

# SEROTIPIFICACION DE CEPAS DE *STREPTOCOCCUS SUI*S AISLADAS DE CERDOS EN EXPLOTACIONES INTENSIVAS

---

Nancy Coronado, Bact.; Sandra Riaño, Bact.; Fernando Ariza B., MV, MS.;  
José D. Mogollón G., MV, Ph.D.\*

## RESUMEN

El propósito de esta investigación fue aislar, caracterizar y serotipificar cepa de *Streptococcus suis* de amígdalas y nariz de lechones entre 5 y 8 semanas de edad. Se procesaron 190 muestras, de las cuales 167 procedían de granjas porcinas de cría de tipo intensivo convencional, de Antioquia y Cundinamarca, con o sin historia de meningitis, y 23 cepas de diagnóstico presuntivo de *Streptococcus suis* pertenecientes a granjas porcinas venezolanas. Se aislaron 61 cepas procedentes de Antioquia y Cundinamarca y 12 de Venezuela compatibles con *S. suis*. Se serotipificaron 17 cepas de granjas colombianas pertenecientes a los serotipos 1, 2, 3, 4 y 8; 23 fueron no tipificables y 21 presentaron autoaglutinación. De las granjas venezolanas se tipificaron 6 cepas, 5 no tipificables y 1 cepa autoaglutinó. Las cepas aisladas de *S. suis* resultaron altamente sensibles a ampicilina, cloranfenicol y penicilina y presentaron resistencia a la lincomicina y tetraciclina. Se concluye que la serotipificación es una herramienta valiosa para el seguimiento epidemiológico de cepas endémicas o epidémicas en Colombia.

**Palabras Claves Adicionales:** *S. suis*, aislamiento, serotipificación.

\* Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana y Programas de Salud Animal y Biotecnología de CORPOICA e ICA, Apartado Aéreo 29743. Bogotá, D.C.

## ABSTRACT

## SEROTIPIFICATION OF STREPTOCOCCUS SUIIS STRAINS ISOLATED FROM SWINE INTENSIVE FARMS

The aim of this work was to isolate *Streptococcus suis* strains from nasal and tonsils swabs specimens obtained from 5 to 8 weeks piglets belonging to two pig rearing areas in Colombia (Antioquia and Cundinamarca). A total of 190 samples were collected. In addition, we also studied 23 strains of *Streptococcus sp.* obtained from some venezuelan pig farms. Initial screening of suspected *S. suis* cultures was achieved by conducting a panel of biochemical tests. This was followed by co-agglutination testing, using type specific antiseru prepared in rabbits for the final identification of strains. Sixty one strains were presumptive identified as *S. suis*. Only seventeen colombian strains were serotyped and belonged to serotypes 1,2,3,4,8. Twenty three strains were unty peable and 21 showed autoagglutination. Six venezuelan strains were typeable, 5 were untytypeable and 1 showed autoagglutination. It was found that *S. suis* strains were highly sensitive to ampicillin, chloranfenicol and penicillin. Resistance to lincomycin and tetracycline was observed. It was concluded that biochemical profiles and serotyping are important tools for epidemological studies of *S. suis* infection in Colombia.

**Additional Index Words:** *S. suis* isolate, serotyping.

---

**L**as infecciones con *Streptococcus suis* han sido descritas ampliamente en los países industrializados. Se le considera como un patógeno que no sólo ataca a los lechones jóvenes, sino que también afecta a bovinos, pequeños rumiantes, perros, gatos y seres humanos (Arends y Zanen, 1988; Higgins et al., 1995; Touil et al., 1988). Generalmente, su identificación se realiza mediante estudios morfológicos, bioquímicos y reacciones serológicas (Hommez et al., 1886). Este microorganismo comparte antígenos con el grupo D de los *Streptococcus* según la clasificación de Lancefield's, caracterizado porque posee ácido teicoico unido a un lípido intracelular y un polisacárido capsular específico, de acuerdo con el serotipo (Clifton-Hadley et al., 1980; Gottscharlk et al., 1991).

Debido a que el *S. suis* no se ha podido ubicar en ninguna de las seis categorías del género *Streptococcus* incluidas en el manual de Bergey's, ha sido asignado a la especie *Insertiae sedis* (Schleifer, 1986). Inicialmente se reconocieron nueve serotipos de *S. suis*, según la presencia de polisacáridos capsulares (Moor, 1963; Perch, 1983); luego se caracterizaron 14 nuevos tipos; después los serotipos 23 a 28 y muy recientemente, los serotipos 29 a 34 (Gottscharlk et al., 1991; Gottscharlk, et al., 1991; Higgins y Gottscharlk, 1990; Higgins y Gottscharlk, 1990). Los serotipos 1 y 2 son los más comunes, siendo el 2 el más virulento para los cerdos (Clifton-Hadley y Alexander, 1988; Erickson et al., 1984). Este serotipo también puede causar septicemias, meningitis y endocarditis en humanos.

Los mecanismos de patogenicidad del *S. suis* no han sido bien estudiados, excepto el polisacárido capsular (Gottscharlk et al., 1993; Higgins, 1990). Recientemente se demostró que dos características fenotípicas podrían determinar la virulencia de cepas de *S. suis* tipo 2. Estos rasgos se refieren a la presencia de una proteína de 136-kda que está presente en la pared celular llamada MRP (Muramidase release protein) y un factor extracelular también de naturaleza proteica de 110 kda denominado EF (*extracelular factor*). La mayoría de cepas aisladas de casos de meningitis con MRP + y EF+ y las cepas aisladas de amígdalas son portadores sanos MRP- y EF- (Vecht et al., 1992).

Diversas entidades nosológicas se han atribuido al *S. suis*. Estas incluyen: meningitis, artritis, septicemia, endocarditis valvular y bronconeumonía en porcinos y sordera como secuela en humanos (Clifton-Hadley et al., 1980; Hoffman y Hendersen, 1985; Windsor, 1977). En Colombia, a pesar de ser un problema creciente, se desconocen las características de dicho microorganismo, los métodos de diagnóstico, la epidemiología y las formas de tratamiento. Además, las pérdidas económicas por concepto de esta enfermedad pueden ser bastante cuantiosas; de hecho están afectando en forma severa la productividad de la industria porcina nacional.

Los propósitos primordiales de esta investigación fueron: a) aislar cepas de *S. suis* de lechones enfermos y de portadores sanos; b) serotipificar dichos aislamientos mediante las técnicas de aglutinación rápida en placa, precipitación en tubo capilar y coagulación; y c) establecer la sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos.

Los resultados obtenidos permitieron conocer la presencia de *S. suis* tipo 2 y otros serotipos en las granjas porcinas de tipo intensivo del país. Se concluyó que los perfiles bioquímicos y la serotipificación facilitarán el estudio de la epidemiología de esta infección en Colombia.

## MATERIALES Y METODOS

### Población Porcina y Colección de Muestras

El trabajo se realizó en cuatro granjas porcinas de cría de tipo intensivo convencional, localizadas en los departamentos de Antioquia (tres) y Cundinamarca (cuatro), cada una de las cuales poseía, en promedio, una población de 200 cerdas de cría.

En total se analizaron 190 muestras, de las cuales 167 provenían de Antioquia y Cundinamarca y 23 cepas de *Streptococcus sp.* aisladas de granjas venezolanas con antecedentes de meningitis. Para la elección de las granjas se tuvo en cuenta la historia sobre la presencia o no de meningitis.

Para la toma adecuada de muestras se utilizaron hisopos diseñados especialmente para tal fin; las muestras se llevaron en un medio de transporte Stuart modificado, para su posterior procesamiento en el laboratorio.

### Procesamiento de las Muestras

Las muestras recolectadas se sembraron en agar sangre y en un medio selectivo (Agar BHI más 4.3% de antisuero contra *S. suis* serotipo 2) para el aislamiento de este patógeno (Higgins y Gottscharlk, 1990; Hoffman y Hendersen, 1985; Perch *et al.*, 1983). Los medios se incubaron por espacio de 18 a 24 horas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub>, con el fin de observar claramente la hemólisis en agar sangre (Clifton-Hadley, 1984; Higgins y Mittal, 1990). Posteriormente, el medio selectivo se llevó a 4°C durante 72 horas para observar las zonas de precipitación alrededor de las colonias de *S. suis*, serotipo 2 (Mogollón y Pijoán, 1991). Las colonias que mostraron una morfología típica en el agar sangre, al igual que las colonias que presentaron halos de precipitación en el medio selectivo, se subcultivaron en agar sangre con el propósito de aumentar el crecimiento. Posteriormente se sometieron a coloración de Gram y a la prueba de catalasa (Clifton-Hadley y Enright, 1985; Erickson *et al.*, 1984; Hommez *et al.*, 1986). A los microorganismos, identificados al microscopio como cocos o diplococos Gram positivos ovales y prueba de catalasa negativa, se les realizaron pruebas bioquímicas que incluían: crecimiento en NaCl al 6.5%, acetoina (Voges Proskawer) y la fermentación de los siguientes azúcares: salicina, trealosa, manitol, sorbitol, glicerol, inulina, lactosa y sucrosa (Higgins y Gottscharlk, 1990; Higgins *et al.*, 1990; Hoffman y Hendersen, 1985). Se consideraron como *S. suis* las cepas que no crecieron en presencia de NaCl al 6.5%, dieron acetoina negativa, salicina, trealosa, positiva y dos azúcares más.

### Serotipificación del *S. Suis*

Se preparó un antisuero policlonal contra el serotipo 2 en conejos, el cual se utilizó para serotipificar los aislamientos realizados mediante las técnicas de aglutinación rápida en placa (Clifton-Hadley, 1988), precipitación en tubo capilar y coaglutinación (Higgins y Mittal, 1990).

El reactivo de coaglutinación se preparó contra los serotipos 1,2,3,4,5,7 y 8, según la técnica descrita por Mittal *et al.* (1983). La prueba de precipitación en tubo capilar se realizó según el método descrito por Clifton-Hadley *et al.* (1980).

### Sensibilidad Antimicrobiana

Una vez identificadas las cepas de *S. suis*, se realizó la prueba de sensibilidad antimicrobiana según el método de Kirby Bauer (Bauer *et al.*, 1966). El medio utilizado fue el agar Mueller Hinton suplementado con sangre de oveja o bovina al 5%. Los agentes antimicrobianos y su concentración en los discos fueron: ampicilina (10 µg), penicilina (1.5 unidades), gentamicina (10 µg), lincomicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg) y sulfamethoxazole trimetropím.

## RESULTADOS

Se aislaron e identificaron 61 cepas (36.52%) compatibles con *S. suis*, de las 167 muestras procedentes de granjas porcinas intensivas de Antioquia y Cundinamarca y 12 (52.17%) de las 23 muestras procedentes de Venezuela (Tabla 1).

De las 61 muestras compatibles con *S. suis*, 57 (93.44%) fueron aisladas de portadores sanos y 4 (6.55%) procedían de cerdos con signos clínicos de la enfermedad en el momento de la toma de la muestra.

**TABLA 1**  
Distribución de los aislamientos de *Streptococcus* de Antioquia y Cundinamarca de acuerdo con el origen de la muestra.

Origen	Aislamientos no tipificables	Aislamientos autoaglutinados	Nº <i>S. Suis</i>	Total de muestras
Nariz	1	4	8	50
Amígdala	22	17	52	107
Cerebro	-	-	1	7
Corazón	-	-	0	3

### Serotipificación de las Cepas de *S. Suis*

De las 61 muestras de *S. suis* aisladas, 17 (27.86%) pertenecían a algunos de los siguientes serotipos: 1,2,3,4 y 8 (Tabla 2), 23 (37.70%) no fueron tipificables y 21 (34.42%) aislamientos no se pudieron tipificar, debido a que presentaron el fenómeno de autoaglutinación (Tabla 1).

Serotipo	No. Cepas	Amígdala	Nariz	Cerebro
1	2	2	0	0
2	8	7	1	0
3	2	1	1	0
4	3	2	0	1
8	2	1	1	0

De las 12 muestras procedentes de Venezuela identificadas como *S. suis*, 5 fueron serotipo 4 (8.33%), 5 no fueron tipificables (33.33%) y una presentó autoaglutinación (8.33%) (Tabla 3).

Serotipo	No. de aislamientos
2	5
4	1
No tipificables	5
Autoaglutinados	1

## Sensibilidad Antimicrobiana

La mayoría de las cepas aisladas resultaron resistentes a la lincomicina (96.72%) y a la tetraciclina (86.88%), mientras que todas fueron sensibles a la ampicilina y al cloranfenicol. Se observó buena eficacia de la penicilina (83.60%), de la gentamicina (86.88%) y de la sulfamethoxazole trimetropim (80.32%).

Los aislamientos obtenidos de Venezuela fueron todos sensibles a ampicilina y cloranfenicol; altamente sensibles a penicilina (83.33%) y a sulfamethoxazole trimetropim (75.00%), mientras que fueron totalmente resistentes a la lincomicina y tetraciclina.

## DISCUSION

El presente estudio demostró la presencia de *S. suis* en lechones de precebo de 5 a 8 semanas de edad, pertenecientes a granjas con o sin historia de presencia de meningitis en el país. Se identificaron 61 cepas (36.52%) de *S. suis* de un total de 167 hisopos colectados en las zonas bajo estudio, pertenecientes a los serotipos 1,2,3,4, y 8, procedentes de las dos áreas geográficas incluidas en la investigación.

Se estableció que un diagnóstico presuntivo de *S. suis* pudo realizarse mediante la ausencia de crecimiento en presencia de 6.5% de NaCl, la no producción de acetina y la fermentación de salicina y trealosa y de dos azúcares más. Estos hallazgos son similares a los descritos por Higgins et al. (1990), quienes encontraron que solamente el 4% de las cepas de *S. suis* identificadas con base en pruebas bioquímicas y serotipificación, crecieron en presencia de 6.5% de NaCl.

Ahora bien, dado que los perfiles bioquímicos del *S. suis* son muy heterogéneos, la selección de un número reducido de pruebas puede hacer que se descarten algunas cepas con patrones bioquímicos poco comunes (Hoffman y Hendersen, 1985; Hommez et al., 1996; Higgins et al., 1995). Este hecho enfatiza la necesidad de utilizar perfiles bioquímicos lo más adecuados posible y la serotipificación como base rutinaria para el diagnóstico.

El número de aislamientos de cepas de *S. suis* fue mayor en granjas con antecedentes de meningitis, que en granjas sin historia previa de la enfermedad. Hallazgos obtenidos por otros autores en lechones aparentemente sanos mostraron aislamientos de cepas de *S. suis* en porcentajes muy similares en

muestras colectadas de la nariz y las amígdalas. Aparentemente el muestreo de ambos sitios de colonización aumentará la posibilidad de aislamiento para la detección de portadores sanos (Brisebois et al., 1990; Clifton-Hadley et al., 1980; Moreau et al., 1989).

En el presente trabajo la mayoría de las muestras se colectaron de las amígdalas, y debido a que el *S. suis* se localiza en la parte profunda de las criptas, es factible que se hubiera disminuido la posibilidad de aislamiento. Se sabe que el estado de portador es variable y que un animal que es muestreado dos veces con intervalos variables de tiempo puede ser positivo en un segundo examen (Clifton-Hadley et al., 1984; Clifton-Hadley y Enright, 1985; Van Leegoed et al., 1987).

El papel de los portadores sanos en la epidemiología de la enfermedad no está muy bien definido, pero ha sido evidente que la introducción de animales infectados a una granja puede resultar en diseminación lateral de la infección (Moreau et al., 1989; Van Leegoed et al., 1987).

Debido a que la adición de antisuero policlonal preparado en conejo y oveja al medio de cultivo ha facilitado la identificación de cepas de *S. suis* tipo 2 de portadores sanos (Moreau et al., 1989), en esta investigación se incluyó antisuero policlonal producido en conejos en el agar BHI. Los resultados con este medio selectivo fueron muy satisfactorios; sin embargo, la concentración requerida fue alta (4.3%) y la cantidad obtenida de los conejos fue baja. Para posteriores estudios se considera conveniente trabajar con cabras y ovejas para obtener un mayor volumen de antisuero.

Se debe mencionar también el hecho de haber encontrado 21 cepas de *S. suis* que no se pudieron serotipificar o presentar autoaglutinación. Este fenómeno ha sido previamente reportado por otros autores (Brisebois et al., 1990). Lemenec et al. (1985) lograron tipificar cepas autoaglutinantes mediante pruebas de inmunodifusión, utilizando un medio hipersalino. Para estudios posteriores se espera poder implementar este método para sortear esta dificultad.

- Los resultados encontrados en las 23 cepas procedentes de Venezuela con diagnóstico presuntivo de *Streptococcus* mostraron que solamente 12 cepas eran *S. suis*. Dentro de estas cepas también se hallaron cepas tipificables pertenecientes a los serotipos 2, 4 y 5.

Como no es posible distinguir fácilmente entre cepas virulentas y no virulentas, especialmente del serotipo 2, se puede asumir que los portadores sanos presentes en las granjas estudiadas, potencialmente podrían estar

involucradas en brotes de la enfermedad. (Brisebois et al., 1990; Mogollón y Piojan, 1991). Llama también la atención el hecho de haber identificado más de un serotipo en una granja en particular, hallazgo que corrobora su diversidad genética. Con frecuencia las descripciones de la literatura reportan la presencia de múltiples serotipos en una granja, a pesar de que frente a un problema clínico prevalece un serotipo sobre los demás (Brisebois et al., 1990; Higgins y Mittal, 1990; Mogollón y Piojan, 1991).

Es importante destacar que las cepas de *S. suis* que no fueron tipificables podrían pertenecer a serotipos comprendidos entre el 11 y 34, los cuales no se incluyeron en las pruebas por carecer de los respectivos antisueros específicos (Gottscharlk et al., 1991; Higgins et al., 1995).

En relación con la sensibilidad antimicrobacteriana se encontró un alto grado de sensibilidad de las cepas de *S. suis* estudiadas a la ampicilina y cloranfenicol; fueron también altamente sensibles a la penicilina, gentamicina y sulfamethoxazole trimetropim y mostraron resistencia a la lincomicina y tetraciclina (Touil et al., 1988). Estos hallazgos son similares a los descritos por Hoffman y Henderson (1985) y Cantin et al. (1992).

Se concluye que la serotipificación de cepas de campo de *S. suis* permitirá la realización de estudios epidemiológicos tendientes a establecer el patrón de diseminación de cepas epidémicas o endémicas entre las diversas regiones porcícolas del país.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Arends, J.P.; Zanen, H. C.** 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in human. Rev. Infec. Dis, 10: 131-137.
2. **Bauer, A. W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol, 45: 493-496.
3. **Brisebois, L.M.; Charlebois, R.; Higgins, R.** 1990. Prevalence of *Streptococcus suis* in four to eight week old clinically healthy piglets. Can.J. Vet, 54: 174- 177.
4. **Cantin, M.; Harel, J.; Higgins, R.; Gottscharlk, M.** 1992. Antimicrobial existence patterns and plasmid profiles of *Streptococcus suis* isolates. J. Diag. Invest, 4: 170-174.
5. **Clifton-Hadley, F.A.; Alexander, T.J.L.; Enright, R.** 1980. The epidemiology diagnosis, treatment and control of *Streptococcus suis* type 2 infection. Vet.Rec, 107: 473-490.
6. **Clifton-Hadley, F.A.; Alexander, T.J.L.; Upton, Y.; Diffus, W.P.P.** 1984. Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. Vet. Rec, 114: 513-518.
7. **Clifton-Hadley, F.A.; Enright, M. R.** 1985. Diagnosis of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. Pig. Vet. Soc. Proc, 14: 27-34.
8. **Clifton-Hadley, F.A.; Alexander, T.J.L.** 1988. Diagnosis of *Streptococcus suis* infections in pigs in practice. Suppl. Vet. Rec, 10: 185-187.
9. **Erickson, E.D.; Doster, A.R.; Porkony, T.S.** 1984. Isolation of *Streptococcus suis* from swine in Nebraska. J.A. Vet. Assoc, 185: 666-668.
10. **Gottscharlk, M.; Higgins, R.; Jacques, M.; Mittal, K.; Henrichsen, J.** 1991. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis* J. Clin. Microbiol, 29: 2590-2594.
11. **Gottscharlk, M.; Higgins, R.** 1991. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. J. Clin Microbiol, 29: 2590-2594.

12. **Gottscharlk, M.; Higgins, R.; Jacques, M.** 1993. Production of capsular material by *Streptococcus suis* serotype 2 under different growth conditions. *Can J. Vet. Res.* 57: 49-52.
13. **Higgins, R.M.; Gottscharlk, M.** 1990. An update of *Streptococcus suis* 11 th. *Int. Pig Vet. Soc. Proc.* 169.
14. **Higgins, R.M.; Gottscharlk, M.; Mittal, K. R.** 1990. *Streptococcus suis* infections in swine a sixteen month study. *Can. Vet. Res.* 54: 170-173.
15. **Higgins, R.; Gottscharlk, K.M.; Boudreau, A.; Lebrum, A.; Henrichsen, J.** 1995. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *J. Vet. Diag. Invest.* 7: 405 - 406.
16. **Hoffman, L.J.; Hendersen, L.M.** 1985. The significance of *Streptococcus suis* in swine disease: Clinical, Pathologic and Bacteriologic data from a two year study. *Am. Assoc. Vet. Lab. Diag. 28th Ann. Proc.* 28: 201-210.
17. **Hommez, L.; Devriese, L.A.; Henrichsen, J.; Castryck, F.** 1886. Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Vet. Microbiol.* 11: 349-355.
18. **Lemenec, M.; Kobisch, M.; Sanders, P.** 1985. Infection porcine a *Streptococcus suis* dans département des cotes du - nord. Méthodes des identification et répartition des différents serotypes rencontrés. *Recl. Me. Vet. Ec. Alfort.* 161: 353-359.
19. **Mittal, K.R.** 1983. Identification and serotyping of haemophilus pleuropneumoniae by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 18: 1351-1354.
20. **Mogollón, J.D.; Piojan, C.** 1991. Identification of epidemic strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 29: 782-787.
21. **Moor, C.E.** 1963. Septicaemic infections in pigs caused by haemolytic *Streptococcus suis* of new Lancefield groups designated R.S. and T. *J. Mirror Ser.* 29: 272-280.
22. **Moreau, A.; Higgins, R.; Poulin, M.** 1989. Rapid detection of *Streptococcus suis* serotype 2 in weaned pigs. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1667-1671.

23. **Perch, B.; Pedersen, K.B.; Henrichsen, J.** 1983. Serology of capsulated *Streptococcus* pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol. 17: 993-996.
24. **Schleifer, K. H.** 1986. Gram-positive cocci. In: Bergey's Manual of systematic bacteriology. 2: 999-1100.
25. **Touil, F.; Higgins, R.; Nadeau, M.** 1988. Isolation of *Streptococcus suis* from diseased pigs in Canada. Vet. Microbiol. 17: 171-177.
26. **Van Leegoed, L.; Vecht, U.; Verheyen, E.R.M.** 1987. *Streptococcus suis* type 2 infections in pigs in the Netherlands (part two). Vet. Quart. 9: 111-117.
27. **Vecht, U.; Wisswaliak, H.J.; Jaape, E.; Dijk, V.; Smith, H.** 1992. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in Newborn Germfree Pigs depends of phenotype. 60: 550-556.
28. **Windsor, R. S.** 1977. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis* type 2. Vet. Rec. 101: 376-379.