suis* serotipo 2 es aún controversial. También es conocido que *S. suis* posee la hemolisina de 54 kd que es una toxina que actúa sobre el colesterol de la membrana de células eucariontes sin embargo las cepas que no producen suilisina son también capaces de alcanzar el grupo sanguíneo y diseminarse.

Por otro lado la inmunidad mediada por IgA juega un papel importante en la defensa contra los patógenos mucosales recurrentes; las bacterias productoras de IgA-proteasa pueden superar esta defensa por la limitación de la cantidad de IgA funcional. Se ha reportado recientemente que algunas cepas de *S. suis* producen una proteasa IgA1 capaz de romper eficientemente a la IgA humana. Por lo que, esta proteasa puede jugar un papel importante en la patogénesis.

*S. suis* puede colonizar tonsilas por un largo periodo de tiempo [Fittipaldi, *et al.*, 2012], muchos patógenos bacterianos utilizan una estrategia de biopelícula para sobrevivir a condiciones no favorables y Bonifait, *et al.*, 2010 demostraron que cepas de *S. suis* capaces de inducir la producción de biopelícula tienen una disminución de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de la capsula [Bonifait, *et al.*, 2010].

### **1.3.2 Sobrevivencia en sangre y diseminación:**

Como fue mencionado antes, la invasión celular puede ser considerada el primer paso del desarrollo de enfermedad sistémica. Se ha propuesto que *S. suis* puede llegar a la circulación sistémica primariamente a través de las tonsilas, después de la adhesión e invasión de células epiteliales. Una vez que *S. suis* alcanza tejidos profundos y/o torrente sanguíneo está sujeta a la acción de células fagocíticas del sistema inmune innato. Sin embargo en la ausencia de anticuerpos específicos *S. suis* es capaz de resistir la fagocitosis y persistir en la sangre a elevadas concentraciones con respuesta inflamatoria. La sobrevivencia bacteriana depende en gran medida de la producción CPS, ha sido ampliamente documentado que el CPS protege a *S. suis* de la fagocitosis de los neutrófilos y monocitos macrófagos (Fig. 1). El ácido siálico también está implicado en la

adherencia de *S. suis* para monocitos (evasión de fagocitosis) generando una hipótesis tipo “un caballo de Troya;” gracias a este sistema el patógeno puede viajar a través de la sangre asociado con las células fagocíticas (Fig. 1).

Se ha visto que las cepas que tienen suilisina parecen beneficiarse de los efectos tóxicos de esta hemolisina para los monocitos y neutrófilos. Por otra parte parece que la suilisina reduce la fagocitosis y la muerte de *S. suis* (Fig. 1). También es capaz de afectar el reclutamiento de neutrófilos por la degradación de IL-8, presuntamente por la producción de una serin-proteasa (Fig. 1). [Fittipaldi, *et al.*, 2012].

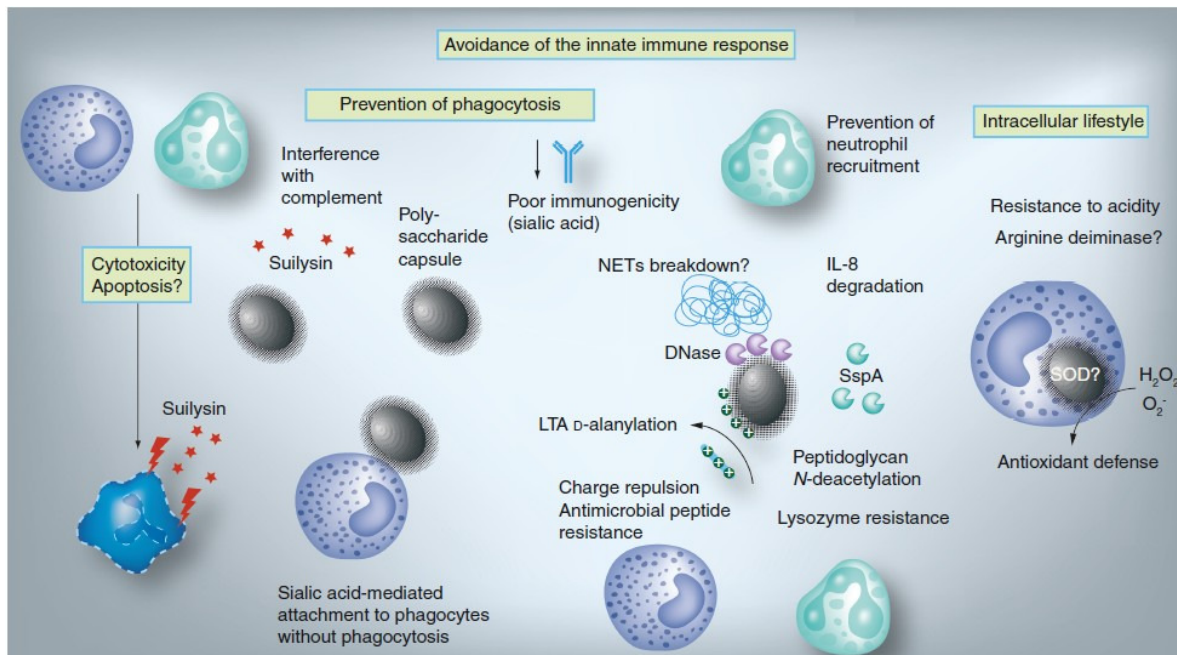


Fig. 1 Factores de virulencia de *S. suis* y la respuesta inmune en el hospedero. [Fittipaldi, *et al.*, 2012].

### **1.3.3 Invasión al SNC y meningitis:**

Si la muerte por sepsis o síndrome de shock tóxico no ocurre, pero el nivel de bacteremia sigue siendo alto, *S. suis* puede causar meningitis. En algunos casos la bacteremia puede ser inaparente y la meningitis puede presentarse repentinamente. Como otros patógenos de la sangre *S. suis* debe atravesar Barrera Hematoencefálica (BBB) y/o fluido cerebro espinal (CSF) para causar infección en SNC. La BBB es anatómicamente y funcionalmente una barrera que separa el cerebro del compartimento intravascular y mantiene la homeostasis del

SNC. El principal tipo de células presentes en la BBB son las células endoteliales microvasculares (BMEC). La adhesión, pero no la invasión, de células humanas de BMEC ha sido demostrada para *S. suis*; aunque los factores involucrados en la adhesión no han sido completamente elucidados. La participación del CPS es considerada poco probable. Vanier, *et al.*, 2007 reportaron la invasión primaria de BMEC porcinos. *S. suis* sobrevivió hasta 7 hrs en BMEC porcinos, esto es un hallazgo interesante ya que un elemento crucial para el desarrollo de la meningitis es la capacidad que tiene el patógeno para cruzar BBB (Fig. 2). Vanier, *et al.*, 2007 también observaron la invasión primaria de BMEC porcinas, lo que sugiere que los CPS de *S. suis* interfieren con la adhesión y la capacidad de invasión del patógeno ya que la cápsula no permite la interacción entre *S. suis* y la célula del hospedero. Se cree que muchos componentes del suero pueden tener participación en las interacciones entre *S. suis* y las BMECs, pero sólo la fibronectina ha demostrado un papel importante en esta interacción (Fig. 2). También se ha demostrado que la suilisina no es relevante para la invasión de BMEC porcinas. Otros estudios han demostrado que *S. suis* es capaz de inducir la secreción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas para BMEC humanos y porcinas; los componentes responsables de la respuesta inflamatoria exagerada no se conocen con precisión aún [Fittipaldi, *et al.*, 2012].

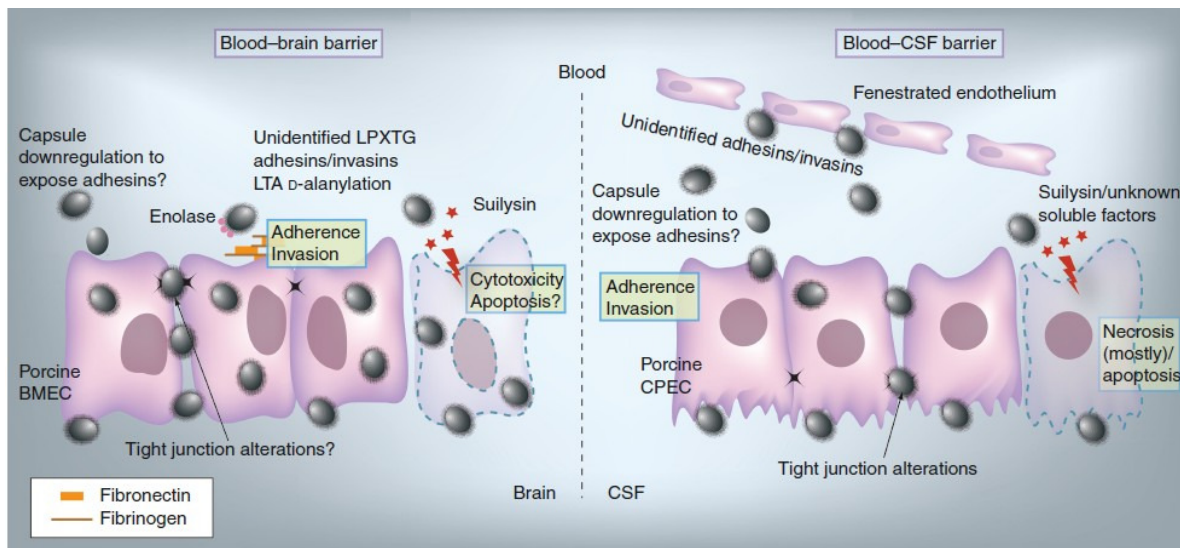


Fig. 2 Invasión al SNC. [Fittipaldi, *et al.*, 2012].

**1.4 EPIDEMIOLOGIA:**

El hospedero natural de *S. suis* es el cerdo; en este se puede aislar de tonsilas y cavidades nasales principalmente, así como en el tracto digestivo y genitales. Se han investigado diferentes mecanismos de transmisión de *S. suis*, aunque algunas características importantes dentro de la epidemiología de la infección siguen sin estar claras. Es bien sabido que la mayoría de los cerdos son portadores de múltiples serotipos y que el microorganismo está en el tracto respiratorio superior y que en las cerdas puede aislarse de sus secreciones vaginales. El no poder eliminar la infección en lechones destetados tempranamente y medicados han llevado a la hipótesis de que los animales son colonizados en una etapa temprana de su vida. *S. suis* puede afectar a prácticamente todas las fases de la producción del cerdo, aunque la susceptibilidad suele ir disminuyendo con el tiempo tras el destete. La mayoría de los procesos infecciosos por *S. suis* se producen después del destete, entre las 3 y las 12 semanas de vida, con una mayor incidencia alrededor de las 6-8 semanas [Gottschalk, 2012]. Aunque los primeros datos sugieren una falta de transmisión vertical, y que la contaminación de los lechones durante su tránsito a través del canal vaginal es posible, se ha propuesto que la cesárea es probablemente el único método que se puede utilizar para tener animales libres de *S. suis*, aunque esta posibilidad está lejos de que se pueda realizar. Los animales portadores asintomáticos por lo tanto representan una fuente potencial de infección para otros cerdos dentro de una explotación o para los seres humanos.

La situación puede ser más grave si los cerdos son criados bajo condiciones que causen estrés y por lo tanto una supresión inmune [Staats, *et al.*, 1997]. Además de la transmisión vertical, también se ha demostrado la transmisión aérea en una distancia de al menos 40 cm, sin contacto de nariz a nariz [Cloutier, *et al.*, 2003]. En la Tabla 1 se resume el trabajo realizado por Clifton-Hadley and MR y Enright., 1984 para evaluar la supervivencia de *S. suis*, bajo diferentes condiciones como lo fue: polvo, heces de cerdo, cadáveres en descomposición, agua y otros materiales que no contenían materia orgánica, el trabajo realizado únicamente se enfocó a la evaluación de la viabilidad de *S. suis* serotipo 2. [Clifton-Hadley, y Enright., 1984]:

Tabla 1. Viabilidad de *S. suis*. [Clifton-Hadley, y Enright, 1984].

MATERIAL	TEMPERATURA	VIABILIDAD
POLVO	0 °C	54 días
	9 °C	25 días
	22-25 °C	< 24 horas
HECES	0°C	104 días
	9°C	10 días
	22-25°C	8 días
CADÁVERES EN DESCOMPOSICIÓN	4 °C	6 semanas
	22-25 °C	12 días
AGUA	4 °C	1-2 semanas
CUALQUIER MATERIAL (SIN MATERIA ORGÁNICA)	desinfectantes Temperatura ambiente	< 1 minuto

En países como Hong Kong, Vietnam, China se ha estudiado *S. suis* y se ha determinado que es zoonótico se sabe que también puede transmitirse por medio de fómites o indirectamente por ejemplo aves, ratones o perros [Higgins, *et al.*, 1999].

### **1.5 PATOGENIA:**

Se conoce que la mayoría de los cerdos son portadores de múltiples serotipos en su tracto respiratorio superior [Monter, *et al.*, 1993; Higgins, *et al.*, 1999].

La infección producida por *S. suis* en cerdos produce neumonía, poliserositis, endocarditis, artritis y meningitis, principalmente en lechones desde las dos semanas de edad, pero es más común en cerdos recién destetados [Wissenlink, *et al.*, 2000]. En Hong Kong, Canadá, Holanda, Francia, Inglaterra, Nueva Zelanda, Bélgica y Alemania, es considerado como un importante agente zoonótico; se considera que los serotipos 2, 4, y 14 son los causantes de meningitis en humanos [Wissenlink, *et al.*, 2000; Trottier, *et al.*, 1991], sobre todo en granjeros,

carniceros, trabajadores de rastro, personal de industrias cárnicas y médicos veterinarios [Brenton, *et al.*, 1986], sin embargo, existen otros países donde no se ha notificado *S. suis* como agente zoonótico debido a que la enfermedad es subdiagnosticada o es confundida con otros agentes

*S. suis* puede penetrar en el organismo por vía cutánea a través de cortes y abrasiones, por vía oral y nasal, en cuyo caso accederá a las criptas de las tonsilas donde permanece viable durante periodos de tiempo prolongados. Los animales infectados pueden desarrollar la enfermedad de forma rápida o actuar como portadores tonsilares y desarrollar la enfermedad posteriormente (a medida que la inmunidad conferida por anticuerpos maternos disminuye), en general asociada a situaciones de estrés [Higgins, *et al.*, 1990].

*S. suis* coloniza las vías respiratorias altas del cerdo, considerándose que tras los primeros 5 días de vida del animal este hecho ya ha tenido lugar. La transmisión vertical de *S. suis* se ha demostrado por la determinación de los serotipos aislados tanto en la madre como en la camada. Fittipaldi, *et al.*, 1990 y Higgins, *et al.*, 2012 proponen que los pasos en la patogénesis son la entrada de la bacteria en sangre desde las tonsilas vía vasos sanguíneos o linfáticos eferentes, fagocitosis de la bacteria por monocitos circulantes, transporte de la bacteria al líquido cerebroespinal vía plexos coroideos y estimulación de la producción de citocinas por la línea monocitos/macrófagos que, en el caso de procesos meningíticos, conduce a un infiltrado inflamatorio y a una mayor permeabilidad que aumenta la presión intracraneal, dañando neuronas y contribuyendo a los signos de enfermedad nerviosa [Higgins, *et al.*, 1990; Fittipaldi, *et al.*, 2012].

La patogénesis de *S. suis* no está del todo clara aún. Una vez en el torrente sanguíneo, las bacterias son capaces de alcanzar el SNC. En efecto, *S. suis* se aísla con frecuencia del cerebro de los cerdos enfermos con signos clínicos de la meningitis [Vanier, *et al.*, 2007].

Las cepas virulentas del *S. suis* tipo 2 tienen la habilidad de pasar la barrera hematoencefálica y llegar al líquido cefalorraquídeo en macrófagos. Una de las rutas al cerebro y a las articulaciones puede ser el flujo sanguíneo; se ha

demostrado que en ausencia de opsoninas específicas, el *S. suis* tipo 2 puede ser fagocitado pero no destruido por los monocitos, los cuales migran a las superficies serosas, a las articulaciones y a través de los plexos coroideos para convertirse en macrófagos locales.

Una brecha crucial en el conocimiento es el mecanismo por el cual las bacterias entran en el sistema nervioso central. Recientemente, se ha demostrado la capacidad de *S. suis* serotipo 2 para unirse a y penetrar PBMECs (células endoteliales microvasculares de cerebro porcino inmortalizadas) y Tenenbaum, *et al.*, 2005 demostraron en un modelo *in vitro* que *S. suis* induce una pérdida de la función en la barrera sangre-fluido cerebroespinal. Por lo tanto, la identificación de los mecanismos utilizados por *S. suis* para ganar acceso en el SNC pueden tener un impacto significativo en la comprensión de la patogénesis de la meningitis causada por esta bacteria [Vanier, *et al.*, 2007].

Los factores de virulencia se han relacionado con constituyentes de la cápsula y pared celular y por la secreción de sustancias tóxicas [Blume, *et al.*, 2009]. Parece clara la relación de tres proteínas con la virulencia de las cepas de *S. suis* tipo 2 MRP (Proteína Liberadora de Muramidasa), EF (Factor Externo) y suilisina (hemolisina). En estudios realizados en España, han observado que el 36.5 % de las cepas de *S. suis* aisladas de casos clínicos tenían la capacidad para producir estas tres proteínas, perteneciendo el 80% de ellas al serotipo 2, lo que explicaría la mayor prevalencia de *S. suis* tipo 2 en los casos de meningitis estreptocócicas [Smith, *et al.*, 1997].

### **1.6 VIRULENCIA:**

El primer paso de *S. suis* en la colonización es la adhesión de la bacteria a células del tracto respiratorio del cerdo, de la misma manera que en humanos, se adhieren al epitelio del intestino, esto debido a las adhesinas (enolasas, GAPDH) que posee para posteriormente interactuar con los componentes de la matriz extracelular, este paso es relevante para que la bacteria pueda realizar la invasión de las células epiteliales; la sobrevivencia del microorganismo depende de CPS y del ácido siálico que posee para prevenir que sea fagocitada por los neutrófilos o macrófagos. En Asia *S. suis*, en periodos cortos de tiempo ha tenido una

progresión rápida en los pacientes enfermos ya que una vez que colonizó e invadió, estimula la secreción de citocinas pro-inflamatorias y de TNF- $\alpha$ , lo que conlleva a una inflamación exacerbada y que en algunos casos provoca un choque séptico. Los animales colonizados albergarán la bacteria en sus tonsilas; algunos animales sólo serán portadores sanos y nunca desarrollarán la enfermedad, mientras que otros presentarán bacteremia, algunas veces septicemia y finalmente meningitis. Por esto, en estos casos, la bacteria debería viajar a través del torrente sanguíneo y alcanzar el SNC [Gottschalk, y Segura, 2000].

Cuando *S. suis* coloniza SNC y se produce una meningitis, la muerte por sepsis o el choque tóxico no ocurre, la hipótesis más aceptada hasta el momento es que hay una baja regulación de la cápsula para exponer las adhesinas, estas se adhieren a las BMEC y la suilisina provoca la apoptosis de las células cerebrales el tráfico constante de bacterias y leucocitos genera la inflamación que se refleja en la meningitis (Fig. 2) [Fittipaldi, *et al.*, 2012].

### **1.7 DIAGNÓSTICO:**

El diagnóstico presuntivo de una infección por *S. suis* se basa generalmente en signos clínicos, edad de los animales y lesiones macroscópicas. La confirmación se logra mediante el aislamiento del agente infeccioso y observando lesiones microscópicas en tejidos afectados. También se utiliza la aglutinación con antisueros específicos para cada uno de los 35 serotipos, aunque puede haber reacciones cruzadas entre serotipos; por lo que las herramientas genéticas son de gran ayuda para diferenciar y caracterizar a *S. suis*, se ha hecho uso de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción), FD (Huella Dactilar Genómica), esta última ha permitido identificar y caracterizar cepas de *S. suis*, aislados en granjas provenientes de animales enfermos o sanos. Las técnicas moleculares actualmente sólo se utilizan solo con fines de investigación. [Straw, *et al.*, 1999].



La identificación de *S. suis* se realiza con métodos bacteriológicos y serotipificación con antisueros, estos métodos son muy laboriosos y los resultados pueden ser ambiguos o inconclusos. Así la detección y control de infecciones por *S. suis* depende de la disponibilidad, precisión y rapidez de estas pruebas de diagnóstico [Okwumaba, *et-al.*, 2003].

La identificación presuntiva basada en algunas pruebas bioquímicas (VP, y NaCl al 6.5%) pueden ser acertadas para casi todos los tipos capsulares de *S. suis* [*Streptococcus suis*. Retrato microbiológico. 2012]. Lo que se recomienda es que estas pruebas bioquímicas sean complementadas con una serotipificación confirmativa [Zigong, *et al.*, 2009]. La serotipificación es aún una parte importante del diagnóstico rutinario. Esta puede ser realizada mediante diferentes técnicas, pero muchos laboratorios han adoptado la técnica de coagulación. La serotipificación es un método basado en los antígenos polisacáridos capsulares es un procedimiento de detección e identificación de microorganismos basado en las características de las moléculas que se encuentran en la superficie de las bacterias. El inconveniente de la técnica de serotipificación es que las cepas que no están capsuladas no pueden identificarse ni caracterizarse con este método, a este tipo de cepas se les denomina cepas no tipificables. Para este tipo de cepas es muy útil el uso de técnicas moleculares como PCR [Zigong, *et al.*, 2009]. En la Tabla 2 se muestra como se prepara la mezcla de antisueros polivalentes obtenidos de conejos y el contenido de antisueros monovalentes por cada grupo para su preparación:

Tabla 2. Antisueros para serotipificación

Grupo	Mezcla de antisueros monovalentes
1	1, 2, 3, 4, 5, 6
2	7, 8, 9, 10, 11, 12
3	13, 14, 15, 16, 17, 18
4	20, 21, 22, 23, 24
5	25, 26, 27, 28
6	29, 30, 31, 32, 33, 34



Una vez determinado el grupo (1, 2, 3, 4, 5, ó 6) al que corresponde el aislado este se hace reaccionar con los antisueros monovalentes contenidos en ese grupo para que así finalmente se determiné el serotipo de la cepa. [Datos tomados de Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc et/and Centre de Reserche en Infectiologie Porcine 2013].

Okwumaba, *et al.*, 2003 clonaron el gen que codifica para la glutamato deshidrogenasa (*gdh*) de *S. suis* tipo 2, ellos observaron que como otras GDS's, el gen del *S. suis* es altamente conservado y tiene una tasa de mutación muy baja en relación con otros genes. Con ayuda de esta técnica a la que se le denominó PCR-*gdh* se puede identificar el *S. suis* aislado sin importar el serotipo, si es tipificable o no ni el origen geográfico por lo que se ha utilizado con fines epidemiológicos el producto de esta reacción es de 680 pb. durante los últimos años se ha utilizado como una técnica de diagnóstico rápida y confiable en muestras provenientes de animales sanos, enfermos y también es funcional para los casos en humanos; siendo una técnica atractiva para su uso en laboratorios clínicos y para estudios de epidemiología. La ventaja de esta técnica es que es rápida, sensible para caracterizar cepas *S. suis* sin importar si la cepas es tipificable o no [Okwumaba, *et al.*, 2003].

Debido a la complejidad para serotipificar las cepas de *S. suis* Okura, *et al.*, 2014 desarrollaron una PCR multiplex de dos pasos para caracterizar cepas *S. suis*;

secuenciaron y analizaron un grupo de genes de los 35 serotipos y reportaron que 31 serotipos (3 al 13 y 15 al 34) poseen genes específicos de cada serotipo y que los serotipos 1 y 14 y 2 y 1/2 fueron casi idénticos. La primer PCR (Grouping PCR) detecta genes conservados en múltiples serotipos y clasifica las cepas en siete grupos de genes *cps* a los cuales les denominaron grupo de homología (HG) de *S. suis* se han analizado con anterioridad indicando que, este grupo de genes *cps* están agrupados en el mismo locus del cromosoma. Se les ha asignado un número (I, II, III, IV, V, VI, VII) en esta etapa de la identificación se realizó la Grouping-PCR para poder asignar a que HG corresponde la cepa analizada; es importante aclarar que cada HG incluye serotipos específicos de *S. suis* se muestran en la tabla 3 por lo cual es necesario realizar la Typing-PCR para determinar el serotipo de la cepa. La segunda PCR (Typing PCR) detecto genes *cps* específicos para cada grupo e identifica el tipo *cps* de la cepa (Serotipo) [Okura, *et al.*, 2014].

Tabla 3. Serotipos incluidos en cada grupo de homología (HG) [Okura, *et al.*, 2014]

Grupo <i>cps</i>	I	II	III	IV	V	VI	VII
SEROTIPOS	3, 13, 18	1, 2, 1/2, 6, 14, 16, 27	21, 28, 29, 30	4, 5, 7, 17, 19, 23	8, 15, 20, 22, 25	9, 10, 11, 12, 24, 26, 33	31, 32, 34

### **1.8 TRATAMIENTO:**

Un gran número de antimicrobianos han sido utilizados en el control de este microorganismo en granjas de todo el mundo. En los últimos años se ha observado un incremento en la resistencia a los fármacos más comúnmente usados como los son los macrólidos y tetraciclinas. Esto ha hecho difícil poder instaurar una terapia antimicrobiana eficaz sin antes realizar la prueba de sensibilidad. El fenómeno de la resistencia a los antimicrobianos por parte de los agentes causales de enfermedades infecciosas en los animales incide

directamente en la salud humana ya que el uso indiscriminado está asociado con el desarrollo de la resistencia a los mismos y como consecuencia el tratamiento y control se hace complicado. [Aarestrup, *et al.*, 2008].

Baez, *et al* 2012 probaron algunos antibióticos *in vitro*: penicilina G 10UI; ampicilina/sulbactam (20ug); norfloxacin (10ug); gentamicina (10ug); eritromicina (15ug); oxitetraciclina (30ug); espectinomicina (10ug); cloranfenicol (30ug); cefalotina (30ug) y sulfametoxazol/trimetoprim (25ug). Y demostraron que el 68,75% de los *S. suis* aislados a partir de pulmones de cerdos con lesiones neumónicas mostraron resistencia entre un 25 y 90% para Penicilina, Norfloxacin, Cefalotina, Eritromicina, Oxitetraciclina, Spectomicina, Cloranfenicol. También se observaron valores de resistencia entre 1 y 24% para SAM (ampicillin/sulbactam), SXT (sulfametoxazol/trimetroprim) y no se encontró 100% de sensibilidad ante ninguno de los antimicrobianos evaluados. En general, los  $\beta$ -lactámicos mostraron eficacia *in vitro* frente a *S. suis*, incluso se describe que la resistencia a las penicilinas en cepas del mismo serotipo no es frecuente [Baez, *et al.*, 2010]. De acuerdo a estudios realizados por Baez, *et al.*, 2010 reportaron que el porcentaje de sensibilidad a la eritromicina *in vitro* fue de un 56,25 %, aunque Tarradas, *et al.*, y Martel, *et al.*, no recomiendan el uso de macrólidos en el tratamiento de este tipo de agente por los resultados obtenidos en sus investigaciones. Por otra parte esta familia de antibióticos parece inhibir la síntesis de polisacáridos y de esta manera, degradarían la protección de la superficie de formaciones de biopelículas. Estos antimicrobianos podrían tener un efecto inmunomodulador logrando impedir señales bacterianas [Aarestrup, *et al.*,2008].

El cloranfenicol, fármaco del grupo de los fenicoles tiene buena actividad frente a microorganismos Gram positivos, además es capaz de alcanzar concentraciones altas en líquido cefalorraquídeo, por lo que se usa en el tratamiento de meningitis asociada a cepas altamente virulentas del serotipo 2. El uso de los antibióticos es irremplazable en la terapéutica de las enfermedades producidas por *S. suis* y su forma de administración depende de la epidemiología de la infección. La variedad

de patrones de resistencia identificados, corroboran la emergencia de esta problemática, lo cual es de gran impacto para la salud animal y humana considerando el potencial zoonótico de esta entidad [Baez, *et al.*, 2012].

## 2.0 JUSTIFICACION:

Las infecciones causadas por *S. suis* particularmente en los últimos 15 años se consideran como uno de los problemas a nivel mundial de la industria porcina causando pérdidas por más de 300 millones de dólares anuales en Estados Unidos; el hospedero natural de *S. suis* es el cerdo en el cual se ha aislado del tracto respiratorio, especialmente las cavidades nasales y en las tonsilas. Las enfermedades que están asociadas en el cerdo con septicemia, meningitis, endocarditis, artritis y muerte súbita; además de que en los últimos años se han incrementado las especies mamíferas incluidos los humanos; el primer caso de infección por *S. suis* en humanos se dio a conocer en 1968 en Dinamarca; y desde entonces, un número cada vez mayor de casos han sido documentados; algunos de los síntomas que se presentan son: fiebre, náusea, vómitos, hemorragia subcutánea, septicemia, coma en casos severos, aunque el síntoma más frecuente es la meningitis que a menudo se complica con sordera y ataxia. La asociación más frecuente de infección está considerada con personas que trabajan manipulando cerdos. La situación actual en México es que no hay suficientes estudios del papel que juega el cerdo en la posible transmisión del *S. suis* al humano ni de la presencia de serotipos presentes en las granjas mexicanas. Por lo que el objetivo de este proyecto es tener una perspectiva de la presencia del *S. suis* a través del aislamiento y caracterización de cepas y de esta manera determinar si *S. suis* está implicado en casos clínicos tanto en humanos como animales. Se realizará una comparación de cepas aisladas en cerdos y humanos para contar con más información sobre la presencia y la variante de serotipos presentes en algunas granjas de la República Mexicana. Debido a la complejidad para realizar la caracterización de cepas de *S. suis* cuando se hace uso de las técnicas de bacteriología y serotipificación con antisueros, en el presente trabajo se realizó dicha caracterización utilizando biología molecular la cual consistió en utilizar en una primera etapa una PCR-*gdh* para determinar aislados positivos a *S. suis* seguida de una PCR multiplex (Método PCR-multiplex *cps*-typing) para determinar por medio de la Grouping PCR a cual de los siete grupos de homología (HG) correspondieron y finalmente con la Typing-PCR se determinó el serotipo de la cepa aislada.

### 3.0 HIPÓTESIS:

Se sabe que *S. suis* tiene 35 serotipos diferentes, siendo el hospedero natural el cerdo. Si se determina la presencia de *S. suis* en animales clínicamente sanos, enfermos y humanos, entonces se determinara la presencia de portadores sanos, así como la presencia de este patógeno en cerdos enfermos y la posible transmisión a humanos (zoonosis) en México.

### 4.0 OBJETIVOS:

#### GENERAL:

- Caracterizar cepas de *S. suis* provenientes de granjas porcinas con ayuda de técnicas bacteriológicas y PCR. Para determinar los serotipos presentes en estos lugares y saber si son los mismos que afectan a los cerdos y al personal que labora en estos lugares.

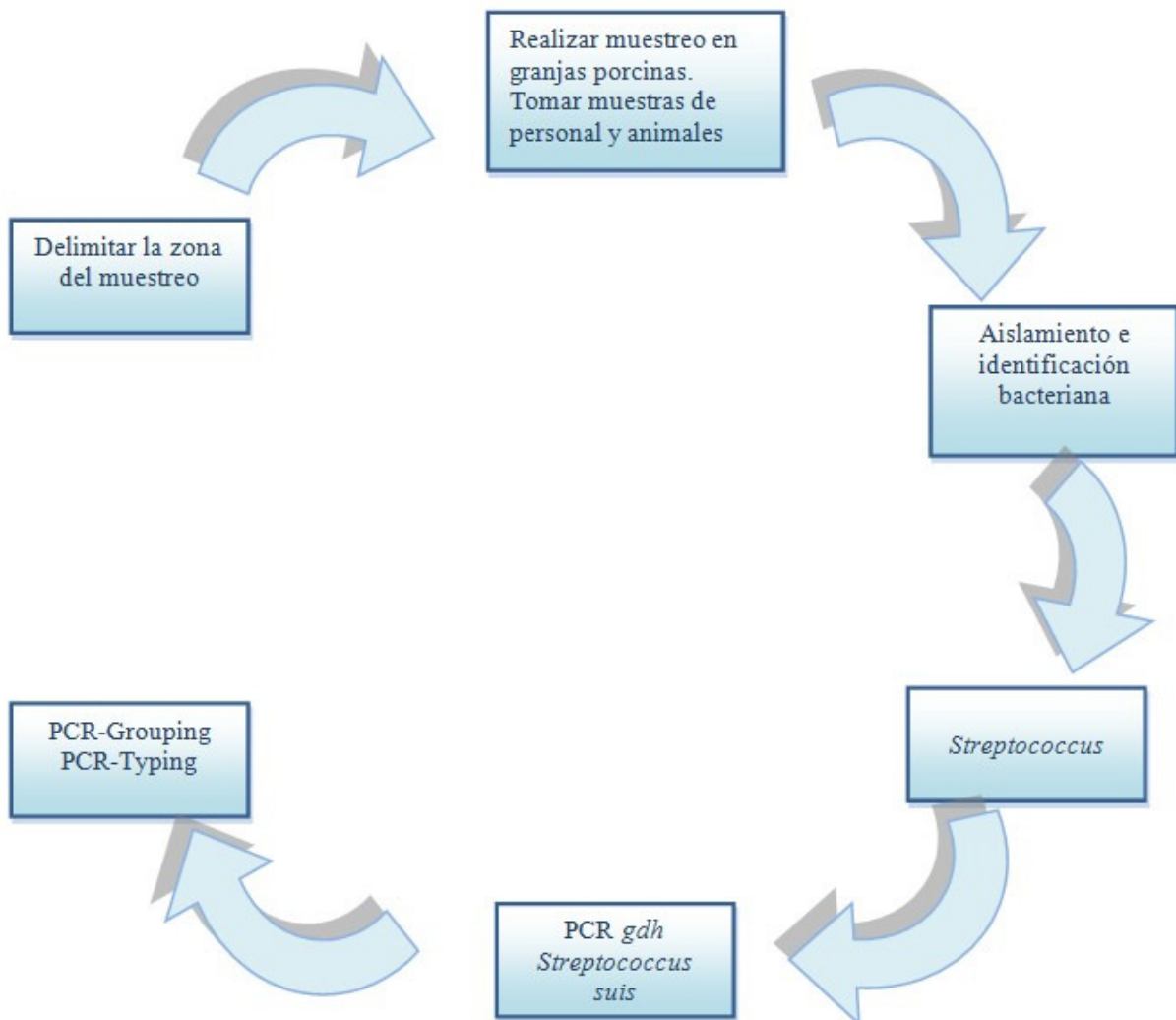
#### PARTICULARES:

- Llevar a cabo el aislamiento y la identificación bioquímica de *Streptococcus* aislados.
- Caracterizar las cepas de *S. suis* a través de PCR-*gdh* y PCR-multiplex y también con ayuda de antisueros específicos, para saber cuáles son los serotipos presentes en las granjas de México, tanto en animales como en el personal.

## **5.0 MATERIAL Y MÉTODOS:**

La metodología general utilizada se describe a continuación en el punto 5.1 en un diagrama, la metodología desglosada se presenta más adelante.

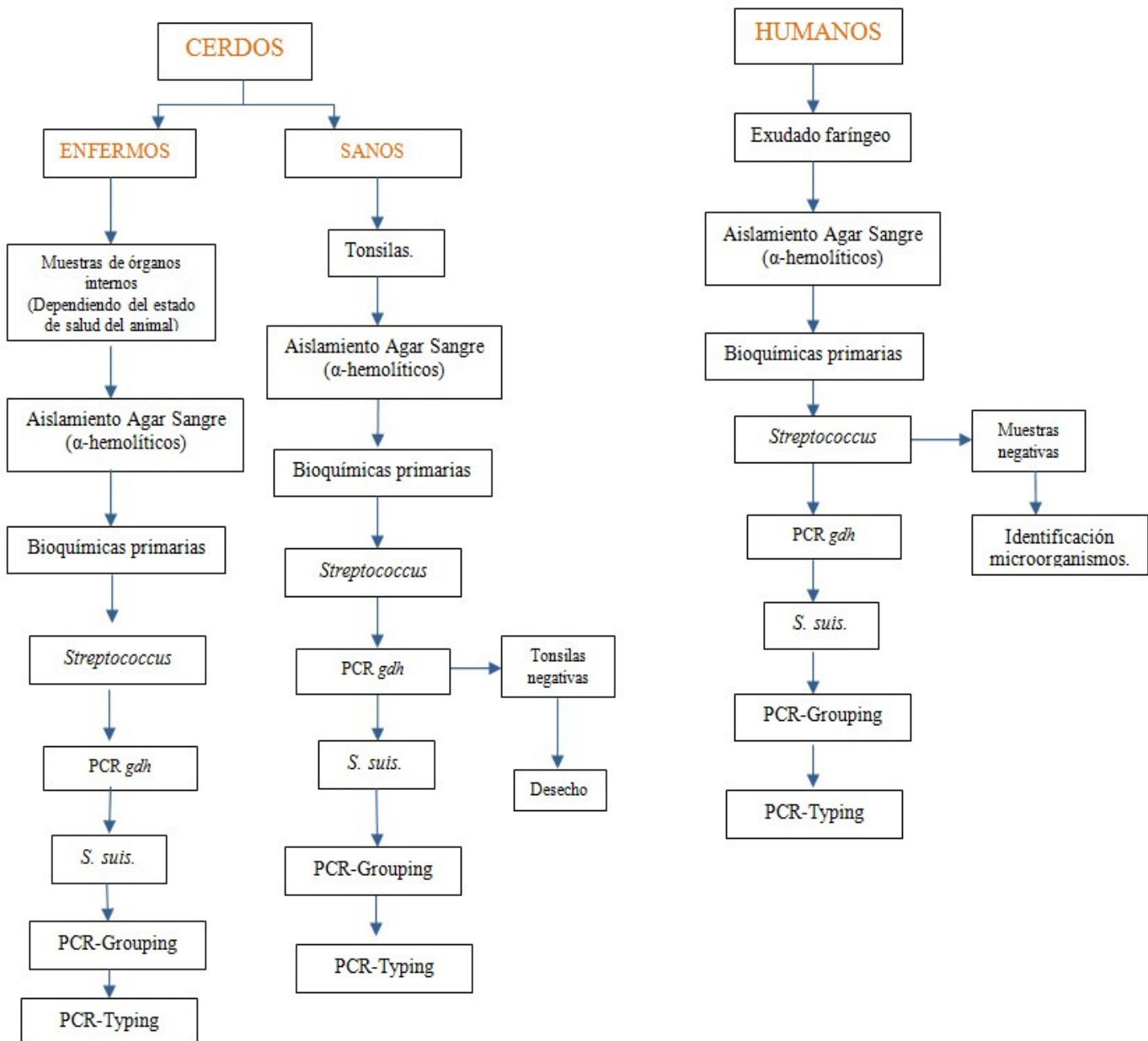
### **5.1 METODOLOGÍA GENERAL:**





## 5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL:

Se establecieron tres grupos, el primer grupo correspondió a muestras provenientes a cerdos enfermos, el segundo grupo a muestras provenientes de animales sanos y el tercer grupo a muestras de exudados faríngeos del personal que labora en granjas mexicanas, la metodología se describe en el diagrama de acuerdo a cada grupo.



### **5.3.- DELIMITACIÓN DE LA ZONA DEL MUESTREO:**

Las zonas donde se realizaron las tomas de muestras fueron:

▣ Granjas de estado de Guanajuato:

La Piedad Michoacán.

Abasolo (2 granjas).

Pénjamo (2 granjas).

▣ Granjas de Puebla:

Atlixco (1 granja).

▣ Granja del Estado de México:

Texcoco (1 granja).

▣ Granjas de Veracruz:

Pénjamo (1 granja)

El número de muestras en cada granja fue por oportunidad para cada grupo.

### **5.4 TOMA DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:**

#### **5.4.1. GRUPO DE LOS CERDOS SANOS:**

**5.4.1.1 Toma de muestra:** El total de muestras obtenidas en este grupo fue de 85 tonsilas.

- 1.- Selección de animales (aparentemente sanos).
- 2.-Se realizó necropsia a los animales para obtener las tonsilas de los mismos.
- 3.- Con la precaución de saber que no estaban enfermos.
- 4.-Una vez retiradas las tonsilas estas se colocaron en un contenedor limpio y se mantuvieron a 4 °C, en su estancia dentro de la zona del muestreo.
- 5.-Para su traslado se mantuvieron en hieleras
- 6.-Se procesaron en el laboratorio.

#### **5.4.2. GRUPO DE LOS CERDOS ENFERMOS:**

**5.4.2.1. Toma de muestra:** 77 muestras fueron analizadas en este grupo

- 1.- Selección de animales.
- 2.- La selección de animales se realizó de acuerdo al estado de salud que presentaban los animales.
- 3.-Las muestras trabajadas fueron: 26 de encéfalo, 12 de pulmón, 29 de corazón, 7 de tonsila, 2 de LCR y 1 de cerebro. Muestras de animales diferentes.
- 2.-Se realizó necropsia a los animales para obtener los órganos de los mismos.

3.-Una vez retirados los órganos estos se colocaron en un contenedor limpio y se mantuvieron a 4 °C, en su estancia dentro de la zona del muestreo.

4.-Se mantuvieron en hieleras para su traslado y posterior proceso en el laboratorio.

#### **5.4.3. GRUPO DE LOS HUMANOS:**

**5.4.3.1 Toma de exudados faríngeos.** Se tomaron 60 muestras a diferentes trabajadores

1.- Con ayuda de un hisopo de algodón se tomó la muestra de la faringe del paciente.

4.- Una vez obtenida la muestra se colocó el hisopo en medio de Transporte Stuart.

5.- Las muestras se refrigeraron a 4 °C hasta su traslado al laboratorio.

6.- El transporte de muestras se realizó en una hielera con refrigerantes.

#### **5.5 PROCESO DE LAS MUESTRAS:**

Las muestras provenientes de los cerdos se maceraron con PBS estéril; y al igual que los exudados faríngeos estos se sembraron en A. S (Agar Sangre) al 5 % se incubaron a 37 °C durante 24 hrs. Se seleccionaron las colonias  $\alpha$ -hemolíticas, cocos Gram positivos con agrupación en cadenas, catalasa negativo, oxidasa negativo. Se realizó la purificación de las colonias características en medio agar BHI. Se conservaron los microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus*. Posteriormente se realizó la PCR-*gdh* para *S. suis*; seguida de la Grouping-PCR; posteriormente se realizó una Typing-PCR para determinar a que serotipo correspondió cada aislado. Algunos de los aislados fueron sometidas también a una serotipificación con antisueros específicos para *S. suis*.

#### **NOTA:**

*Se realizó una estancia de investigación para poder llevar a cabo los procedimientos que a continuación se describen en: Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) et/and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Faculté de Médecine Vétérinaire; Université de*

Montréal. Québec Canada. Este laboratorio es de referencia internacional para *S. suis*.

**5. REACCION DE PCR PARA IDENTIFICAR *S. suis*:**

**5.6 Extracción del DNA:**

- 1.-Se utilizó un método basado en la lisis por ebullición.
- 2.-Se tomaron las colonias que provenían de BHI y se resuspendieron en 100 µL de agua gradoHPLC.
- 3.-Se calentó la suspensión a 100 °C durante 20 min. para lisar las células.
- 4.-Posteriormente se centrifugó a 13,000Xg durante 2 min.
- 5.-Se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio.
- 6.-Se tomó 1 µL y se colocó en un tubo limpio para PCR y se adicionaron 99 µL de agua libre de nucleasas.

**5.7 Reacción de amplificación (PCR-*gdh*):**

- 1.- El material se limpió con DNA Away. No. Catalogo: #7010 Reino Unido.
- 2.- Para la reacción de amplificación se requirió de un volumen total de 50 µL y se preparó como se describe en la Tabla 4:

Tabla 4. Mezcla para PCR *gdh*

<b>PCR <i>gdh</i></b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Vol (µL)</b>
<b>DNA/ H<sub>2</sub>O (-)</b>	1
<b>dNTP 2.5 mM</b>	8
<b>Buffer 10X</b>	5
<b>Primer JP4</b>	2
<b>Primer JP5</b>	2
<b>10X Coral Load Concentrado</b>	5
<b>Taq (5U/µL)</b>	0.25
<b>H<sub>2</sub>O libre de nucleasas</b>	26.75
<b>Vol. Total</b>	50

- 4.-Las condiciones para el termociclador se describen en la Tabla 5:

Tabla 5. Condiciones del termociclador para PCR *gdh*.

<b>5 MIN</b>	<b>94°C</b>	
<b>1 MIN</b>	94°C	} 35 Ciclos
<b>1 MIN</b>	55°C	
<b>1 MIN</b>	72°C	
<b>7 MIN</b>	72°C	

5.- Se utilizó un termociclador Biometra, modelo T-Gradient Thermoblock SER-087.

6.- Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (100 V, 40 min) teñidos con bromuro de etidio y fueron fotografiados.

La secuencia de los primer es JP4 (5´ GCAGCGTATTCTGTCAAACG 3´) y JP5 (5´CCATGGACAGATAAAGATGG 3´) No. de referencia GenBank AF229683.1

### 5.8 Método PCR-multiplex *cps-typing*

Con este método de PCR, las cepas aisladas de *S. suis* pueden ser clasificadas a través de dos pasos, el primer paso es Grouping-PCR y el segundo paso es Typing-PCR. En la Tabla 8 se muestran las secuencias de los iniciadores utilizados para Grouping PCR y Typing PCR y los tamaños en pb para cada producto.

#### 5.8.1 Grouping-PCR:

1.- Limpiar el material con DNA Away. No. Catalogo: #7010 Reino Unido.

2.- Se preparó la mezcla de los iniciadores correspondientes a cada uno de los grupos (16 iniciadores), esto fue para determinar a que grupo pertenecía cada una de las cepas.

3.- Posteriormente se preparó la mezcla de reacción para Grouping-PCR la preparación se muestra en la Tabla 6, el volumen total de la reacción fue de 10 µl y se utilizó un kit Qiagen multiplex master mix el cual contiene:

Taq DNA Polimerasa, buffer multiplex PCR, mezcla de dNTP's, MgCl<sub>2</sub>, agua libre de nucleasas.

Tabla 6. Mezcla para Grouping-PCR

**GROUPING-PCR**

Reactivo	Vol (μL)
DNA/ H <sub>2</sub> O (-)	3
2X Qiagen multiplex master mix	5
PCR Primer mix	2
<b>Vol. Total</b>	10

4.-Las condiciones para realizar la Grouping-PCR se describen en la Tabla 7:

Tabla 7. Condiciones del termociclador para Grouping-PCR

<b>15 MIN</b>	<b>95°C</b>	
<b>30 SEG</b>	94 °C	} 30 Ciclos
<b>90 SEG</b>	60 °C	
<b>90 SEG</b>	72 °C	
<b>10 MIN</b>	72°C	

5.- Se utilizó un termociclador Biometra, modelo T-Gradient Thermoblock SER-087.

6.-Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (100 V, 40 min) teñidos con bromuro de etidio y fueron fotografiados.

### 5.8.2 Typing-PCR:

1.-El material se limpió con DNA Away No. Catalogo: #7010 Reino Unido.

2.- Posteriormente se preparó la mezcla de los iniciadores correspondientes de acuerdo al grupo correspondiente (I al VII), esta PCR es para determinar el tipo (Serotipo) de *S. suis*.

3.- Posteriormente se preparó la mezcla de reacción para Typing-PCR (tabla 8):

Tabla 8. Mezcla para Typing-PCR

<b>TYPING-PCR</b>	
Reactivo	Vol (μL)
DNA/ H <sub>2</sub> O (-)	3
2X Qiagen multiplex master mix	5
PCR Master Primer mix	2
<b>Vol. Total</b>	10

5.-Las condiciones para realizar la Typing-PCR se describen en la Tabla 9:

Tabla 9. Condiciones del termociclador para Typing-PCR

<b>15 MIN</b>	<b>95°C</b>	
<b>30 SEG</b>	94 °C	} 30 Ciclos
<b>90 SEG</b>	58 °C	
<b>90 SEG</b>	72 °C	
<b>10 MIN</b>	72°C	

6.- Se utilizó un termociclador Biometra, modelo T-Gradient Thermoblock SER-087.

7.- Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (100 V, 40 min) teñidos con bromuro de etidio y fueron fotografiados.

### 5.9 SEROTIPIFICACIÓN:

Una vez que las muestras fueron sometidas a PCR-*gdh* y PCR multiplex, solo aquellas que correspondieron a los serotipos 1, 14 y 2, 1/2 se les realizó la reacción de aglutinación

1.- Se tomó un inóculo abundante de un cultivo puro de *S. suis* proveniente de agar BHI y se colocó en una mezcla de PBS con formol al 0.5 %.

2.- Se tomaron 200 μL del antisuero monovalente y se colocaron en una placa de vidrio posteriormente se agregaron 200 μL de la suspensión de *S. suis*, se mezcló con un palillo de madera.

3.- La placa se colocó en agitación durante 60 segundos y se observó con que antisuero monovalente hubo reacción.

NOTA: Para el control negativo utilizó una mezcla de PBS con formol al 0.5 %. Los antisueros son obtenidos de conejos.

Tabla 10. Secuencia de los iniciadores (5' a 3') para Grouping PCR y Typing PCR

Secuencia de iniciadores (5' a 3') para Grouping PCR y Typing PCR			
Para Grouping PCR	FRONTAL	REVERSO	TAMAÑO (pb) DE LOS PRODUCTOS
	<b>I</b>	TGGTTCAAATATCAATGCTC	
<b>II</b>	TCAAATACGCACCTAAGGC	CACTCACCTGCCCAAGAC	823
<b>III</b>	TGATTTGGGTGAGACCATG	CTCATGCTGGATAACACGT	583
<b>IV</b>	ACAGTCGGTCAAGATAATCG	TCAGCTTGGGTAATATCTGG	455
<b>V</b>	GGAAAGATGGAGGACCAGC	CCAACCAGACTCATATCCCC	265
<b>III y VI</b>	GATGCCCAAGCGATATGCC	GGACCAACAATGGCCATCTC	146
	GACGCACCAAGTGATATGCC	GGTCCGACAATAGCCATTTTC	
Para Typing PCR	FRONTAL	REVERSO	TAMAÑO (pb) DE LOS PRODUCTOS
<b>GRUPO I</b>			
<b>3</b>	GGTTTTGATTGGTCTAGTTG	CTCTAAAGCTCGATATCTAC	214
<b>13</b>	TATGGTTAAAGGTGGAAGCTG	CCTTGTATATATTCCTCCA	408
<b>18</b>	TAATGGGATAGTTGCGTTAC	ATACATAAAGTTGTCCTGCG	617
<b>GRUPO II</b>			
<b>2 Y 1/2</b>	TTAGCAACGTTGCCAATAAG	AATCCTCCATTAAAACCCTG	173
<b>6</b>	GCTCACTATTTTACATTACAC	TATTACTCCGCCAAATACAG	278
<b>1 y 14</b>	TTAGACAGACACCTTATAGG	CTAGCTTCGTTACTTGATTC	386
<b>16</b>	AAGGTTATCCACGAAAGATG	TCCGGCAATATTCTTTCAAG	494
<b>27</b>	AGACACTGCTTGCAATTATTG	TCAGAATTAATTCCTGTTGC	655
<b>GRUPO III</b>			
<b>21</b>	TATCATATTGAGAATCTTCCC	TTGCGTAGCATACAAAGTTC	160
<b>28</b>	ATTATGTTGGTTGCAGAAGG	CGACTCAATTGTTGTAGTAG	272
<b>29</b>	TTCTGGGATTTTAGGAATGC	CATGAAATACGCACTTGATC	415
<b>30</b>	TATTGCACTAGCTTCAGAAC	TGCATCCATAGTTGTATTCG	568



	FRONTAL	REVERSO	TAMAÑO (pb) DE LOS PRODUCTOS
<b>GRUPO IV</b>			
<b>4</b>	GACTATCTGTATACCCAAAC	TCCTTCCAAGTATTCTCTAG	903
<b>5</b>	ATCTTAGGAATGATTCGGAC	ACCAGATATCTGAGCAAATG	720
<b>7</b>	AACTACCTACCTGAACTTTG	AGTCTAAAAGTGATCGAGTC	566
<b>17</b>	TAGCATCAGTTTATACGAGG	TAGTTTATCTGTGACACACC	455
<b>19</b>	GTGTCGCAAATCAAGTATTG	AAGCTAGTACAACAAGCATG	348
<b>23</b>	TAATGTATGCTCTGTCACTG	AACGAAACGGAATAGTTTGC	221
<b>GRUPO V</b>			
<b>8</b>	AAATAAGGTAGGAGCTACTC	ATCCAACCTTAGCTTTCTGT	446
<b>15</b>	ATCGTTTTGAGATTGAGTGG	TAAACGGATTCGGTTACTCA	542
<b>20</b>	TGTGGATTTCTGGGATAATC	TGTGGACGAATTACTACTTG	698
<b>22</b>	GCATTATCAGGATTCTTTCC	CCAATTGGGTGTTCAAAAAG	296
<b>25</b>	GTTTGCTCCGATCATAATAG	CCAGTAAAAGGACTCAATAC	174
<b>GRUPO VI</b>			
<b>9</b>	GAAAGTAGGTATATCTCAGC	GGGCTATTA AAACTCCTATC	368
<b>10</b>	TTTCCATTTGCTTATGGAC	GGAATAAAAACGATTGGGAG	633
<b>11</b>	ATGCGATTGCAACAATTGAC	AGGCATGAGTAATACATAGG	833
<b>12</b>	AACAGGTATTT CAGGATTGC	CTCGGATAAAGATAATCAGC	131
<b>24</b>	TACTGAGATTTATTGGGACG	AAGCGATTGGATTACATTGC	224
<b>26</b>	TTATACCGAAATTTGTTGCC	CGTCAATCATATAAAGTGGG	472
<b>33</b>	GATGTTTTCAACAGGTGTAC	CAAAGTACCTATTTTCAGCG	710
<b>GRUPO VII</b>			
<b>31</b>	ACAATCGTTTCTGCAATACG	GATGAAAACATCGTTGGTAG	842
<b>32</b>	AACCGCTGTTGAATTAAGAG	TTCGTTAGTTGAACTGTTCC	570
<b>34</b>	AAGTTTCATTCGAGGACTTC	GTATATAACACCGCAAGAAG	246
<b>CONTROL INTERNO PARA TODAS LAS PCR</b>			
<b>16S rRNA</b>	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	1542-1553

## 6.0 RESULTADOS:

### 6.1 GRUPO DE LOS ANIMALES ENFERMOS (Órganos diversos):

En este grupo fueron analizadas 77 muestras de órganos diferentes, provenientes de animales enfermos, 26 de encéfalo, 29 de pulmón, 12 de corazón, 7 de tonsila, 2 de LCR y 1 de cerebro y de las cuales en 39 muestras se aislaron *Streptococcus* provenientes 15 de encéfalo, 15 de pulmón, 7 de corazón y 2 de tonsila, la morfología macroscópica en A. S. de bovino al 5 %: fue colonias  $\alpha$ -hemolíticas, redondas, pequeñas con borde completo, color blanco a grisáceo y que al realizar la tinción de Gram estos se observaron como cocos Gram (+) agrupados en cadenas o pequeñas cadenas; catalasa negativo, oxidasa negativo.

Los resultados obtenidos en la PCR-*gdh* se observan en la Fig. 3, obteniéndose que de las 39 muestras positivas a *Streptococcus*, seis muestras resultaron positivas a *S. suis*.

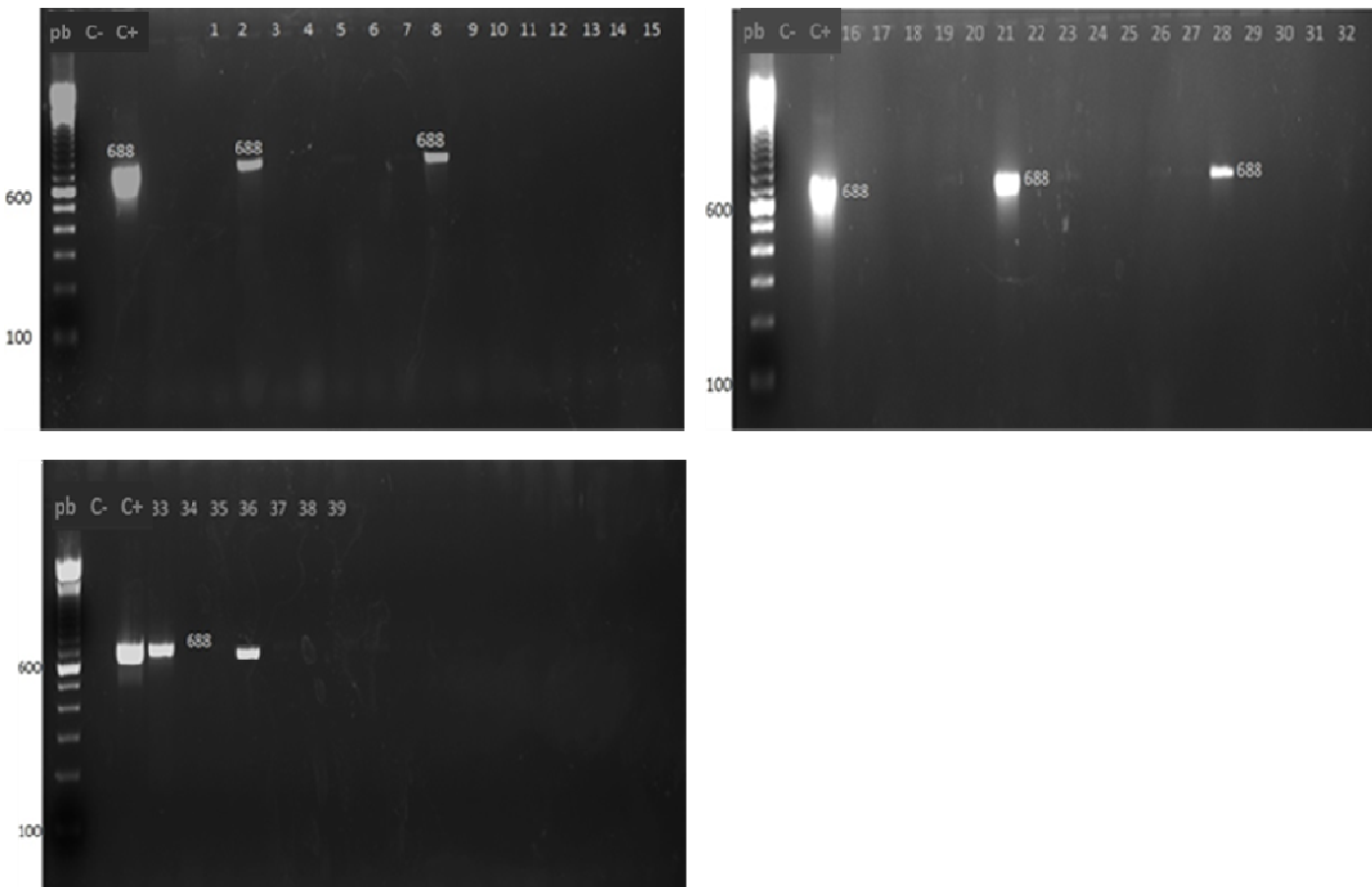


Fig. 3 Geles de agarosa al 2 % PCR-*gdh* animales enfermos. En el primer carril se observa el marcador de peso en pb, el segundo carril (C -), tercer carril (C+) correspondiente a *S. suis* serotipo 2, del 1 al 39 corresponde a las muestras de animales enfermos; los números 2, 8, 21, 28, 33 y 36 muestras positivas a *S. suis* el tamaño del producto amplificado fue de 688 pb. Y los carriles 1, 3 al 7, del 9 al 15, del 16 al 20, del 22 al 27, del 29 al 32, 34, 35 y del 37 al 39 correspondieron a muestras negativas de *S. suis* provenientes de animales enfermos.

Posteriormente a las muestras positivas se les realizó la Grouping-PCR los resultados obtenidos se describen en las Fig. 4, Fig. 5 y Fig. 6 con sus respectivos grupos.

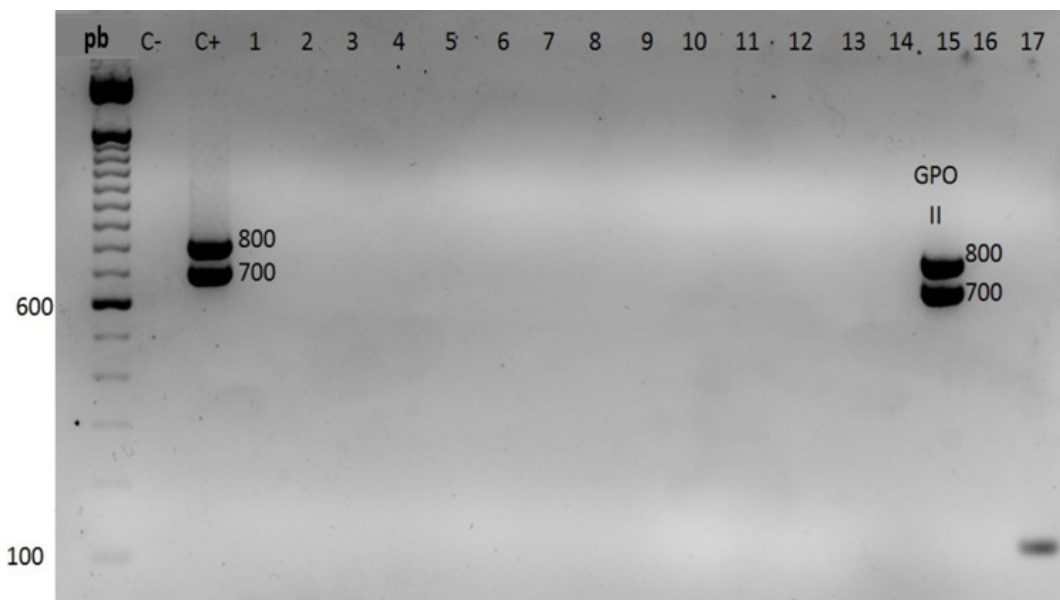


Fig. 4 Gel de agarosa al 2 % Grouping-PCR. El carril uno contiene el Marcador en pares de bases (pb), en el carril dos el control negativo (C-) en el carril tres el control positivo (C+) correspondiente al *S. suis* serotipo 2. Los carriles del 1 al 14, 16 y 17 no contienen muestra, el carril número 15 se observa una muestra positiva correspondiente al grupo II.

La muestra positiva correspondió al Grupo II, el patrón de bandas para este grupo es: la banda de 823y 714 pb característica de este grupo. Para el control interno la banda correspondiente es de 714 pb. A esta muestra se le realizó la

Typing-PCR, los serotipos que se agrupan en este grupo son: 1, 2, 1/2, 6, 14, 16 y 27 (Ver figura 10).

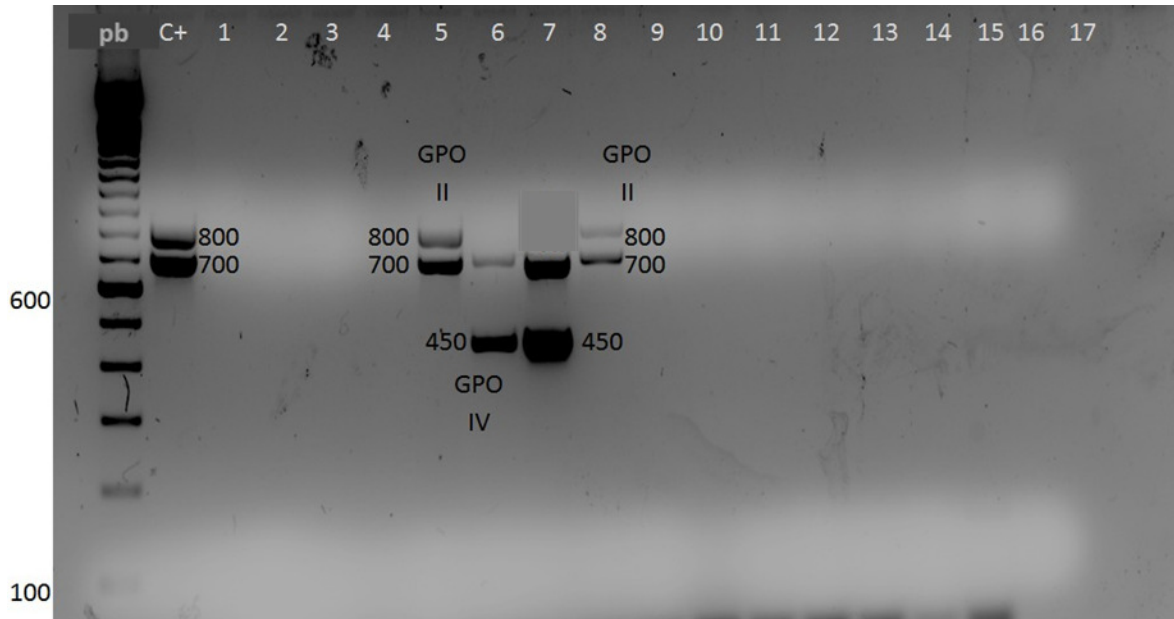


Fig. 5 Gel de agarosa al 2 % Grouping-PCR animales enfermos. El carril uno corresponde al marcador en pb, el segundo carril contiene *S. suis* serotipo 2 como (C+) y en los carriles cinco y ocho ambas muestras que correspondieron al grupo II, en el carril 6 se observa una muestra que correspondió al grupo IV, los carriles del 1 al 4 y del 9 al 17 no contenían muestra.

Para el grupo II el tamaño de las bandas que se observan son de 700 y la banda de 823 pb característica de este grupo, y se observan bandas con tamaño de 700 y 450 pb para el grupo. Para el control interno la banda correspondiente es de 714 pb la cual aparece en los carriles del C+ y muestras del 5 al 8. Considerando el mismo criterio que en el gel anterior, en el grupo II la presencia de las dos bandas deben de tener un tamaño de: 823 y 717 pb., los serotipos que se agrupan en este grupo son: 1, 2, 1/2, 6, 14, 16 y 27. Con respecto a los tamaños de los productos observados en el carril con el número 6, el tamaño de los productos es de 714 y 455 pb lo cual corresponde al grupo IV ya que el patrón de

bandas que se debe de observar es, de: 714 y 455 pb respectivamente; en este grupo se agrupan los serotipos 4, 5, 7, 17, 19 y 23 (Ver figura 10).

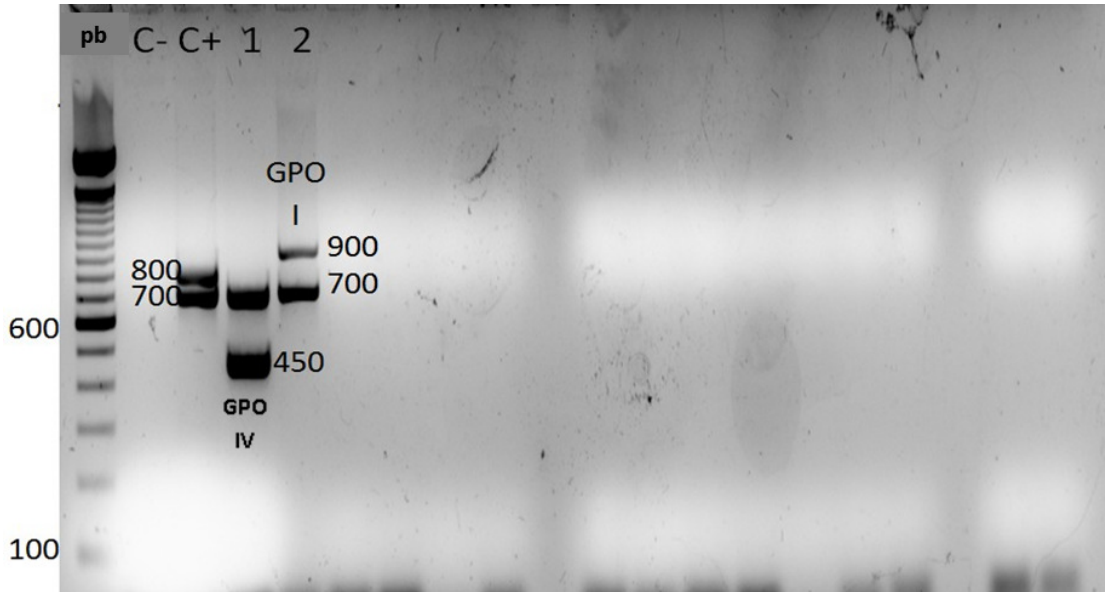


Fig. 6 Gel de agarosa al 2 % Grouping-PCR animales enfermos. El primer carril correspondió al marcado de peso en pb, el segundo carril (C-), el tercer carril contiene *S. suis* serotipo 2 como (C+) en el carril 1 la muestra correspondió al Grupo IV, y la muestra del carril 2 al grupo I. El resto de los carriles no contenía muestra. Para el control interno la banda correspondiente es de 714 pba cual aparece en los carriles del C+ y muestras en los carriles 1 y 2.

El tamaño de estos productos es de 933 y 714 pb para el grupo I y los serotipos que se agrupan en este grupo son: 3, 13 y 18, para el grupo IV el tamaño de los productos es de 714 y 455 pb y los serotipos que se agrupan son 4, 5, 7, 17, 19 y 23 (Ver figura 10).

#### Typing-PCR:

En esta Typing-PCR se determinó finalmente el serotipo al que correspondía cada una de las cepas positivas a *S. suis* aisladas de animales enfermos. Considerando el grupo al cual pertenecieron con anterioridad. Los resultados se muestran a continuación en la Fig. 7.

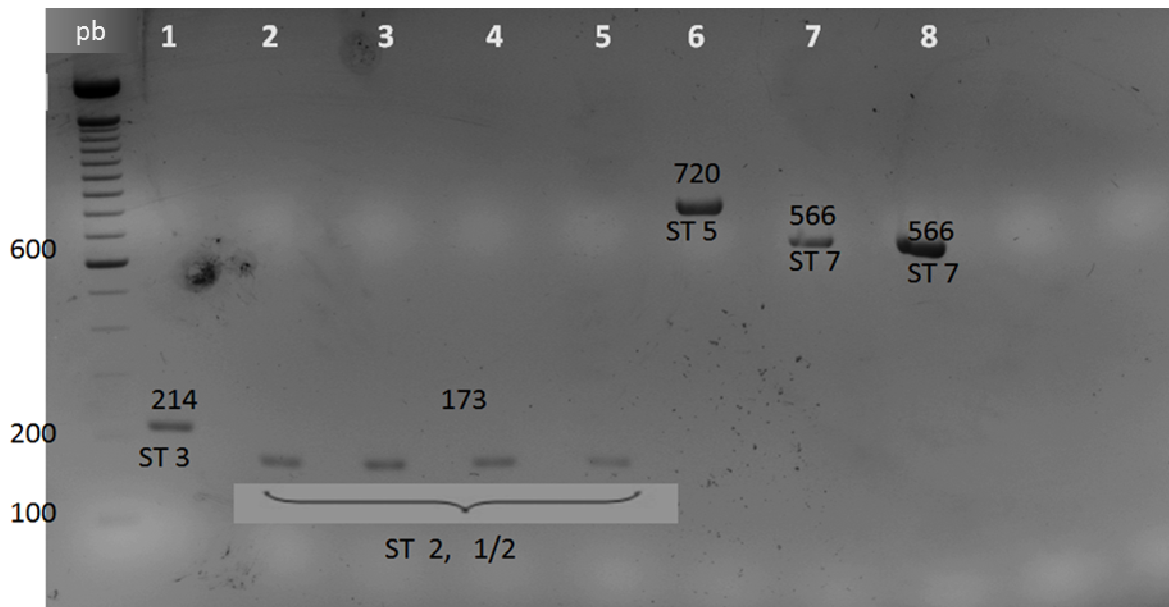


Fig. 7 Gel de agarosa al 2 % Typing-PCR animales enfermos. El primer carril contiene el marcador de pb, el carril 1 correspondió a *S. suis* serotipo 3, del carril 2 al 5 ST 2 y 1/2, carril 6 corresponde a un aislado que correspondió al ST 5, los carriles 7 y 8 correspondieron al ST 7.

De las seis muestras positivas se obtuvo que: una muestra corresponde al ST 3 con un tamaño de producto de 200 pb, dos muestras correspondieron al ST 7 el tamaño es de 500 pb, para el ST 5 el tamaño de producto es de 720 pb y tres de las muestras correspondieron a los ST 2 o 1/2 con un tamaño de producto de 173 pb (Ver figura 10) y para determinar a que serotipo correspondían estas últimas dos (2 o 1/2) se realizó la prueba de serotipificación con antisueros monovalentes los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: dos cepas correspondieron al serotipo 2 y una cepa al serotipo 1/2.

En la Tabla 11 se describen los resultados resumidos correspondientes al grupo completo de los cerdos enfermos. Se muestra la granja de la cual provenía la muestra así como el órgano del cual se aisló la cepa y el serotipo al que corresponde.

Tabla 11. Serotipos caracterizados en animales enfermos de granjas de la República Mexicana

Granja	Órgano	Serotipo
<b>Perote Veracruz</b>	Encéfalo	ST 7
<b>Perote Veracruz</b>	Encéfalo	ST 7
<b>Perote Veracruz</b>	Encéfalo	ST 2
<b>Perote Veracruz</b>	Encéfalo	ST 2
<b>Perote Veracruz</b>	Pulmón	ST 1/2
<b>Perote Veracruz</b>	Encéfalo	ST 3

### 6.2 GRUPO DE LOS CERDOS SANOS (Tonsilas):

Se analizaron 85 tonsilas provenientes de cerdos sanos. Se seleccionaron las colonias que en Agar Sangre al 5 %,  $\alpha$ -hemolíticas, redondas, pequeñas con borde completo, color blanco a grisáceo. Al realizar la tinción de Gram, se seleccionaron las colonias cocos Gram (+) agrupados en cadenas o pequeñas cadenas; catalasa negativo, oxidasa negativo. El total de aislados con estas características fueron 49.

Posteriormente a estos 49 aislados se les realizó la PCR-*gdh* obteniéndose, que, ninguna muestra correspondió a *S. suis*. En la Fig. 8 se muestran los resultados de los geles de agarosa al 2 % correspondiente al grupo de cerdos sanos todas las muestras fueron negativas.

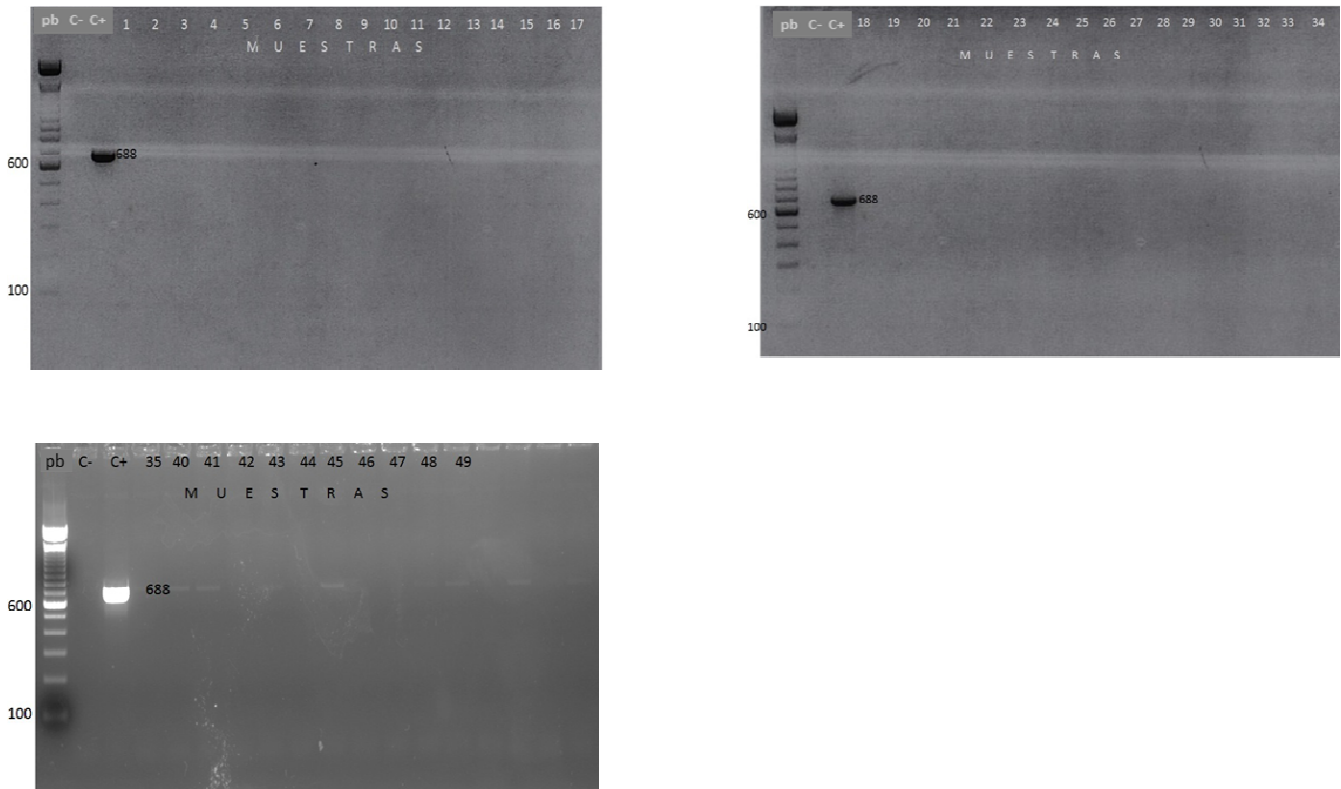


Fig. 8 Geles de agarosa al 2 % de las muestras del grupo de animales sanos PCR-*gdh*. En el carril uno se observa el Marcador de pb, en el carril dos se observa el Control negativo (C-), en el carril tres se colocó el control positivo (C+) cepa de *S. suis* ST 2, y del carril 4 al 17, 18 al 34 y del 35 al 49 las muestras de cada una de las tonsilas.

En este grupo las 49 muestras fueron *S. suis* en consecuencia a estas muestras ya no fue necesario realizar la Grouping-PCR ni la Typing-PCR ni la reacción con antisueros.

### 6.3 GRUPO DE LOS HUMANOS (Exudados faríngeos):

Se analizaron 60 muestras de exudados faríngeos provenientes de personal que labora en granjas porcinas.

Se seleccionaron las colonias que en A. S. al 5 %: fueron  $\alpha$ -hemolíticas, redondas, pequeñas con borde completo, color blanco a grisáceo y al realizar la tinción de Gram, fueran cocos Gram (+) agrupados en cadenas o pequeñas cadenas; catalasa negativo, oxidasa negativo. Se procesaron por PCR-*gdh* 60 aislados con estas características.



La Fig. 9 muestra los resultados obtenidos de la PCR-*gdh* para las muestras obteniéndose que ninguna correspondiera a *S. suis*. Por lo que en este grupo todas las muestras fueron negativas. Los geles se muestran a continuación:

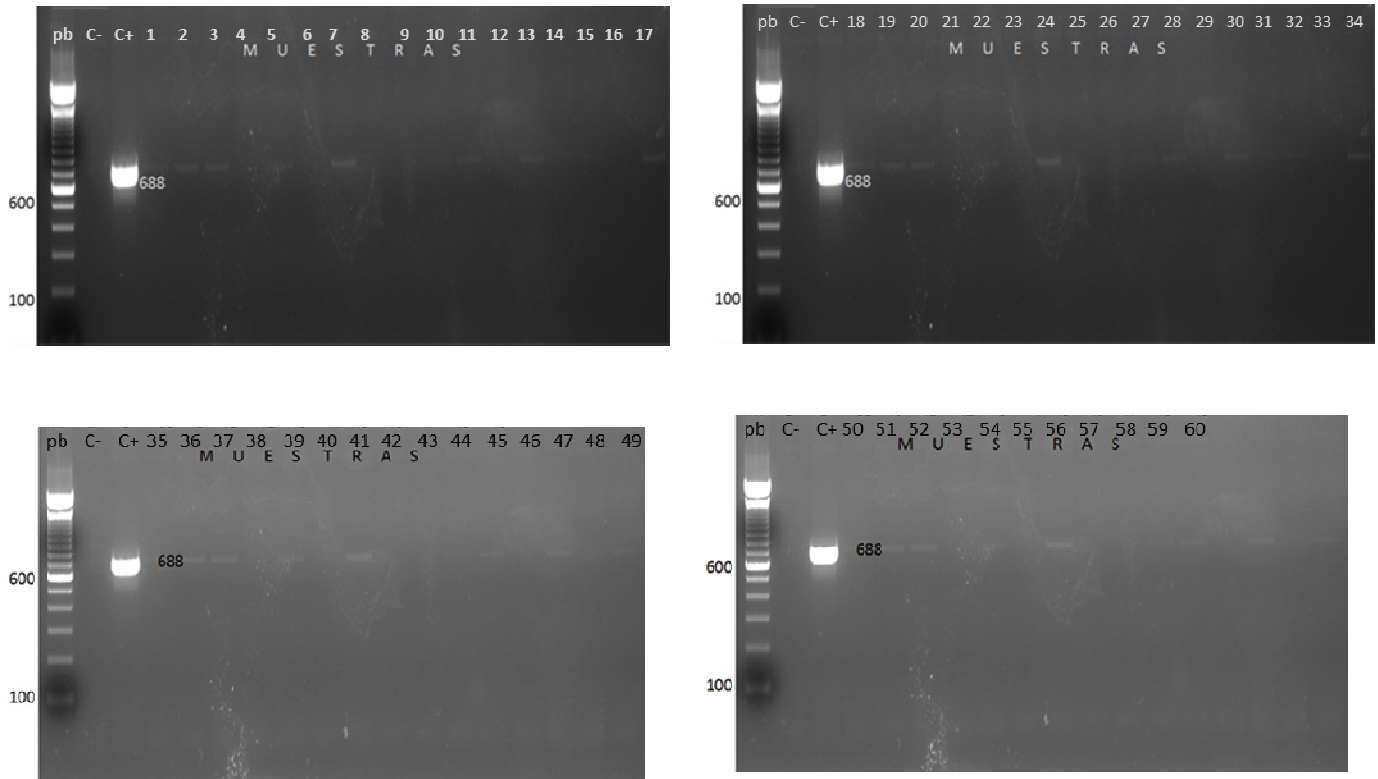


Fig. 9 Geles de agarosa al 2 % de las muestras del grupo de humanos PCR-*gdh*. En el carril uno se observa el marcador en pb, en el carril dos se observa el control negativo (C-), en el carril tres se colocó el control positivo (C+) cepa de *S. suis* ST 2, los carriles con los números 1 al 17, 18 al 34, 35 al 49 y 50 al 60 aislados de *Streptococcus*.

De los 60 aislados de *Streptococcus* provenientes de exudados faríngeos fueron negativos a *S. suis* al realizar la PCR-*gdh*.

La figura 10 Esquematiza de la tipificación de cepas (*cps*) usando una PCR multiplex de dos pasos y los productos amplificados de la PCR a partir de las 35 cepas de referencia de *S. suis*, la tipificación de cepas (*cps*) usando una PCR

multiplex de dos pasos y los productos de PCR amplificado a partir de las 35 cepas de referencia de *S. suis*. La primer PCR (Grouping PCR) clasifica las cepas probadas en 7 grupos (grupos *cps* I a VII). Los números y tamaños de productos obtenidos en la Grouping PCR amplificados a partir de cepas de cada grupo *cps* se muestran en el panel superior. Bandas de aproximadamente 1,5 kpb que aparecieron en todos los ensayos de Grouping PCR son productos del control interno (16S rRNA), cabe mencionar que al momento de realizar la caracterización de cepas en este estudio el tamaño de los productos del control interno fue de 714 pb. Las cepas clasificadas mediante la Grouping PCR se sometieron a la segunda PCR (Typing PCR) utilizando iniciadores específicos para los respectivos grupos *cps* con el fin de identificar el tipo de cada cepa *cps*. Número y tamaño de los productos amplificados de la Typing PCR a partir de todas las cepas de referencia de *S. suis* se muestran en los paneles inferiores. Bandas de 1,5 kpb que aparecieron en todos los ensayos de Typing PCR son los productos de control interno (16S rRNA) de la misma manera que en la Grouping PCR al momento de realizar la caracterización de las cepas aisladas en las granjas mexicanas no se procesó un control interno para la Typing PCR, esta es la razón por la cual en los geles de resultados solo se observa una banda. Los serotipos de las cepas de referencia se indican por debajo de los carriles. Todos los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2% (100 V, 40 min), se tiñeron con bromuro de etidio, y se fotografiaron bajo luz UV. Los carriles 1 muestran marcadores de peso molecular DNA (en miles [kb]) (marcador DNA 100 pb; Bioneer, Daejeon, Corea del Sur) [Okura, *et al.*, 2014]. Se muestra el tamaño de los productos en pb para Grouping PCR y Typing PCR este procedimiento se utilizó en el presente trabajo.

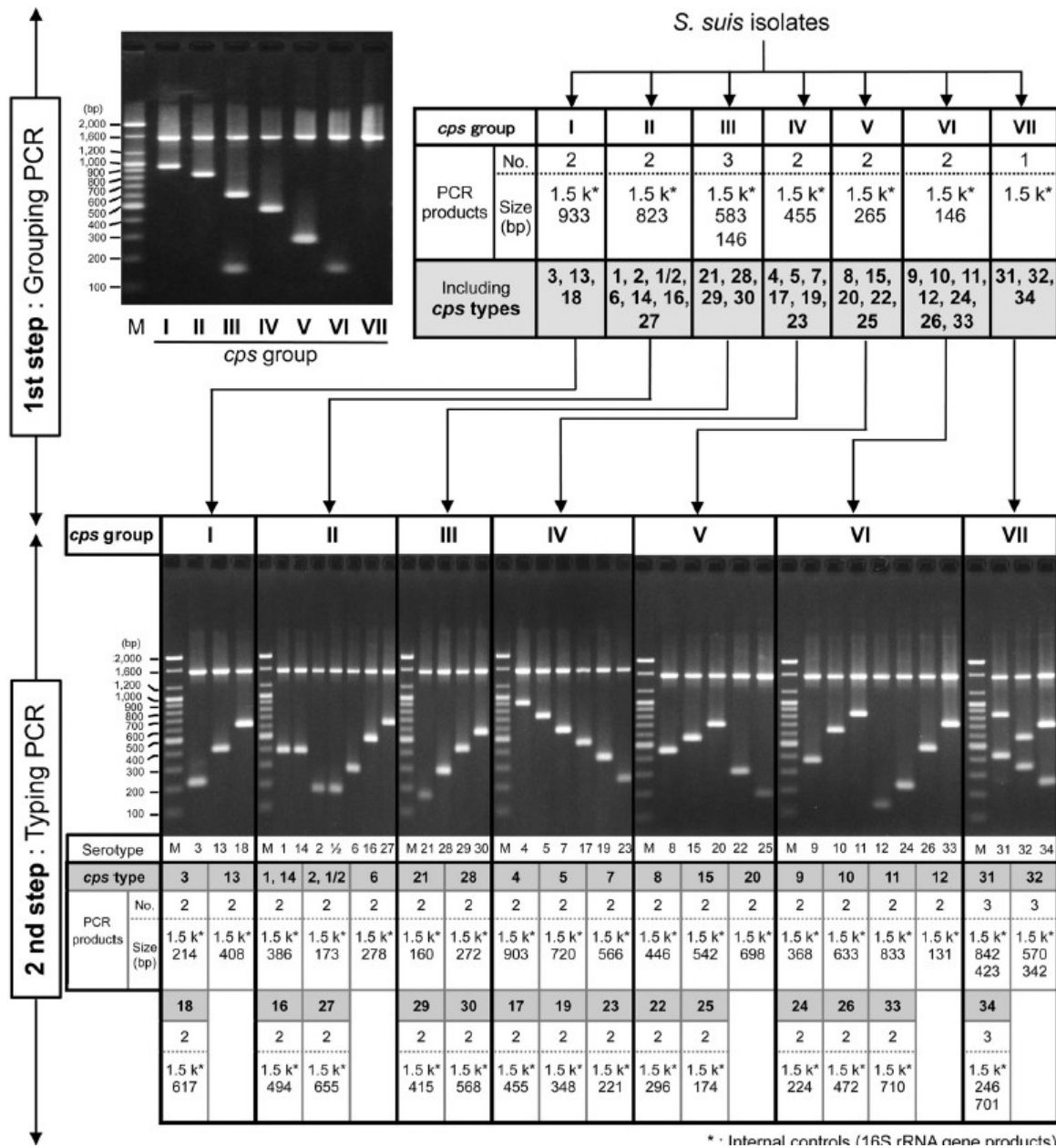


Figura 10. Esquema de la tipificación de cepas (*cps*) usando una PCR multiplex de dos pasos y los productos amplificados de la PCR a partir de las 35 cepas de referencia de *S. suis*. [Okura, *et al.*, 2014].

## 7.0 DISCUSION:

*S. suis* es considerado como un patógeno importante en algunos países de Europa, Asia y algunos de América, ya que es responsable de generar septicemia, meningitis, endocarditis, encefalitis y bronconeumonía en cerdos además de ser un agente zoonótico responsable de afectar a humanos especialmente en aquellas que trabajan de manera cercana con los cerdos como lo son granjeros, veterinarios y personal que labora en los rastros [Desjardin, *et al.*, 2014].

Respecto al aislamiento y la identificación de cepas puede realizarse por medio de pruebas bioquímicas y complementar posteriormente con serotipificación en conjunto con los signos clínicos en el caso de los cerdos enfermos. Sin embargo estas técnicas pueden ser un poco engañosas y algunas cepas pueden ser mal identificadas debido a que pueden confundirse con *S. pneumoniae*, *S. bovis* [Desjardins, *et al.*, 2014]. Otra problemática respecto al diagnóstico son las cepas no tipificables ya que estas cepas carecen de cápsula y esto dificulta el diagnóstico respecto a la serotipificación. El uso de antisueros para reacción de aglutinación en la actualidad forma parte de la metodología en los laboratorios para identificación de cepas de *S. suis* provenientes de animales y de humanos. La identificación de los 35 serotipos está basada en los CPS; sin embargo, esta serotipificación consume tiempo ya que la preparación de los antisueros no es fácil debido al uso de animales lo cual representa tiempo y los altos costos con la producción de los mismos. Aunado a aquellas reacciones cruzadas en la prueba de aglutinación se presenta entre cepas. [Okura, *et al.*, 2014].

### *Cerdos enfermos:*

Para los casos en cerdos enfermos, el aislamiento y la identificación de cepas puede ser por pruebas bioquímicas y confirmadas posteriormente por serotipificación; sin embargo el uso de estas técnicas pueden ser engañosas para algunas cepas de *S. suis* que pueden ser mal identificadas, porque pueden ser falsos positivos. Esta confusión ha llevado al mal diagnóstico de cepas en el pasado, por lo que recientemente la PCR-*gdh* puede ser utilizada para detectar *S. suis* directamente de los cultivos incluso si se han utilizado antibióticos en las placas de agar. En el presente trabajo en una primera fase con técnicas de

bacteriología se identificaron *S. suis* aislados de animales enfermos que posteriormente fueron sometidas a la PCR-*gdh* confirmando que, las pruebas bioquímicas no son tan confiables en el momento de realizar el diagnóstico de *S. suis*. En el presente estudio se aislaron seis muestras positivas a *S. suis* en el grupo de los animales enfermos provenientes de las granjas mexicanas para su posterior serotipificación. En la PCR-multiplex desarrollada por Okura, *et al.*, 2014 para poder serotipificar a los 35 serotipos de *S. suis*, la mayor desventaja de esta técnica es que los serotipos 2 y 14 no pueden ser diferenciados de los serotipos 1/2 y 1, respectivamente, y esto representa el mayor problema ya que la mayoría de las cepas aisladas a nivel mundial corresponden a los serotipos 1, 1/2, 2 y 14 en este estudio se aislaron dos cepas serotipo 2 y una 1/2 y para poder terminar la caracterización solo a estas se le realizó la aglutinación con antisueros. Para realizar la caracterización de cepas provenientes tanto de animales como humanos es necesario el uso forzoso de los antisueros, aun así esto reduce en gran medida el tiempo y el trabajo al momento de realizar el diagnóstico y la caracterización. En el presente estudio se caracterizaron cepas provenientes de animales enfermos que correspondieron al serotipo 2 y al serotipo 1/2, esto se logró en una primer fase con la PCR-multiplex de dos pasos y posteriormente con la reacción de aglutinación para cada cepa (2 y 1/2). Y respecto al resto de las cepas caracterizadas se realizó solo con el uso de la PCR-multiplex, demostrando que la serotipificación molecular es una herramienta que puede ser utilizada en la caracterización de cepas, ahorrando tiempo ya que una vez estandarizada es muy rápida de realizar comparada con las técnicas bacteriológicas y serotipificación las cuales consumen tres días como mínimo para la identificación de *S. suis*.

Por lo que la idea de serotipificación molecular mediante PCR multiplex utilizando genes *cps* es atractivo debido al hecho de que el uso de animales ya no se requieren para la producción de los 35 antisueros sino solo para los que identifican serotipos 1, 1/2, 2 y 14.

Las cepas que reaccionan en la serología con más de un serotipo pueden ser confirmados con esta técnica de PCR multiplex. El resto de los serotipos caracterizados fueron 3 y 7 se logró utilizando la PCR-multiplex de dos pasos

debido a que pertenecen a diferente grupo de homología y el tamaño del producto es diferente.

Durante los últimos 12 años a nivel mundial, más de 4500 cepas confirmadas serológicamente recuperadas de cerdos enfermos han sido reportadas, los serotipos aislados con mayor frecuencia en orden decreciente son: los serotipos 2, 9, 3, 1/2 y 7, a pesar de que este trabajo no es de prevalencia los serotipos aislados coinciden con los reportados en el trabajo de Desjardins, *et al.*, 2014. Ya que casi el 70 % de los estudios sobre las cepas aisladas recuperadas de todo el mundo en cerdos enfermos son de América del Norte (Estados Unidos y Canadá). Sin embargo, esto no es un indicativo de un mayor número de casos, sino simplemente de un mayor número de informes y estudios publicados. De hecho, el 97 % de los datos de América del Norte son de Canadá y el resto de los Estados Unidos, sin datos de México sin embargo, hay un efecto geográfico claro en la distribución de los serotipos y estas cifras están influidas por el número de estudios publicados [Desjardins, *et al.*, 2014] por lo que sería de gran utilidad realizar más muestreos en México para poder realizar una comparación de los serotipos presentes en la República Mexicana y los diferentes factores de virulencia presentes en las cepas mexicanas con otras cepas de diferentes regiones geográficas. En este estudio lograron caracterizarse a los serotipos 2, 1/2, 3 y 7 provenientes de animales enfermos en las granjas mexicanas.

#### *Animales clínicamente sanos*

*S. suis* es un habitante del tracto respiratorio superior perteneciente a la flora normal de los cerdos y muchos estudios están enfocados a la detección de los animales portadores sanos, aunque otras especies de *Streptococcus* similares a *S. suis* se pueden aislar de estas muestras cuando se utilizan técnicas bacteriológicas como fue el caso en este trabajo ya que de las 49 muestras caracterizadas con bacteriología ninguna correspondió a *S. suis* al momento de realizar la PCR-*gdh.*, por esta razón las técnicas de biología molecular que se han desarrollado para la identificación de *S. suis* son las que se recomiendan para de esta manera reducir los riesgos de una mala identificación [Desjardins, *et al.*, 2014]. En este trabajo las muestras pertenecientes al grupo de los animales

clínicamente sanos (se procesaron muestras de tonsilas), resultaron negativas a *S. suis*, esto pudo ser debido al uso indiscriminado de antibióticos en las granjas de donde fueron procedentes las muestras o también esto puede tener relación con el estudio Cloutier, *et al.*, 2003 determinaron que en un rebaño de 20 animales sanos el 53% de ellos fueron positivos a *S. suis* cuando fueron tomados hisopos nasales pero no fueron asociados a la presencia de enfermedad por *S. suis*, y la proporción de animales portadores sanos detectados era bajo, especialmente durante las semanas donde ninguna enfermedad clínica estaba presente dentro de la granja pero ellos refieren que estos datos no son suficientes para asegurar la ausencia de *S. suis* serotipo 5 que fue el único que trataban de identificar lo adjudicaron a que las muestras contenían poca concentración de *S. suis* y en 2007 MacInnes, *et al.*, realizaron una investigación acerca de animales portadores sanos en Canadá y demostraron que los serotipos 1/2 y 2 estuvieron presentes en animales sanos dentro de las granjas y que esto es relevante ya que lo consideraron como un punto crítico para la transmisión a otros animales que conlleve a la enfermedad de los animales y el desarrollo de una zoonosis. Así que los resultados obtenidos en este trabajo no son un indicativo de que las granjas muestreadas sean negativas a portadores sanos, por lo que la recomendación es realizar más muestreos en busca de portadores sanos.

#### *Casos humanos*

La gran mayoría de los casos humanos se han producido en Asia, que representan más del 90 % de todos los casos reportados, sobre todo en Vietnam, Tailandia y China. Estos tres países representan por sí solos el 83,6 % de todos los casos en todo el mundo. Sin embargo, en China, casi todos los casos se describieron durante los brotes de 1998 y 2005 [Desjardins, *et al.*, 2014]. Sin embargo en las muestras recolectadas en el personal que labora en las granjas de México, no se logró aislar y caracterizar cepas de *S. suis*; estos resultados no coinciden a los obtenidos en un estudio realizado en el 2001 a trabajadores de rastros en el Valle de Toluca por; en aquella ocasión lograron cuatro aislamiento de *S. suis* los cuales correspondieron a los serotipos: 2, 27 y 2 cepas no tipificables; las personas de las cuales se aislaron estas cepas no presentaban

manifestaciones clínicas [Talavera, *et al.*, 2001] por lo que, se adjudica que el hecho de no haber aislado *S. suis* en las muestras de los trabajadores de las granjas se pudo haber debido a que la cantidad de *S. suis* era muy baja lo cual al momento de realizar las técnicas bacteriológicas hubo pérdida importante en la concentración de microorganismos pero es importante recalcar que el hecho de no haber tenido aislamiento de *S. suis* en exudados faríngeos sea suficiente para poder aseverar que los trabajadores estas libres del microorganismo sería necesario realizar más muestreos en granjas para poder determinar la zoonosis.

Desjardins, *et al.*, en 2014 realizaron un reporte de la distribución mundial de los serotipos de *S. suis* en el cual incluyeron animales sanos para determinar portadores sanos, animales enfermos y casos humanos para determinar la zoonosis, en este reporte muestran datos de América del norte sólo de Canadá y Estados Unidos, pero en el caso en México a pesar del estudio realizado por Talavera, *et al.*, 2001 no hay informes oficiales sobre los casos clínicos en cerdos ni en humanos por lo que es necesaria una acción respecto al diagnóstico para poder recabar datos al respecto.

Por otro lado es de gran importancia determinar la presencia de los animales portadores sanos ya que estos juegan un papel importante en la transmisión del microorganismo hacia los animales y también al personal que labora muy de cerca con los cerdos en las granjas y en los rastros.

Respecto al diagnóstico actualmente en México, existen técnicas bacteriológicas para identificar *S. suis*, sin embargo comparada con estos métodos bacteriológicos, se ha demostrado que la técnica de PCR-*gdh* resulta ser una buena herramienta para la identificación de *S. suis* Okwumabua *et al.*, en 2013 demostraron que de 306 muestras positivas a *S. suis* (305 de cerdos y una de humano) provenientes de diferentes zonas geográficas y de diversos órganos fueron sometidas a la PCR-*gdh* y obtuvieron que todas pudieron ser identificadas por medio de esta PCR y comprobando que cuando utilizaban DNA de otras bacterias que no correspondían a *S. suis* no fueron detectados determinando la especificidad de los iniciadores. En este momento, el diagnóstico de este



microorganismo en el país se lleva a cabo básicamente por signos clínicos, lesiones y métodos bacteriológicos este diagnóstico está enfocado únicamente a los animales enfermos, respecto a los animales sanos no se realiza la búsqueda de portadores sanos y respecto a los humanos que trabajan directamente con los cerdos tampoco se realiza un monitoreo para determinar si son portadores de *S. suis*; y es necesario implementar un diagnóstico capaz de dar resultados más rápidos, precisos y específicos como la PCR-multiplex utilizada en este trabajo, así que estas herramientas pueden ser utilizadas para diagnosticar y caracterizar las cepas aisladas de manera confiable, y es importante implementar y establecer un protocolo de diagnóstico en México. Finalmente debemos de estar conscientes de que en el país no hay información ni estudios respecto al impacto generado por *S. suis* ya sea a nivel sector salud, impacto económico ni impacto zoonótico. Por consecuencia no hay medidas de prevención, y las técnicas de diagnóstico empleadas de manera rutinaria no son suficientes y confiables para la caracterización de cepas por lo que se debe implementar primeramente un buen protocolo de diagnóstico como el que se ha utilizado en el presente estudio que sería una opción viable para tener más estudios y datos referentes a este microorganismo y así generar más información en la República Mexicana; pero además, se requiere un mayor interés en la investigación que tenga como finalidad un mejor conocimiento de esta infección.

Este estudio se logró aislar y caracterizar cepas provenientes de animales enfermos, sin embargo no fue posible realizar el aislamiento en el grupo de los animales sanos para buscar portadores sanos y en el grupo de los humanos para determinar la zoonosis tampoco fue posible.

Por esta razón, este trabajo busca desarrollar y aplicar técnicas moleculares con el fin de implementar un diagnóstico oportuno ya que hasta el día de hoy México no cuenta con un protocolo confiable para el diagnóstico en esta enfermedad.

## 8.0 CONCLUSIONES:

- Se determinó la presencia de *S. suis* en granjas porcinas con ayuda de técnicas bacteriológicas y PCR. Así como también se logró caracterizar cepas de *S. suis* provenientes de granjas porcinas de la República Mexicana, determinando que si hay presencia de *S. suis* en México.
  
- Se realizó el aislamiento y la identificación de *Streptococcus*, con ayuda de estudios bacteriológicos y se confirmaron estos aislamientos con PCR-*gdh*.
  
- Se caracterizaron cepas de *S. suis* a través del uso de PCR-multiplex de dos pasos, determinando que, hay una variación de serotipos de *S. suis* en las granjas mexicanas.

## 9.0 REFERENCIAS:

- Aarestrup F. M., Duran C. O., Burch D. G. (2008). *Antimicrobial resistance in swine production*. Animal Health Research Reviews Vol.9 No. 2 p.p. 135–148
- Arends JP, Zanen HC. (1988). Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. RevInfectDis. Vol.10 p.p 131–37
- Baez M, Espinosa I, Vichi J, Martínez S. (2012) *Estudio de la sensibilidad In Vitro frente a diferentes antimicrobianos en cepas de S. suis asociados a neumonía*. Rev. Salud Anim. Vol. 34 No. 1 p.p. 57-62.
- Blast. *Streptococcus suis* 89/1591 (2013) [en línea]: <http://genome.jgi-psf.org/strsu/strsu.home.html>. Consultada el 04 de abril 2012.
- Blume V., Luque I., Vela AI., Borge C., Maldonado A., Domínguez L., Tarradas C., Fernández-Garayzábal JF. (2009). *Genetic and virulence-phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of Streptococcus suis swine isolates*. Int Microbiol. Vol. 12 No.3 p.p. 161-6.
- Bonifait L., Gottschalk M., Grenier D. (2010). *Cell surface characteristics of nontypeable isolates of Streptococcus suis*. Federation of European Microbiological Societies. Vol. 311 p.p. 160–166
- Clifton-Hadley FA, Enright MR. (1984). *Factors affecting the survival of Streptococcus suis type 2*. Vet Rec. Vol.114 p.p. 584–86
- Clifton-Hadley FA. (1984). *Studies of Streptococcus suis type 2 infection in pigs*. Vet Res Comm. Vol. 8 p.p. 217-227.
- Cloutier G, D'Allaire S, Martinez G, Surprenant C, Lacouture S, Gottschalk M. (2003). *Epidemiology of Streptococcus suis serotypes 5 infection in a pig herd with and without clinical disease*. Veterinary Microbiology. Vol. 97 p.p. 135-151

De Moor C.E. (1963). *Septicaemic infections in pigs caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R, S and T*. Antonie Leeuwenhoek J Microbiol Serol. Vol. 29 p.p 272-280.

Desjardins GG., Auger JP., Gottschalk M., Segura M., Xu Jianguo (2014). *Streptococcus suis, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing*. Emerging Microbes and Infections Nature. Vol. 3 p.p 1-20.

Elliott S.D. (1966). *Streptococcal infections in young pigs. I. An immunological study of the causative agent (PM Streptococcus)*. J Hyg Camb Vol.64 p.p. 205-212.

Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M. (2012). *Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent Streptococcus suis* Future Microbiology. Vol. 7 p.p. 259-279.

Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J. (1989). *Description of 14 new capsular types of Streptococcus suis*. J Clin Microbiol. Vol 27 p.p 2633–36.

Gottschalk M, Segura M. (2000). *The pathogenesis of the meningitis caused by Streptococcus suis: the unresolved questions*. Vet. Microbiology Vol. 76 p.p. 259–72.

Gottschalk M., Higgins R., Jacques M. (1993). *Production of capsular material by Streptococcus suis serotypes 2 under different growth conditions*. Can. J. Vet. Res. Vol. 57 p.p 49-52.

Gottschalk M., Xu J. (2010). *Streptococcus suis Infections in Humans: What is the prognosis for Western countries? (Part II)*. Elsevier Vol. 32, No. 13 p.p. 97-102.

Gottschalk, M. (2002). *Streptococcus suis: update on pathogenesis and progress on control*. Proceedings American Association of Swine Veterinarians p.p255-260.

Gottschalk, M. (2004). *Porcine Streptococcus suis strains as potential sources of infection in humans: an underdiagnosed problem in North America?* J. Swine Health Prod. Vol.12 p.p 197-199.

Higgins R, Gottschalk M. (1990). *An update on Streptococcus suis identification*. J Vet. Diagn Invest. Vol 2 p.p 249–52.

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

Higgins, R., Gottschalk, M., (1999). *Streptococcal diseases*. In: Straw, B., D’Allaire, S., Mengeling, W., Taylor, D. Ed. Diseases of Swine, ed. eighth; Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 563–578.

MacInnes JI., Gotschalk M., Lone AG., Metcalf DS., Ojha S., Rosendal T., Watson SB., Friendship RM., (2008). *Prevalence of Actibacillus pleuropneumonie, Actinobacillus suis, Haemophilus parasuis, Pasterella multocida., and Streptococcus sui in representative Ontario swine herds* The Canadian Journal of Veterinary Research. Vol. 72 p.p 242-248.

Monter Flores, J.L., Higgins, R., D’Allaire, S., Charette, R., Boudreau, M., Gottschalk, M., (1993). *Distribution of the different capsular types of Streptococcus suis in 19 swine nurseries*. Can. Vet. J. Vol. 34, p.p.170–171.

Norton, P.M., Rolph, C., Ward, P.N., Bentley, R.W., Leigh, J.A. (1999). *Ephitelial invasion and celllysis by virulent strains of Streptococcus suis is enhanced by the presence of suilysin*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. Vol. 26 p.p 25-35.

Okwumabua, O., O’Connor, M. Shull, E. (2023). *A polymerase chain reaction (PCR) assay specificc for Streptococcus suis based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase*. FEMS Microbiology Letters Vol. 218 p.p. 79-84

Okura M., Lachance C., Osaki M., SekizakiTsumotu., Maruyama F., Nozawa T., Nakagawa I., Gottschalk M., (2014). *Development of a two-Step Multiplex PCR assay for Typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of Streptococcus suis*. Journal Clin. Microbiology. Vol. 52 No. 5 p.p 1714-1719.

Okura M., Takamatsu D., Osaki M., Maruyama F., Nozawa T., Nakawua I., Gottschalk M., Kumagai Y. (2013). *Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters from all serotypes of Streptococcus suis: Potencial mechanisms for generattion of capsular variation*.Applied and environmentalMicrobiology. Vol 79 No. 8 p.p 2796-2806.

Smith HE.,Wisselink HJ., Stockhofe-Zurwieden N., Vecht U., Smits MA. (1997). *Virulence markers of Streptococcus suis type 1 and 2*.AdvExp Med Biol. Vol. 418 p.p 651–55

Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM. (1997). *Streptococcus suis: past and present*. Vet Res Commun. Vol 21 p.p 381–407.

Straw E., Silvye D´A., Mengeling W., Taylor D. (1999). *Diseases of swine*. Cap 41 Streptococcal Diseases. Higgins R., Gottschalk M. Ed. Iowa University Press. USA p.p 563-570.

*Streptococcus suis. Retrato microbiológico*. (2012). Rev Chilena Infectología. Vol 29 No.5 p.p 541-542

Tarradas, M. C., Arenas, A., Maldonado, A., Vicente, S., Miranda, A. and Perea, A. (1994). *Susceptibility of Streptococcus suis to various antimicrobial agents*. Zentralblattfür Veterinarmedizin, Reihe B. Vol. 41 p.p. 685–688.

Talavera RM., Gottschalk M., Velázquez OV. (2001). *Evaluación de la virulencia y serotipos de Streptococcus suis aislados de trabajadores de rastros en el valle de Toluca Estado de México*. Rev. Vet de México Vol.32 No.003 p.p. 201-205.

TenenbaumT, Adam R, Eggelnpohler I. (2005).*Strain-dependent disruption of blood–cerebrospinal fluid barrier by Streptococcus suis in vitro*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. Vol. 44, No. 1 p.p. 25–34.

Trottier S, Higgins R, Brouchu G, Gottschalk M. (1991) *A case of human endocarditis due to Streptococcus suis in North America*. Rev Infect Dis Vol. 13 p.p.1251-1252.

Vanier G., Segura M., Gottschalk M. (2007). *Characterizations of the invasion of porcine endothelial cells by Streptococcus suis serotype 2*. The Canadian Journal of Veterinary Research. Vol. 71 p.p 81–89

Wisselink HJ, Smith HE, Stockhofe-Zurwieden N, Peperkamp K, Vecht V. (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. Microbiology. Vol. 74 p.p. 237-248.

Zigong W., Ran L., Anding Z. Hongkui H. Yafeng H., Jing X., Xuehui C. (2009). *Characterization of Streptococcus suis isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007*. Veterinary Microbiology Vol.137 p.p 196–201.