



universidad  
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS  
DE *STREPTOCOCCUS SUIS*  
PRESENTES EN GANADERIA  
PORCINA DE CASTILLA Y LEÓN**

**CHARACTERIZATION OF  
*STREPTOCOCCUS SUIS* ISOLATES  
PRESENT IN PIG FARMING IN  
CASTILLA AND LEON**

Autor: Alba González Fernández

**GRADO EN BIOLOGÍA**

Septiembre, 2020

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría reconocer el gran esfuerzo y el apoyo que me han brindado mis tutores, sin ellos no habría sido posible completar ni enfocar como es debido este Trabajo de Fin de Grado, a pesar de las circunstancias en las que hemos estado envueltos estos últimos meses, han sabido proporcionarme al instante toda la ayuda que he necesitado.

En segundo lugar, agradecer a los estudiantes de doctorado de Sanidad Animal: Máximo Petrocchi y Esther Pérez. Ellos me han transmitido sus conocimientos con paciencia y sus consejos me han servido y me servirán de mucho en esta nueva etapa que comenzaré después del Grado. Son un gran ejemplo de jóvenes investigadores, en un campo tan poco agradecido.

Por último, pero no menos importante, dar las gracias a mi familia y amigos por estar siempre a mi lado en un curso difícil como ha sido este último.

## **ÍNDICE GENERAL:**

### **1. RESUMEN-ABSTRACT**

### **2. INTRODUCCIÓN**

2.1. Complejo Respiratorio Porcino y *Streptococcus suis*.....1

2.2. Serotipificación.....3

2.3. Vacunación.....4

### **3. OBJETIVOS**

3.1. Objetivos generales.....6

3.2. Objetivos específicos.....6

### **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

4.1. Instalaciones.....6

4.2. Obtención de muestras pulmonares.....6

4.3. Cultivo bacteriano a partir de las muestras.....7

4.4. Congelación de bacterias a partir de cultivos en medio sólido.....8

4.5. PCR.....9

4.6. Electroforesis.....11

### **5. RESULTADOS**

5.1. Resultados de la serotipificación.....13

5.2. Resultados de los factores de virulencia.....14

**6. DISCUSIÓN.....15**

**7. CONCLUSIONES.....17**

**8. REFERENCIAS.....18**

**9. ANEXOS**

## 1. RESUMEN

Una de las mayores preocupaciones a nivel de Salud Pública y Salud Animal en los últimos años están siendo los procesos de neumonía asociados al Complejo Respiratorio Porcino. Debido a la alta producción de ganado porcino, es necesario el estudio de las bacterias y virus que causan esta enfermedad. En este trabajo se estudió la bacteria *Streptococcus suis*. En el estudio se partió de muestras pulmonares de cerdos de Castilla y León. En primer lugar, se procesaron las muestras para determinar si las muestras recogidas pertenecían a esta bacteria. A continuación, se analizaron las muestras caracterizadas como *Streptococcus suis* mediante PCR, en varias rondas de amplificación, para determinar su serotipo y poder conocer los serotipos más frecuentes en las explotaciones estudiadas. Por último, se estudió, en estos aislados, los factores de virulencia que contenían, para conocer la patogenia de esta bacteria. Los resultados obtenidos, permitieron determinar que: la mayoría de las muestras aisladas resultaron ser caracterizadas como *Streptococcus suis*; los serotipos 2, 7 y 9 fueron los más frecuentes y prácticamente todos los aislados presentaron algún factor de virulencia.

**Palabras clave:** Complejo Respiratorio Porcino, *Streptococcus suis*, serotipo, factores de virulencia.

## ABSTRACT

One of the greatest concerns at the level of Public Health and Animal Health in recent years are the processes of pneumonia associated with the Porcine Respiratory Complex. Due to the high production of pigs, the study of the bacteria and viruses that cause this disease is necessary. In this work we studied the bacterium *Streptococcus suis*. The study was based on lung samples from pigs from Castile and Leon. First of all, the samples were processed to determine whether the samples collected belonged to this bacterium. Samples characterized as *Streptococcus suis* were then analyzed using PCR, in several amplification rounds, to determine their serotype. This allows to know the serotypes in the different farms studied. Finally, we studied, in these isolates, the virulence factors they contained, to know the pathogenesis of this bacterium. The results showed that: most of the isolated samples were characterized as *Streptococcus suis*; serotypes 2, 7 and 9 were the most frequent and virtually all isolates had some virulence factor.

**Key words:** Porcine Respiratory Complex, *Streptococcus suis*, serotype, virulence factors.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Complejo Respiratorio Porcino y *Streptococcus suis*

Tanto a nivel mundial como dentro de la Unión Europea, España se considera uno de los países de mayor producción de ganado porcino, situándose como cuarto productor de carne de cerdo en el mundo y segundo de Europa, después de Alemania (MAPAMA, 2019). Desde un punto de vista económico, el sector porcino español tiene una importancia clave en nuestro país, puesto que supone el 12,7% de la producción agraria final y el 37% de la producción ganadera final (MAPAMA, 2018).

El Complejo Respiratorio Porcino es una entidad nosológica referente a los procesos de neumonía en los que distintos organismos patógenos participan, fundamentalmente entre las 16 y 20 semanas de vida (Brockmeier *et al.*, 2002) (figura 1). De esta forma, la etiología de este proceso es múltiple, ya que es causado por diferentes virus y bacterias, entre los cuales destaca la bacteria *Streptococcus suis* (*S. suis*).



**Figura 1.** Cerdos recién destetados, edad en la que pueden sufrir estos procesos.

*S. suis* es un coco Gram positivo que se encuentra solo, formando parejas u ocasionalmente cadenas cortas (figura 2A). Se caracteriza por tener cápsula. Este microorganismo crece bien en aerobiosis, pero su crecimiento mejora en condiciones microaerofílicas. (Goyette-Desjardins *et al.* 2014).

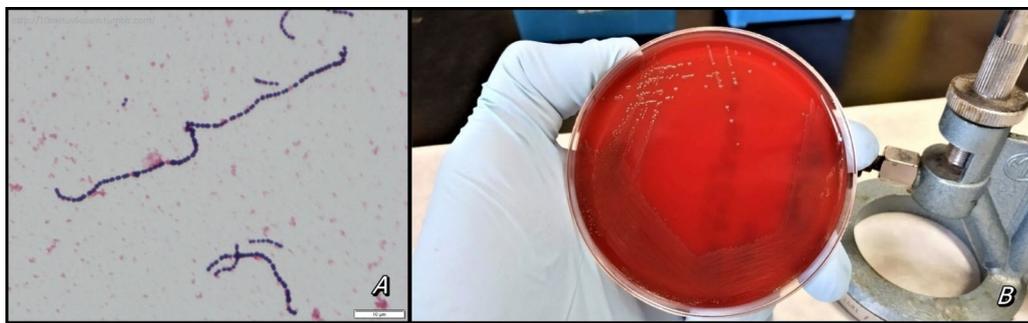
Los estreptococos son muy sensibles a los cambios del pH, encontrándose su óptimo en valores cercanos a siete; son capaces de crecer en un intervalo de temperatura entre 20 y 40°C, siendo la más adecuada 37°C (Jones, 1978), y la mayor parte de ellos requieren medios enriquecidos con sangre o suero para su crecimiento.

Para el crecimiento “*in vitro*”, la incubación de este microorganismo debe realizarse en cámaras a 37°C durante 24-48 horas, con un cinco por ciento de dióxido de carbono o en condiciones

aeróbicas (Hommez *et al.*, 1986; Sihvonen *et al.*, 1988; Boetner *et al.*, 1987; Tarradas *et al.*, 1994).

Los medios de cultivo más utilizados son el agar Columbia y el agar sangre (figura 2B) (Tarradas *et al.*, 1994; Luque *et al.*, 1998; Gottschalk, 2012). Las colonias son pequeñas, transparentes u opacas y levemente mucosas, de bordes regulares. Cuando se utiliza sangre de ovino, en el medio se puede observar una hemólisis alfa (Staats, 1997).

Cuando *S. suis* crece en medio de cultivo agar chocolate se caracteriza por producir halos verdes alrededor de las colonias. En cambio, cuando crece en medio agar sangre, este microorganismo produce halos negruzcos alrededor de las mismas.



**Figura 2.** Tinción de Gram observada en microscopía óptica de *Streptococcus suis* en la que se muestra alguna formación en cadenas (A). Crecimiento de *Streptococcus suis* en agar sangre (B).

Entre las patologías que infectan al cerdo, las infecciones por *Streptococcus suis* han adquirido una importancia creciente en los últimos veinte años. Con una prevalencia de granjas infectadas cercana al 100%, *S. suis* es uno de los patógenos bacterianos más importantes del cerdo, causante del mayor porcentaje de muerte en lechones destetados en el mundo (Gottschalk *et al.*, 2010; Goyette-Desjardins *et al.*, 2014).

*S. suis* tiene como hábitat natural el tracto respiratorio superior, especialmente las tonsilas y la cavidad nasal, el tracto genital y la porción gastrointestinal del aparato digestivo del cerdo. Los animales portadores sanos desempeñan un importante papel en la diseminación y transmisión de este patógeno (Gottschalk y Segura, 2000; Luque *et al.*, 2009), siendo los responsables de la introducción y mantenimiento del microorganismo en las explotaciones (Cloutier *et al.*, 2003; Luque *et al.*, 2010). La meningitis es la principal manifestación clínica, si bien la enfermedad puede cursar también con artritis, endocarditis, bronconeumonía, poliserositis, septicemia y trastornos reproductivos. Su relevancia es especialmente alta en aquellas explotaciones donde se presentan otras enfermedades inmunosupresoras, como el Síndrome Respiratorio y

Reproductivo Porcino o la Circovirus, alcanzando tasas de mortalidad de hasta el veinte por ciento (Higgins y Gottschalk, 1990; Cloutier *et al.*, 2003).

El grupo de edad que tiene mayor riesgo de desarrollar signos de infección son los cerdos de entre 4 y 8 semanas de vida. Además, *S. suis* es potencialmente zoonótico, lo que hace que las personas que trabajan cerca de cerdos infectados o de productos derivados tengan un mayor riesgo de contagio (Denich *et al.* 2020).

Uno de los principales problemas planteados en las explotaciones porcinas para luchar frente a las infecciones por *S. suis* consiste en establecer medidas de control eficaces, puesto que la erradicación se convierte en un objetivo prácticamente irrealizable. Para controlar la enfermedad se ha utilizado durante mucho tiempo el tratamiento con antibióticos, principalmente beta-lactámicos que han ido resolviendo el problema en los distintos niveles de producción. Sin embargo, las conclusiones del Consejo de la UE del 29 de mayo de 2012 proponían que sus estados miembros deberían adoptar medidas para el control de las resistencias antimicrobianas y por lo tanto, la reducción del uso de antibióticos en el ganado es imprescindible (EC, 2013). La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios de España (AEMPS), propuso en 2014 un plan estratégico (AEMPS, 2015) de lucha contra la aparición de resistencias bacterianas e ilustrar a la población sobre el riesgo de la aparición de microorganismo resistentes a los antibióticos (Muñoz y Porrero, 2017).

## **2.2. Serotipificación**

Un serotipo es un tipo de microorganismo infeccioso clasificado según los antígenos presentes en su superficie celular. Los serotipos permiten diferenciar organismos a nivel de subespecie, proceso de gran importancia en epidemiología. De esta forma, un serotipo determinado es una población de un microorganismo infeccioso que se diferencia de otras subpoblaciones de la misma especie por medio de pruebas serológicas. Los serotipos pueden establecerse según factores de virulencia, lipopolisacáridos en bacterias Gram-negativas, presencia de exotoxinas, plásmidos, bacteriófagos, u otras características que permiten diferenciar a dos organismos de la misma especie a través de distintas pruebas.

La distribución de los serotipos de *Streptococcus suis* varía dependiendo del área geográfica. Saber la distribución de los serotipos es importante para estudios epidemiológicos (Thongkamkoon *et al.* 2017).

Tradicionalmente, la identificación de los estreptococos ha tenido lugar con pruebas serológicas y bioquímicas; sin embargo, a medida que han avanzado las técnicas de biología molecular, se han desarrollado métodos de identificación más seguros y rápidos (Okwumabua *et al.*, 2003; Bonifait *et al.*, 2010).

Para llegar a una identificación apropiada, a parte de las pruebas bioquímicas, es necesario confirmar con técnicas de serotipificación, que muestren los antígenos capsulares.

La tipificación de *S. suis* solamente se puede llevar a cabo con cepas capsuladas, se ha confirmado que las cepas que carecen de cápsula presentan ciertas características, como por ejemplo una mayor hidrofobicidad, cualidad que puede ser utilizada para la identificación (Bonifait *et al.*, 2010; Gottschalk *et al.*, 2013).

El desarrollo de nuevas técnicas basadas en la detección de genes específicos ha causado que estas sean más sensibles y específicas y han ido desplazando a los métodos de identificación bioquímicos tradicionales. La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método específico y rápido para la identificación de la especie, a través de la detección del gen de la glutamato-deshidrogenasa (*gdh*), de 688pb (Okwumabua *et al.*, 2003). De igual modo, se han desarrollado otras técnicas de PCR sencillas o múltiples, que permiten detectar uno o varios serotipos y potenciales factores de virulencia de *S. suis* (Wisselink *et al.*, 2002; Marois *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012). Actualmente, se ha descrito una PCR múltiple para la detección de los 33 serotipos descritos (Liu *et al.*, 2013).

Recientemente, se ha llegado a secuenciar el genoma completo de varios serotipos de esta especie, el 1, 2, 3, 7, 9, 14 y 16. Existe una estrecha relación entre las cepas de un mismo serotipo, sin embargo, hay diversidad entre serotipos a nivel genómico (Hu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Boyle *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

### **2.3. Vacunación**

La vacunación es la administración de una preparación destinada a generar inmunidad adquirida contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos. Normalmente una vacuna contiene un agente que se asemeja a un microorganismo causante de la enfermedad y a menudo se hace a partir de formas debilitadas o muertas del microorganismo, sus toxinas o una de sus proteínas de superficie. De esta forma, se diferencian las vacunas atenuadas, las inactivadas y las vacunas de subunidades entre otras.

Las bacterias autógenas son usadas con frecuencia en el campo. Se preparan a partir de una cepa virulenta aislada en una granja con problemas clínicos y se aplican en la misma granja, una vez desactivada. Estas vacunas, denominadas autovacunas, son específicas en la cepa en particular que está creando en ese momento la patogenia en la explotación, no sirve para otras explotaciones ni para otros años puesto que la cepa que causa de nuevo la enfermedad puede variar. Estas vacunas son útiles para una cepa concreta en un momento concreto y en una granja concreta. No deben confundirse con vacunas que sirven para la inmunización con serotipo homólogo, que son las comerciales que existen actualmente, estas protegen contra un serotipo en particular, no contra una cepa concreta. Hoy por hoy, los resultados de campo con este tipo de inmunización no producen una clara inmunogenicidad ni protección, por lo que se considera que su uso no es eficiente, por no mencionar los grandes dilemas que se plantean a la hora de inmunizar a madres o a los lechones, al administrar la vacuna o al elegir la vía de administración. (tabla 1)

Las vacunas de subunidades basadas en proteínas conservadas entre los diferentes serotipos pueden ser más útiles en la práctica veterinaria si protegen contra el desafío con cepas de serotipos homólogos y heterólogos. Se utilizan factores de virulencia, se aíslan los factores necesarios para que la bacteria infecte, se realizan vacunas de esos fragmentos (que contengan los factores) y se inyectan en los cerdos. Los cerdos producen anticuerpos contra dichos factores, se expresan dichos anticuerpos y se combate la enfermedad. En los últimos años, se han descubierto muchas moléculas de *S. suis* antigénicas o inmunogénicas, la mayoría descubiertas gracias a estudios inmunoproteómicos. De algunas se han evaluado su capacidad inmunogénica en animales de experimentación como ratones, y solo algunas seleccionadas han sido desarrolladas en cerdos, con resultados de todo tipo, dependiendo de la proteína. Se ha demostrado que los anticuerpos frente la cápsula podrían ser efectivas pero los animales producen pocos anticuerpos. *S. suis* es poco inmunogénico, puesto que se ha comprobado que incluso animales enfermos no tienen altos títulos de anticuerpos. Sin embargo, parece una teoría muy reforzada que la vacunación debe ser de madres y lechones, aunque en algunos casos se ha demostrado que a las siete semanas ya no se detectan anticuerpos. En la tabla 1 se resumen las principales diferencias entre las vacunas inactivadas y de subunidades.

**Tabla 1.** Ventajas e inconvenientes de las vacunas inactivadas y las vacunas de subunidades.

	Ventajas	Inconvenientes
Vacunas inactivadas	<ul style="list-style-type: none"><li>- Se utiliza el microorganismo completo</li><li>- Segura</li><li>- Económica</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Menos eficaz</li><li>- Menos específica</li></ul>
Vacunas de subunidades	<ul style="list-style-type: none"><li>- Se utilizan fragmentos del microorganismo</li><li>- Segura</li><li>- Más eficaz</li><li>- Más específica</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Costosa</li><li>- Más tiempo en su obtención</li></ul>

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos generales**

Mediante el presente trabajo, se pretende conocer la presencia de *S. suis* en distintas ganaderías porcinas de Castilla y León, así como la proporción de los serotipos de esta especie en dichas ganaderías y qué factores de virulencia presenta cada serotipo encontrado.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Aislamiento e identificación, a partir de lesiones neumónicas obtenidas en ganaderías porcinas, de cepas de *S. suis*.
2. Amplificación, a partir de PCR, del material genético de los aislados obtenidos con el fin de realizar una caracterización molecular, tanto para la confirmación de *Streptococcus suis* como para la identificación de su serotipo.
3. Estudio, a partir de PCR, de los factores de virulencia más importantes de esta bacteria presentes en las cepas aisladas.

### **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **4.1. Instalaciones**

Este estudio se realizó desde el mes de septiembre de 2019 hasta el mes de febrero de 2020 y tuvo lugar en la Unidad de Microbiología e Inmunología de Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León. En un primer momento, se necesitó un periodo de adaptación para poder llegar a conocer la rutina de laboratorio, buenas prácticas

de laboratorio y manejo con bioseguridad. También fue necesario este tiempo para conocer las técnicas moleculares que se iban a llevar a cabo en el trabajo y su puesta a punto.

Debido a la crisis del COVID-19, no se pudo seguir con el estudio después de febrero del 2020. Por ello, se utilizaron los datos recogidos hasta dicha fecha quedando un muestreo pequeño y determinando este estudio como preliminar.

#### **4.2. Obtención de muestras**

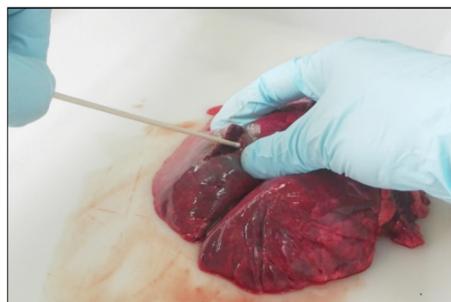
Los aislados se obtuvieron a partir de muestras enviadas por distintas empresas veterinarias de distintas ganaderías porcinas. Dichas muestras llegaban a una temperatura de 4°C con el fin de evitar la contaminación por bacterias ambientales, siendo la más común la contaminación por *Proteus spp.*. Sin embargo, muchas de las muestras recibidas estaban contaminadas y resultó imposible la identificación del microorganismo deseado (*S. suis*). Por tanto, se obtuvieron más aislados de los utilizados en este estudio (un total de 38), pero solo fueron útiles 25 de los mismos.

Al final del proceso de identificación, se confirmaron 25 cepas de *S. suis* aisladas de animales enfermos fallecidos o sacrificados (tabla 1), que habían sido aisladas en distintas poblaciones de las provincias de León y Zamora (imagen 6).

#### **4.3. Cultivo bacteriano a partir de las muestras**

Una vez recibidas las muestras a 4°C se procedió al aislamiento de las bacterias presentes. Para ello, se esterilizaron las superficies de pulmón y encéfalo, cauterizando la zona en cuestión, con una espátula previamente calentada en la llama de un mechero.

El criterio de elección de la zona a cauterizar fue basado en la localización de las áreas con mayor grado de lesiones. Sobre la zona elegida se realizó un corte con un bisturí estéril. A través de dicho corte se introdujo un hisopo estéril. La primera vez para sembrar el material obtenido en una placa de agar sangre y la segunda, para hacer lo propio en agar chocolate (figura 3).

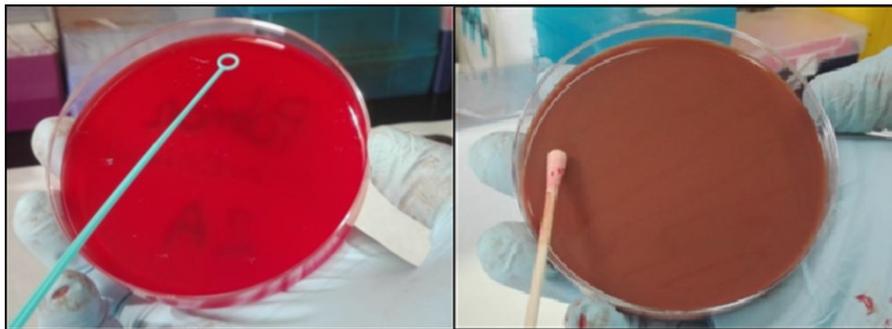


**Figura 3.** Introducción de hisopo sobre lóbulo pulmonar para toma de muestra

**CULTIVO EN AGAR CHOCOLATE:** Este medio de cultivo contiene sangre previamente tratada con calor a 80 °C, de manera que los eritrocitos se lisan, liberando al agar el contenido de su interior (incluyendo el NAD<sup>+</sup>, indispensable para el crecimiento de ciertas bacterias).

El primer aislamiento, llevado a cabo con un hisopo impregnado de material pulmonar, se realizó pasando el mismo en zigzag a lo largo de la placa. En el segundo aislamiento, se tomaron con un asa de siembra algunas colonias resultantes del crecimiento de la placa anterior y se efectuó una siembra por agotamiento (Imagen 2)

**CULTIVO EN AGAR SANGRE:** Se trata de un medio de agar común, como el Agar Columbia, al cual se le añade sangre, normalmente de equino. Las bacterias con hemolisinas pueden acceder al contenido de glóbulos rojos, obteniendo nutrientes necesarios para su crecimiento, por ejemplo, el NAD<sup>+</sup>. La zona afectada por las hemolisinas de estas bacterias será más clara. Por tanto, estos medios son útiles para la observación de la actividad hemolítica de los microorganismos (figura 4).



**Figura 4.** Siembra en medio de agar sangre (izda.) y de agar chocolate (dcha.)

Todas las placas se incubaron en condiciones de microaerofilia, durante al menos 24 horas, a 37 °C. Al día siguiente, se observaron las colonias obtenidas en las placas y aquellas que, por su morfología, parecían compatibles con *S. suis* se resembraron en las mismas condiciones a fin de conseguir cultivos puros. A partir de cultivos puros, se recogió una pequeña cantidad con un asa de siembra con un doble objetivo: por un lado, congelar el aislado a -80 °C para volver a utilizarlo si fuera necesario; por otro, extraer ADN del mismo para poder llevar a cabo las reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs).

#### **4.4. Congelación de bacterias a partir de cultivos en medio sólido**

Las cepas bacterianas anteriormente aisladas se mantuvieron a -80 °C en medios de congelación. Se partió de un cultivo puro, es decir, de las placas procedentes del segundo aislamiento. Se recogió la mayor cantidad posible de bacterias con un asa de siembra y se

depositó en un “eppendorf” con el correspondiente medio de congelación, se agitó la preparación para homogeneizarla. Se cerraron los tubos, se rotularon y se colocaron en el congelador a -80 °C. Con el fin de trabajar en condiciones de asepsia, este proceso fue llevado a cabo en la proximidad de un mechero o en una cabina de bioseguridad. Este proceso es importante para ir completando un cepario en el laboratorio de Microbiología del Departamento de Sanidad Animal. Los medios de congelación estuvieron compuestos por:

- Leche descremada: 20,00 g
- Triptona: 10,00 g
- Glicerol: 80,00 ml

#### **4.5. PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular en la que el principal objetivo es la amplificación de un determinado fragmento de ADN para la obtención de un elevado número de copias del mismo y así poder detectarlo. Esta técnica fue utilizada para caracterizar a *S. suis*, identificar los serotipos a los que pertenecen las cepas del estudio mediante la utilización de cebadores específicos para cada serotipo (tabla 2) y lo mismo para determinar factores de virulencia (tabla 3).

Para llevar a cabo la caracterización molecular se realizaron diferentes PCR con el objetivo de amplificar determinados genes concretos. Para la identificación de especie se amplificó el gen *gdh* (glutamato deshidrogenasa), de 688pb (Okwumabua *et al.*, 2003). Para la identificación de serotipo (puesto que *S. suis* cuenta con cerca de 32 serotipos distintos) se realizan 4 rondas de amplificación por PCR y además se amplificarán 5 factores de virulencia: *epf* (factor extracelular), *mrp* (proteína relacionada con la muramidasa), *sly* (suilisina) y *luxS*

Los diferentes reactivos de los que se compone una PCR son los siguientes:

- Agua libre de nucleasas (Water, Sigma. Ref. W4502)
- Tampón 10x (Tris HCl 16 mM pH 8, KCl 50 Mm, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, glicerol 50% v/v)
- MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM
- Cebador directo 20 pmol
- Cebador reverso 20 pmol
- dNTP 0,1 mM
- *Taq* polimerasa 2,5 v (Biotools. Ref 10047)

La mezcla de estos reactivos en las proporciones establecidas dio lugar a un Master Mix. Cada muestra de PCR estaba compuesta por 47  $\mu\text{L}$  de Master Mix y 3  $\mu\text{L}$  de ADN de la cepa de *S. suis* que correspondía. Estas muestras tenían que acompañarse siempre de un control positivo, en el que los 3  $\mu\text{L}$  de ADN se corresponden con un aislado (de *S. suis*) del cepario positivo al gen que se pretende estudiar. De igual modo, siempre debía incluirse un control negativo, en el cual los 3  $\mu\text{L}$  de ADN son sustituidos por  $\text{H}_2\text{O}$ .

Después de preparar las muestras, estas eran colocadas en un termociclador -Eppendorf<sup>®</sup> - y se iniciaba el programa de termociclación adecuado.

Para la identificación de aislados de *S. suis*, el programa empleado consistió en 5 minutos de desnaturalización inicial a 94 °C, 1 minuto de anillamiento a 55 °C y 1 minuto de extensión a 72 °C. La extensión final se realizó durante 7 minutos a 72 °C.

Todos los aislados que fueron identificados se tipificaron usando una PCR multiplex que fue llevada a cabo independientemente en cuatro rondas (Kerdsin *et al.*, 2014). La primera ronda incluía los cebadores para los serotipos ½, 1, 2, 3, 7, 9, 11, 14, y 16; la segunda para los serotipos 4, 5, 8, 12, 18, 19, 24 y 25; la tercera para los serotipos 6, 10, 13, 15, 17, 23, y 31, y la cuarta ronda incluía los cebadores para los serotipos 21, 27, 28, 29 y 30.

El programa para dichas rondas consistió en una desnaturalización inicial del ADN a 95 °C durante 3 minutos; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 20 segundos, anillamiento y extensión a 62 °C durante 90 segundos, y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Los 25 aislados de *S. suis* fueron investigados posteriormente para los factores de virulencia mediante una PCR de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente. Los cinco genes testados fueron *epf* (codificante para un factor extracelular- Silva *et al.*, 2006-), *mrp* (proteína relacionada con la liberación de la muramidasa –Silva *et al.*, 2006-), *sly* (codificante para la suilisina –Staats *et al.*, 1999-) y *luxS* (codificante para la S-ribosilhomocisteinasa –Wang *et al.*, 2011-).

El programa del termociclador fue diferente para cada factor de virulencia, siendo así:

- *mrp*: la amplificación se realizó con una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 63 °C, 1 minuto y 30 segundos a 72 °C y extensión final de 2 minutos a 72 °C.

- *epf*: desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58 °C, 2 minutos y 30 segundos a 72 °C y una extensión final de 2 minutos a 72 °C.
- *sly*: 10 minutos de desnaturalización inicial a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56 °C y 1 minuto a 72 °C con una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.
- *luxS*: 5 minutos a 94 °C, seguidos de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 40 segundos a 72 °C, con una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

#### **4.6. Electroforesis**

La electroforesis es una técnica de biología molecular, basada en la separación de moléculas según su movilidad en un campo eléctrico. Una vez realizado el programa de termociclación, se cargaban las muestras en el gel de agarosa previamente preparado con el fin de llevar a cabo la electroforesis. El gel es la matriz porosa utilizada para la separación de las moléculas.

##### **a) Preparación del gel de agarosa**

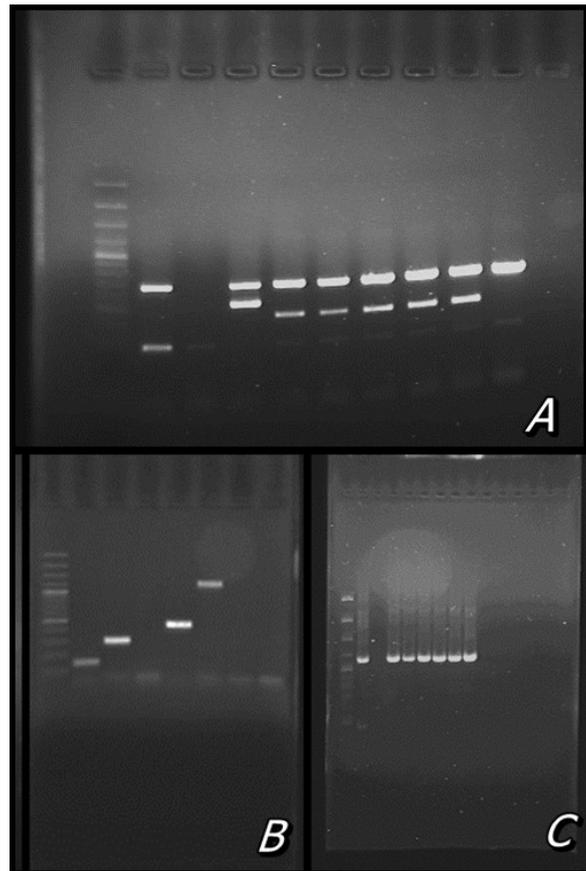
Para preparar dicho gel, se pesaban 0,5 g de agarosa en un matraz o en un papel de aluminio. Se añadían 50 ml de TBE 1x –disolución de tampón compuesta por Tris, Borato y EDTA- en una probeta. Los dos componentes se mezclaban en un matraz y se calentaban en un horno de microondas. Una vez que la mezcla empezaba a hervir, se retiraba y se agitaba hasta que el líquido resultante se volviera traslúcido. Después de enfriar ligeramente el matraz, se le añadía el agente intercalante –RedSafe™ 3 µL-, se mezclaba hasta obtener una mezcla homogénea y se llenaba la cubeta, eliminando las burbujas que iban apareciendo. En último lugar, se esperaba a que el gel se volviera sólido.

##### **b) Carga de las muestras en el gel**

Una vez que el gel hubiera solidificado, se quitaba el peine que formaba los pocillos donde se iban a cargar las muestras, se traspasaba el gel a la cubeta de electroforesis y se enrasaba con TBE 1x. Se añadía el marcador molecular –Gene Ruler™ 1000 bp Plus- y el tampón de carga- Loading DNA Buffer™ 6x LD- con cada una de las muestras, de las que se cargaban 10 µL. La cubeta de electroforesis se cerraba, se encendía la fuente de alimentación, se fijaban los voltios a 100V y el proceso se iniciaba, dejando durante al menos treinta minutos que las muestras migrasen.

### c) Lectura de resultados

Se determinaba la presencia de las muestras de interés de la PCR en un transiluminador. El transiluminador es una máquina que utiliza luz ultravioleta con diferentes longitudes de onda como recurso para analizar distintas moléculas en geles de agarosa. La banda de amplificación del tamaño esperado debía estar presente siempre en el control positivo y ausente en el control negativo (figura 5).



**Figura 5.** Resultado en gel de una PCR de caracterización para *S. suis* con el gen *gdh* (695 pb) (A). Resultado en gel de una PCR multiplex de primera ronda, mostrando (de izquierda a derecha) los serotipos 7, 9 y 2. Se utilizó un control positivo para el serotipo 3 y un control negativo (a la derecha) (B). Resultado en gel de una PCR para el factor de virulencia *mrp* (C).

## 5. RESULTADOS

El número total de cepas obtenidas a partir de los aislados pulmonares fue de 25. De todas ellas, 7 fueron de la provincia de León y 18 de la provincia de Zamora (figura 6). A continuación, se detallarán los resultados obtenidos a partir de los diferentes métodos llevados a cabo en el presente trabajo.

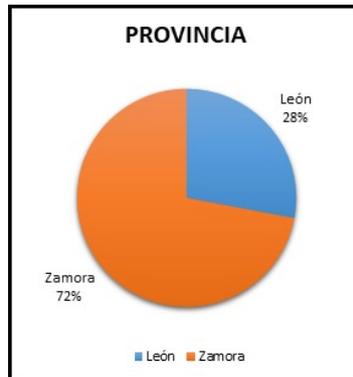


Figura 6. Proporción de muestras aisladas en las distintas poblaciones.

### 5.1. Resultados de la serotipificación

De las veinticinco muestras (tabla 4), un total de siete no fueron identificadas, representando un 28%. El 24% de las muestras fueron identificadas como serotipo 2 (seis de las veinticinco muestras), el 12% como serotipo 7 (tres de las veinticinco muestras), el 8% como serotipo 9 (dos de las veinticinco muestras) y el 4% como serotipo 3, 4, 5, 8, 12, 18 o 19 respectivamente (una de las veinticinco muestras) (figura 7).

Teniendo en cuenta estos porcentajes, podemos afirmar que en este estudio el serotipo 2 resultó ser el más frecuente, seguido por los serotipos 7 y 9. Sin embargo, la mayoría de las muestras resultaron no tipificables.



Figura 7. Resultados obtenidos mediante PCR multiplex para la serotipificación de las 25 muestras de *S. suis*.

## 5.2. Resultados de los factores de virulencia

Como se puede observar en la tabla 4:

- *epf*: tres de las veinticinco muestras contenían este factor de virulencia, representando el 12%.
- *mrp*: quince de las veinticinco muestras lo contenían, representando el 60%.
- *sly*: diez de las veinticinco muestras lo contenían, representando el 40%.
- *luxS*: veintiuna de las veinticinco muestras lo contenían, representando el 84%.

Solamente en el aislado que resultó serotipo 4 están presentes todos los factores de virulencia analizados. A su vez, uno de los aislados no presentaba ninguno de los factores de virulencia analizados, esto podría indicar que este aislado es avirulento y que podría ser comensal en vez de patógeno. El genotipo más frecuente entre las muestras analizadas en este trabajo resultó *epf-/mrp+/sly-/luxS+*, siendo el factor *luxS* el más frecuente entre los aislados (tabla 5). Teniendo en cuenta los resultados, no se puede establecer una relación entre los serotipos y los factores de virulencia, estos no siguen ningún patrón concreto. Para llegar a establecer una relación se debería aumentar el tamaño de la muestra con el fin de tener unos resultados más significativos.

**Tabla 5.** Factores de virulencia analizados con todas sus posibles combinaciones.

Factor de virulencia	Nº de aislados	Porcentaje
<i>epf</i>	3	12%
<i>mrp</i>	15	60%
<i>sly</i>	10	40%
<i>luxS</i>	21	84%
<i>epf-mrp</i>	2	8%
<i>epf-sly</i>	3	12%
<i>epf-luxS</i>	2	8%
<i>mrp-sly</i>	8	32%
<i>mrp-luxS</i>	13	52%
<i>sly-luxS</i>	8	32%
<i>epf-mrp-sly</i>	2	8%
<i>epf-mrp-luxS</i>	1	4%
<i>epf-sly-luxS</i>	2	8%
<i>epf-mrp-sly-luxS</i>	1	4%
<b>Total</b>	25	100%

## 6. DISCUSIÓN

Una de las consideraciones que se deben tener en cuenta en este estudio es el tamaño de la muestra. Se analizaron un total de 25 aislados, todos ellos procedentes de Catilla y León, concretamente de las provincias de León y Zamora (imagen 6). Con el objetivo de obtener unos resultados más representativos, a nivel autonómico y nacional, sería necesario un estudio más amplio que incluyese un mayor número de aislados. También es preciso señalar que, debido a que las muestras provenían de distintas ganaderías porcinas –y España es uno de los países con mayor consumo de antibióticos a nivel europeo (European Medicines Agency, 2016)- resulta muy probable que los cerdos de los que se obtuvieron las muestras fueran originarios de ganaderías en las que se llevaran a cabo tratamientos con antimicrobianos.

En contraste con estudios anteriores como el llevado a cabo por Yamada *et al.* (2018), gran parte de las muestras fueron identificadas como *S. suis*, llegando al total de las 25 muestras que han sido analizadas en este estudio.

Existe un porcentaje de cepas que son consideradas no tipificables por la incapacidad de clasificarse en alguno de los serotipos descritos actualmente, debido a la ausencia de cápsula o por corresponder a nuevos serotipos aún no descritos. En Canadá entre 2008 y 2011, Gottschalk *et al.* (2013) indicaron porcentajes variables, que variaban entre un 15% y un 33%, destacando que un elevado porcentaje (89%) de dichas cepas no tipificables eran probablemente no capsuladas. En el estudio realizado por Werinder *et al.* se señala que la mayoría de las cepas estudiadas fueron no tipificables, como en el presente trabajo.

Estudios anteriores han demostrado que la prevalencia y la distribución de los serotipos varía según la zona geográfica. A pesar de esto, el serotipo 2 es el que tiene más prevalencia, estando ampliamente distribuido por todo el mundo. En España, el serotipo 2 es el serotipo dominante, con porcentajes de aislamiento variables según el estudio que pueden oscilar entre el 22% y el 50% (Prieto *et al.*, 1993; Tarradas *et al.*, 1994; Luque *et al.*, 1999; Wisselink *et al.*, 2000). En este estudio ha resultado también el serotipo más abundante.

En otros países europeos como Francia o Italia, también ha sido considerado como el serotipo más frecuente (Berthelot-Hérault *et al.*, 2000; Wisselink *et al.*, 2000; Princivalli *et al.*, 2009), así como en los países asiáticos. En Dinamarca, también ha sido destacado como uno de los serotipos más frecuentes, a pesar de que el serotipo 7 ha sido frecuentemente asociado con procesos clínicos en este país (Tian *et al.*, 2004; Aarestrup *et al.*, 1998a; Aarestrup *et al.*, 1998b). En países como Bélgica, Países Bajos y Alemania, el serotipo 2 está siendo desplazado

en los últimos años por el serotipo 9, aumentando su prevalencia en dichas naciones (Jacobs *et al.*, 1995; Wisselink *et al.*, 2000; Allgaier *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006; Rehm *et al.*, 2007; Schultsz *et al.*, 2012). Asimismo, en España se está experimentando un incremento del serotipo 9 como serotipo responsable de muchos de los casos clínicos (Allgaier *et al.*, 2001; Perea *et al.*, 2003; Vela *et al.*, 2003; Tarradas *et al.*, 2004). Después del serotipo 2, los serotipos 7 y 9 resultaron los más frecuentes en este estudio.

En cuanto a los factores de virulencia, en estudios anteriores se ha investigado la presencia de las proteínas asociadas a la virulencia mediante la detección de los genes que codifican para las mismas. Tanto en Alemania como en Italia, el genotipo *mrp+/epf+/sly+* ha sido el más prevalente asociado con cepas invasivas de serotipo 2 (Rehm *et al.*, 2007; Princivalli *et al.*, 2009). Del mismo modo, en los países asiáticos se ha asociado la presencia de estas proteínas con las cepas clínicas de serotipo 2. Wei *et al.* (2009), así como Tang *et al.* (2011), señalaron que el genotipo *mrp+/epf+/sly+* era el más prevalente. Asimismo, Rui *et al.* (2012) también hallaron *mrp+/epf+* con la presencia de *sly* variable como genotipo más frecuente. Por el contrario, en el presente trabajo no se cumplen estas relaciones de prevalencia, siendo el genotipo *mrp+/sly+* con una presencia de *epf* variable el más prevalente.

Por otro lado, también se estudió el factor de virulencia *luxS*, obteniendo como resultado que la mayoría de las muestras eran *luxS+*.

## 7. CONCLUSIONES

Este estudio ha sido útil para conocer los serotipos más frecuentes de *S. suis* en la ganadería porcina, así como los factores de virulencia que poseen. Importante recalcar que es un estudio previo (debido al bajo número de muestras analizadas) de un estudio más completo con mayor número muestral que se debería hacer. Después de analizar los resultados se puede concluir:

1. *S. suis* está muy presente en las explotaciones de ganado porcino y por eso hemos sido capaces de aislar 25 muestras positivas de las 38 analizadas.
2. Pese a las diferentes rondas de amplificación para determinar el serotipo de las cepas, 7 no pudieron definirse en ningún serotipo.
3. El serotipo 2 fue el más prevalente, seguido por el 7 y el 9.
4. El gen *luxS*, fue el factor de virulencia más dominante, estando presente en la mayoría de los aislados y solo una cepa de las estudiadas presentó todos los factores de virulencia estudiados.

## 8. REFERENCIAS

- Beteta López, A., Vega Prado, L., Martínez Alarcón, J., Alba García, F., Blanco Jarava, A., Galiana Ivars, A. (2018) Meningitis por *Streptococcus suis*: ¿una zoonosis emergente? Revista del Laboratorio Clínico 11(2), pp. 104-111.
- Boyle, B., Vaillancourt, K., Bonifait, L., Charette, S. J., Gottschalk, M., Grenier, D. (2012) Genome sequence of the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2 strain S735. American Society for Microbiology Journals 194(22), pp. 6343-6344.
- Brockmeier, S. L., Halbur, P. G. y Thacker, E. L. (2002) "Porcine Respiratory Disease Complex", en Brodgen, K. y Guthmiller, J. (eds.) Polymicrobial Diseases. Washington (DC): ASM Press, pp. 1-24.
- Cloutier, G., D'Allaire, S., Martinez, G., Surprenant, C., Lacouture, S., Gottschalk, M. (2003). Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infections in a pig herd with and without clinical disease. Veterinary microbiology 97(1-2), pp. 135-51.
- Davies, P.R., Ossowicz, C.J. (1991) Evaluation of methods used for detecting *Streptococcus suis* type 2 in tonsils, and investigation of the carrier state in pigs. Research in Veterinary Science 50(2), pp. 190-194.
- Denich, L., Farzan, A., Friendship, R., Arndt, E., Gottschalk, M., Poljak, Z. (2020) A case-control study to investigate the serotype of *S. suis* isolates by multiplex PCR in nursery pigs in Ontario, Canada. Pathogens 9(1), pp. 44.
- Estrada, A. A., Gottschalk, M., Rossow, S., Rendahl, A., Gebhart, C., Marthaler, D. G. (2019) Serotype and genotype (multilocus sequence type) of *Streptococcus suis* isolates from the United States serve as predictors of pathotype. Journal of Clinical Microbiology 57(9), pp. 1-16.
- Gottschalk, M., Segura, M. (2000). The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. Veterinary microbiology 76(3), pp. 259-72.
- Gottschalk, M., Xu, J., Calzas, C. Segura, M. (2010). *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? Future Microbiology 5, pp. 371-391.
- Goyette-Desjardins, G., Auger, J., Xu, J., Segura, M., Gottschalk, M. (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 & Infections 3(6), pp. 1-20.
- Hansen, M. S., Pors, S. E., Jensen, H. E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E. M. y Nielsen, O. L. (2010) "An Investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark", Journal of Comparative Pathology. W.B. Saunders, 143(2-3), pp. 120-131.
- Higgins, R., Gottschalk, M. (1990). An update on *Streptococcus suis* identification. Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc., 2(3), pp. 249-252.
- Hommez, J., Devriese, L.A., Henrichsen, J., Castryck, F. (1986) Identification and characterization of *Streptococcus suis*. Veterinary Microbiology, 11(4), pp. 349-355.
- Huan, H., Jiang, L., Tang, L., Wang, Y., Guo, S. (2020) Isolation and characterization of *Streptococcus suis* strains from swine in Jiangsu province, China. Journal of Applied Microbiology, 128(6), pp. 1606-1612.
- Kerdsin, A., Dejsirilert, S., Akeda, Y., Sekizaki, T., Hamada, S., Gottschalk, M. & Oishi, K. (2012). Fifteen *Streptococcus suis* serotypes identified by multiplex PCR. Journal of Medical Microbiology 61, pp. 1669-1672.
- Kerdsin, A., Akeda, Y., Hatrongjit, R., Detchawna, U., Sekizaki, T., Hamada, S., Gottschalk, M., Oishi, K. (2014). *Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR. Journal of Medical Microbiology 63, pp. 824-830.

- Liu, Z., Zheng, H., Gottschalk, M., Bai, X., Lan, R., Ji, S., Liu, H. & Xu, J. (2013). Development of multiplex PCR assays for the identification of the 33 serotypes of *Streptococcus suis*. PLoS ONE 8.
- Luque, I., Blume, V., Borge, C., Vela, A. I., Perea, J. A., Márquez, J. M., Fernández-Garayzábal, J. F., et al. (2010). Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates recovered from diseased and healthy carrier pigs at different stages of production on a pig farm. Veterinary journal 186(3), pp. 396-398.
- Marois, C., Bougeard, S., Gottschalk, M. & Kobisch, M. (2004). Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs. Journal of Clinical Microbiology 42, pp. 3169-3175.
- Okwumabua, O., O'Connor, M., Shull, E. (2003). A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. FEMS Microbiology Letters 218(1), pp. 79-84.
- Rui, P., Zhang, Z., Ma, Z., Fang, H., Yang, W., Zhang, X., Chen J., Jia, Q. (2012) Detection of virulence-associated factors of *Streptococcus suis* serotype 2 by PCR assay in Hebei, Province of China. African Journal of Microbiology Research 6(5), pp. 1061-1064.
- Sihvonen, L., Kurl, D. N., Henrichsen, J. (1988) *Streptococcus suis* isolated from pigs in Finland. Acta Veterinaria Scandinavica 29(1), pp. 9-13.
- Staats, J. J., Feder, I., Okwumabua, O., Chengappa, M. M. (1997). *Streptococcus suis*: past and present. Veterinary research communications, 21(6), pp. 381-407.
- Thongkamkoon, P., Kiatyingangsulee, T., Gottschalk, M. (2017) Serotypes of *Streptococcus suis* isolated from healthy pigs in Phayao Province, Thailand. BMC Research Notes 10(1), pp. 53.
- Werinder, A., Aspán, A., Backhans, A., Sjölund, M., Guss, B., & Jacobson, M. (2020). *Streptococcus suis* in Swedish grower pigs: Occurrence, serotypes, and antimicrobial susceptibility. Acta Veterinaria Scandinavica, 62(1), 1–9.
- Yamada, R., Tien, L. H. T., Arai, S., Tohya, M., Ishida-Kuroki, K., Nomoto, R., Kim, H., Suzuki, E., Osawa, R., Watanabe, T., & Sekizaki, T. (2018). Development of PCR for identifying *Streptococcus parasuis*, a close relative of *Streptococcus suis*. Journal of Veterinary Medical Science, 80(7), 1101–1107.
- Zhang, A., Yang, M., Hu, P., Wu, J., Chen, B., Hua, Y., Yu, J., et al. (2011). Comparative genomic analysis of *Streptococcus suis* reveals significant genomic diversity among different serotypes. BMC genomics 12, pp. 523.

## 9. ANEXOS

**Tabla 1.** Cepas de *S. suis* utilizadas en este trabajo.

Referencia	Año	Lesión	Órgano
L6318.1	2019	Signos respiratorios, cojeras	Pulmón, articulaciones
LE0412.2	2019	Signos respiratorios	Pulmón
LE0412.6	2019	Signos respiratorios	Pulmón
UVES30.5.18_1	2019	Signos respiratorios	Pulmón
MATb15.1.19_1	2020	Signos respiratorios, encefalitis, cojeras	Pulmón, articulaciones, encéfalo
MATb15.1.19_3	2020	Signos respiratorios, encefalitis, cojeras	Pulmón, articulaciones, encéfalo
MATb15.1.19_4	2020	Signos respiratorios, encefalitis, cojeras	Pulmón, articulaciones, encéfalo
Z6318.4	2019	Signos respiratorios, encefalitis	Pulmón, encéfalo
Z18418.3	2019	Signos respiratorios	Pulmón
Z0412.7	2019	Signos respiratorios, encefalitis	Pulmón, encéfalo
COBA31.01.18_1	2019	Signos respiratorios	Pulmón
COBA6.2.18_1A	2019	Signos respiratorios, septicemia	Pulmón
COBA7.2.18_3	2019	Signos respiratorios, cojeras, aparentes signos nerviosos	Pulmón, articulaciones
COBA8.2.18_2B	2019	Encefalitis, signos nerviosos	Encéfalo, articulaciones
COBA8.2.18_2D	2019	Encefalitis, signos nerviosos	Encéfalo, articulaciones
COBA13.2.18B_1	2019	Signos respiratorios	Pulmón
COBA13.2.18B_2	2019	Signos respiratorios	Pulmón
COBA5.4.18_3	2019	Signos respiratorios, encefalitis, cojeras	Pulmón, articulaciones, intestino
COBA5.4.18_6	2019	Signos respiratorios, encefalitis, cojeras	Pulmón, articulaciones, intestino
COBA 13.4.18_2	2019	Signos respiratorios, cojeras, aparentes signos nerviosos	Pulmón, encéfalo, articulaciones, intestino
COBA18.4.18_1	2019	Signos respiratorios	Pulmón
COBA9.5.18_1	2019	Signos respiratorios, cojeras	Pulmón, articulaciones, intestino
COBA20.2.19_1	2020	Encefalitis, cojeras	Pulmón, encéfalo, articulaciones
COBA20.2.19_5	2020	Encefalitis, cojeras	Pulmón, encéfalo, articulaciones
COBA20.2.19_7	2020	Encefalitis, cojeras	Pulmón, encéfalo, articulaciones

**Tabla 2.** Cebadores usados en las PCR multiplex para la caracterización y la serotipificación, modificación del trabajo Kerdsin *et al.*, 2014.

Ronda de reacción en la PCR multiplex	Secuencia (5'-3')	Serotipo	Longitud de los productos de la PCR (pb)
Todas las reacciones	F: TTCTGCAGCGTA TTCTGTCAAACG R: TGTTCATGGACAGATAAAGATGG	Gen gdh	695
1	F: AATCATGGAATAAA GCGGAGTACAG R: ACAATTGATACGTCAAAATCCTCACCC	1, 14	550
1	F: GATTTGTCTGGGAGGGTTACTTG R: TAAATAA TA TGCCACTGTAGCGTCTC	2, 1/2	450
1	F: TGGGAGAAGGCAGAAA GTACGAGA R: ACCCCAGAAAGAGCCGAAGGA	3	1273
2	F: ACTTGGA GTTGTCTGGAGTAGTGCT R: ACCCGCATGGA TAGGCCGAC	4	783
2	F: TGATGGCGGAGTTTGGGTCGC R: CGTAACAACCGCCCAGCCG	5	166
3	F: TACGGTCTCCCTTGCCTGTA R: AACTCAGCTAGTGCTCCACG	6	325
1	F: GATGATTTATGGCA CCCGAGTAAGC R: AGTCACAATTGCTGGTCTGACACC	7	150
2	F: ATGGGCGTTGGCGGGA GTTT R: TTACGGCCCCATCACGCTG	8	320
1	F: GGGATGATTGCTCGACAGAT R: CCGAAGTATCTGGGCTACTG	9	300
3	F: TTAGAGGGGATTCTGGGGT R: CGGGACAA CAGATGGAACCT	10	153
1	F: TACA GTCTTGCAGCCCTAC R: CGACTGTCTGCTGCCTGAT	11	896
2	F: TGTGGCGATA GACAA CAGG R: ACCAAGAAGTTTCCGCCTGA	12	209
3	F: CTGGTCTGCAATTTTCGCTT R: GCAGACTAGCTGCA GTTCCA	13	1135
3	F: GCAAGAAAGCTTCCGGATGGA R: CAAGA GAGTGTGCAACCCCA	15	274
1	F: TGGAGGAGCATCTACAGCTCGGAAT R: TTTGTTTGCTGGAATCTCAGGCACC	16	202
3	F: ACTTGGGTTGGAATGGCGAA R: ACCACCGAAAGTCA GGTAC	17	906
2	F: CGGGCAGTCTTACTCATGG R: ATGACAGCGAAACGGACAGA	18	432
2	F: AGCAGGGTTGCGTATGGCGG R: ACAAGCACCAGCAAAGACC GCA	19	1024
4	F: GGTGGCAAGGAGGCA AAGT R: ACATGTAAGCCATTGCTGGA	21	325
3	F: TGCTCAACAAACGCAGCAAA R: TGACTGGTACATCTGCAGCC	23	454
2	F: ACCCGGAAA AACCAGGAGTT R: ACCAATCAATGCCAAGCGAC	24	500
2	F: GGAGGAGCTGCGGGCTCATA R: TGGCCACAACCTGGATGCGTT	25	1211
4	F: CTACGCCAATCGAAGCCAGA R: CCAGTAAGAA GCCTGTCGCA	27	506
4	F: GGACTTCCGTACCTTAGCGT R: CTCCAGCACATTCCCGTACC	28	865
4	F: GTGCGGGCGTTA TTTTGGT R: AGCCTTGCAACCCATTTCCT	29	435
4	F: CTTAATTGCTTGCGCCCGT R: ATTCGGGTACCCATTGCAG	30	170
3	F: GGAGTGTCTATGCCACCTT R: GCATTGCCCTACAGCAAAC	31	550

**Tabla 3.** Cebadores utilizados para la PCR multiplex para los factores de virulencia de *S. suis* estudiados.

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Secuencia</b>
<i>mrp</i>	F: 5'-GACAGATGGTGAGGAAAATGG-3' R: 5'-TGAGCTTTACCTGAAGCGGT-3'
<i>epf</i>	F: 5'-CGCAGACAACGAAAGATTGA-3' R: 5'-AAGAATGTCTTTGGCGATGG-3'
<i>sly</i>	F: 5'-AAGTCGACATGAGAAAAAGTTCGCAC-3' R: 5'-AACTGCAGGATTACTCTATCACCTCA-3'
<i>luxS</i>	F: 5'-TTATCCAACCCAACGAAA-3' R: 5'-CAGGAACATCCTCCAAG-3'

**Tabla 4.** Resultados obtenidos de la identificación bacteriana, serotipificación y factores de virulencia

Aislado	Fecha	Localidad	Provincia	Identificación bacteriana	Serotipo	Método	<i>epf</i>	<i>mrp</i>	<i>sly</i>	<i>luxS</i>
L6318.1	06/09/2019	San Adrián del Valle	León	<i>S. suis</i>	NO ID.	gdh	No	Si	No	Si
LE0412.2	04/12/2019	Quintana y Congosto	León	<i>S. suis</i>	2	gdh	No	Si	No	Si
LE0412.6	04/12/2019	Quintana y Congosto	León	<i>S. suis</i>	2	gdh	No	Si	No	Si
UVES30.5.18_1	30/09/2019	Villaquejida	León	<i>S. suis</i>	4	gdh	Si	Si	Si	Si
MATb15.1.19_1	15/01/2020	Toral de los Guzmanes	León	<i>S. suis</i>	7	gdh	No	Si	No	Si
MATb15.1.19_3	15/01/2020	Toral de los Guzmanes	León	<i>S. suis</i>	NO ID.	gdh	No	Si	Si	Si
MATb15.1.19_4	15/01/2020	Toral de los Guzmanes	León	<i>S. suis</i>	NO ID.	gdh	No	No	No	Si
Z6318.4	06/09/2019	San Pedro de Ceque	Zamora	<i>S. suis</i>	5	gdh	No	No	Si	Si
Z18418.3	18/10/2019	Cubo de Benavente	Zamora	<i>S. suis</i>	NO ID.	gdh	No	No	No	Si
Z0412.7	04/12/2019	Fuentes de Ropel	Zamora	<i>S. suis</i>	12	gdh	No	No	No	Si
COBA31.01.18_1	31/11/2019	Uña de Quintana	Zamora	<i>S. suis</i>	7	gdh	No	Si	No	Si
COBA6.2.18_1A	06/10/2019	Cubo de Benavente	Zamora	<i>S. suis</i>	3	gdh	No	Si	Si	No
COBA7.2.18_3	07/11/2019	La Bóveda de Toro	Zamora	<i>S. suis</i>	19	gdh	No	No	No	No
COBA8.2.18_2B	08/12/2019	Zamora	Zamora	<i>S. suis</i>	NO ID.	gdh	No	No	No	Si
COBA8.2.18_2D	08/12/2019	Zamora	Zamora	<i>S. suis</i>	2	gdh	Si	Si	Si	No
COBA13.2.18B_1	13/12/2019	Villamor de los Escuderos	Zamora	<i>S. suis</i>	2	gdh	No	Si	Si	Si
COBA13.2.18B_2	13/12/2019	Villamor de los Escuderos	Zamora	<i>S. suis</i>	9	gdh	No	Si	Si	Si
COBA5.4.18_3	05/11/2019	Venialbo	Zamora	<i>S. suis</i>	2	gdh	No	Si	Si	Si
COBA5.4.18_6	05/11/2019	Venialbo	Zamora	<i>S. suis</i>	18	gdh	No	No	No	Si
COBA 13.4.18_2	13/10/2019	La Bóveda de Toro	Zamora	<i>S. suis</i>	NO ID.	gdh	No	No	No	Si
COBA18.4.18_1	18/10/2019	Villalazán	Zamora	<i>S. suis</i>	8	gdh	Si	No	Si	Si
COBA9.5.18_1	09/09/2019	Peleas de Arriba	Zamora	<i>S. suis</i>	2	gdh	No	Si	No	Si
COBA20.2.19_1	20/02/2020	Venialbo	Zamora	<i>S. suis</i>	9	gdh	No	Si	Si	Si
COBA20.2.19_5	20/02/2020	Venialbo	Zamora	<i>S. suis</i>	7	gdh	No	Si	No	Si
COBA20.2.19_7	20/02/2020	Venialbo	Zamora	<i>S. suis</i>	NO ID.	gdh	No	No	No	No