

BÚSQUEDA DE CANDIDATOS PROTEICOS PARA EL
DESARROLLO DE VACUNAS FRENTE A LAS
INFECCIONES POR *STREPTOCOCCUS SUI*S EN
CERDOS

TITULO: *Búsqueda de candidatos proteicos para el desarrollo de vacunas frente a las infecciones por streptococcus suis en cerdos*

AUTOR: *Lidia Gómez Gascón*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: BÚSQUEDA DE CANDIDATOS PROTEICOS PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS FRENTE A LAS INFECCIONES POR *STREPTOCOCCUS SUIIS* EN CERDOS.

DOCTORANDO/A: LIDIA GOMEZ GASCON

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La tesis que se presenta se ha desarrollado dentro del Programa de Doctorado de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias de la Universidad de Córdoba. Los directores de la tesis han supervisado en el trabajo experimental, realizado en los laboratorios del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y del Dpto. de Sanidad Animal. Durante los cuatro años de duración de los estudios, la doctoranda ha realizado tres estancias en centros de investigación internacionales, bajo la dirección del Dr. Gottschalk (Universidad de Montreal), Dr. Baums (Universidad de Hannover). Asimismo, parte del trabajo se ha realizado en las instalaciones de experimentación animal del Centro Veterinario Nacional DTU-Lindholm (Dinamarca), bajo el 7º Programa Marco de la Comunidad Europea (FP7, 2007-2013), Investigación en Infraestructuras, bajo el acuerdo de subvención No. FP7-228394 7º.

Las publicaciones/aportaciones a congresos derivados de la Tesis han sido:

A surface protein of *Streptococcus suis* serotype 2 identified by proteomics protects mice against infection. Mandanici F, Gómez-Gascón L, Garibaldi M, Olaya-Abril A, Luque I, Tarradas C, Mancuso G, Papasergi S, Bárcena JA, Teti G, Beninati C, Rodríguez-Ortega MJ. *J Proteomics*. 2010 Nov 10;73(12):2365-9. doi: 10.1016/j.jprot.2010.07.009. Epub 2010 Jul 23.

Exploring the pan-surfome of *Streptococcus suis*: looking for common protein antigens. Gómez-Gascón L, Luque I, Olaya-Abril A, Jiménez-Munguía I, Orbegozo-Medina RA, Peralbo E, Tarradas C, Rodríguez-Ortega MJ. *J Proteomics*. 2012 Oct 22;75(18):5654-66. doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.025. Epub 2012 Jul 26.

Surfomics: Shaving live organisms for a fast proteomic identification of surface proteins. Olaya-Abril A, Jiménez-Munguía I, Gómez-Gascón L, Rodríguez-Ortega MJ. *J Proteomics*. 2013 Apr 26. pii: S1874-3919(13)00215-7. doi: 10.1016/j.jprot.2013.03.035.

Protocolo para la identificación y validación de candidatos proteicos vacunales frente a *S. suis*. Gómez-Gascón Lidia; Rodríguez Ortega, Manuel José, Olaya-Abril, Alfonso; Jiménez-Munguía, Irene; Cardoso-Toset, Fernando; Bárcena, J. Antonio; Luque, Inmaculada. *Laboratorio Avedila*, 2013 Junio. Número 63:14-20.

XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Campus de Rabanales (Córdoba) en el año 2010. II Jornadas bienales de jóvenes investigadores en proteómica. Una proteína de superficie del serotipo 2 de *Streptococcus suis* identificada mediante proteómica protege a ratones frente a infección. Gómez-Gascón L, Olaya-Abril A, Bárcena JA, Rodríguez-Ortega MJ. Póster.

4th Congress of the Spanish Proteomics Society. New Trends in Proteomics. Segovia 2011. SEPROT. Identification of new immunoprotective surface protein vaccine candidates against *Streptococcus suis* infection by proteomics. L. Gómez-Gascón, A. Olaya-Abril, I. Jiménez-Munguía, I. Luque, C. Tarradas, J.A. Bárcena; M.J. Rodríguez-Ortega. Póster.

II Jornadas de Jóvenes Investigadores del IMIBIC. Córdoba 2011. IMIBIC. Identificación de nuevos antígenos vacunales frente a *Streptococcus suis* mediante técnicas proteómicas. Gómez-Gascón L., Olaya-Abril A., Jiménez-Munguía I., Bárcena J.A., Tarradas C., Luque I. Rodríguez-Ortega M.J. Póster.

Curso de investigación en veterinaria y CYTA. Córdoba 2011. Universidad de Veterinaria, Córdoba. Identificación de antígenos superficiales de *S. suis* usando técnicas proteómicas: Aplicación al desarrollo de vacunas. Gómez-Gascón Lidia, A. Olaya-April, I. Jimenez-Munguia, F. Cardoso, C. Tarradas, I. Luque, M.J. Rodriguez-Ortega. Comunicación oral.

4th European Symposium of Porcine Health Management. Brujas (Belgica) 2012. European College of Porcine Health Management & European Association of Porcine Health Management. Identification of the new surface protein vaccine candidates against *Streptococcus suis* by proteomics. Gómez-Gascón L.; Luque I.; Olaya-Abril A.; Tarradas C.; Jiménez-Munguía I.; Huerta B.; Bárcena J.A.; Rodríguez-Ortega M.J. Póster.

XVII Simposio Anual de AVEDILA. Badajoz 2012. Protocolo para la identificación y validación de candidatos proteicos vacunales frente a *S. suis*. Lidia Gomez Gascón, Rodríguez Ortega, Manuel José, Olaya-Abril Alfonso, Tarradas Carmen, Jiménez-Mungía, Irene, Cardoso-Toset, Fernando, Bárcena, J. Antonio, Luque Inmaculada. Póster.

30th meeting of the European Society of Veterinary Pathology Annual Meeting of the European College of Veterinary Pathologists. 24th Annual meeting of the Spanish Society of Veterinary Pathology. León 2012. Behavior of two *Streptococcus suis* serotype 2 field strains in an acute experimental infection in pigs. Gómez-Gascón L, Gómez-Laguna J, Luque I, Amarilla P, Cardoso-Toset F, Carrasco L, Tarradas C. Póster.

Consideramos que la tesis presentada por licenciada en Veterinaria, Dña. Lidia Gómez Gascón reúne todos los requisitos necesarios para su lectura y defensa ante tribunal para optar al Grado de Doctora en Veterinaria por la Universidad de Córdoba. Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 30 de Octubre de 2013

Firma de los directores

Fdo.: Manuel Rodríguez-Ortega

Fdo.: Inmaculada Luque Moreno

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
3. OBJETIVOS	57
4. ENSAYOS EXPERIMENTALES	
a. OBJETIVO 1	61
b. OBJETIVO 2	87
5. DISCUSIÓN GENERAL	131
6. CONCLUSIONES	137
7. RESUMEN	141
8. SUMMARY	145
9. AGRADECIMIENTOS	149
10. BIBLIOGRAFÍA	153
11. ANEXOS	171

CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

El sector del porcino constituye un importante motor de la economía española, así lo demuestran los datos que anualmente publica el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. La producción porcina representa alrededor del 34 por ciento de la Producción Final Ganadera y el 12 por ciento de la Producción Final Agraria. En el exterior, España constituye el segundo productor de la Unión Europea, detrás de Alemania, y el cuarto productor mundial, tras otros países como China, Estados Unidos o Alemania. Con un censo de 40 millones de animales, repartidos entre más de 600 explotaciones, cada año se producen alrededor de tres millones y medio de toneladas de carne, de las que el 40 por ciento son exportadas a países de la Unión Europea y a terceros países (Informe del Servicio General de Estadística del MAGRAMA, 2013).

Este sector representa en España más del 14% del Producto Interior Bruto Industrial, y genera, según los expertos en temas agrarios (Piedra, 2012) más de dos millones y medio de empleos, de los cuales cerca de doscientos mil son puestos de trabajo directos. Gracias a él, se ha creado un amplio tejido industrial, formado por miles de pequeñas y medianas empresas repartidas por toda la geografía nacional y que proporcionan empleo a millones de familias, especialmente en las zonas rurales. En los últimos años, este sector ha realizado un gran esfuerzo e inversión económica, para adaptar sus instalaciones y sistemas productivos a la normativa europea en temas de bienestar animal (Directiva 2008/120/CEE) y exigencias de los consumidores, que demandan productos de mayor calidad, con los mínimos riesgos sanitarios.

Los sistemas modernos de explotación se caracterizan por la decidida apuesta por los métodos de selección genética, con la finalidad de conseguir animales altamente productivos, así como en la utilización de alimentos

equilibrados y adaptados a las diferentes situaciones fisiológicas y productivas del animal. A esto hay que añadir los avances en los sistemas de manejo y control de enfermedades, con un importante compromiso con el bienestar animal y la adopción de medidas de bioseguridad, que ha dado lugar a la consolidación de un sector productivo moderno y competitivo (Astorga et al., 2010; Gómez et al., 2011, Laanen et al., 2013).

Entre las enfermedades que afectan al ganado porcino, las infecciones por *Streptococcus suis* han adquirido una importancia creciente en los últimos veinte años, siendo considerada una enfermedad emergente en países productores del cerdo (Gottschalk, 2012). Se estima que está presente entre el 20 y 50 por ciento de las explotaciones porcinas europeas, afectando a cerdos antes del destete y cerdos de transición y crecimiento, adquiriendo mayor relevancia en explotaciones donde se presentan otras enfermedades inmunosupresoras, como el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino o la Circovirus. En el cerdo, la enfermedad se caracteriza por la producción de numerosos cuadros clínicos y lesionales, como meningitis, artritis, bronconeumonía, endocarditis, poliserositis y septicemia. Además de la importancia económica para el sector porcino, tiene una gran repercusión sanitaria, siendo considerado un agente zoonótico emergente (Lun et al., 2007; Princivalli et al., 2009; Feng et al., 2010; Gottschalk et al., 2010). En el hombre, son frecuentes los cuadros de meningitis, aunque también se han descrito endocarditis, neumonía, artritis y peritonitis, y cuadros de septicemia y shock séptico (Lun et al., 2007).

En base al polisacárido capsular (CPS) se han descrito hasta 35 serotipos diferentes de *S. suis* (Gottschalk, 2012), aunque hay estudios que señalan que los serotipos 33 y 34 pertenecerían a la especie *S. orisratti* (Hill et al., 2005). Clásicamente, se ha considerado que el serotipo 2 era el más

prevalente y asociado a los brotes más graves de enfermedad en la mayoría de los países de Europa, Asia y América (Higgins y Gottschalk, 1995; Luque et al., 1998). No obstante, a lo largo de los años, se ha podido comprobar que la importancia y distribución de serotipos varía en función de la región geográfica y del tiempo (Hampson et al., 1993; Aarestrup et al. 1988; Wisselink et al., 2000; Tarradas et al., 2004; Wei et al., 2009; Gottschalk et al., 2013).

Desde un punto de vista epidemiológico, una de las características de este microorganismo es su capacidad de quedar acantonado fundamentalmente en tonsilas y cavidad nasal de los cerdos, tanto domésticos como silvestres, que podrían actuar como reservorios de la enfermedad en calidad de portadores (Berthelot-Herault et al., 2001; Wongsawan et al., 2006; Baums et al., 2007; Luque et al., 2009), e infectar a otros animales sensibles y al hombre (Princivalli et al., 2009; Hoa et al., 2010). Estos animales portadores son los verdaderos responsables de la introducción y mantenimiento del microorganismo en las explotaciones (Cloutier et al. 2003; Luque et al., 2009).

En granjas endémicas, el control de la enfermedad se basa en la aplicación de tratamientos antimicrobianos terapéuticos a los animales enfermos y preventivos en cerdas gestantes y lechones antes de los periodos de mayor riesgo, como son los periodos previos al destete. En estudios de sensibilidad antimicrobiana se comprueba que a pesar de la adquisición de resistencias a diferentes antimicrobianos (Wisselink et al., 2006; Chu et al., 2009), el grupo de los beta-lactámicos sigue siendo el elegido como tratamiento de primera elección (Portis et al., 2013). No obstante, la creciente preocupación por el desarrollo de resistencias antimicrobianas en medicina veterinaria y el posible riesgo para la salud pública obligan a limitar el uso de antimicrobianos clasificados como de particular importancia por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Por ello, los esfuerzos se deben

centrar en la prevención de las enfermedades, y la vacunación es una de las medidas más eficaces de control (Lee et al., 2012). En el caso de *S. suis*, el uso de autovacunas ha tenido un éxito relativo; pero los resultados obtenidos con vacunas comerciales han sido infructuosos, debido a la gran diversidad genética y la ausencia de reacciones cruzadas entre serotipos (Baums et al., 2009; Blume et al., 2009; de Greef et al., 2011).

Todas estas razones justifican la necesidad de descubrir antígenos comunes a todos los serotipos de *S. suis*, con gran capacidad inmunógena, que se utilicen para la elaboración vacunas comerciales que puedan ser aplicadas a nivel mundial (Baums et al., 2009). En este sentido, las proteínas de superficie bacteriana, que desempeñan un papel fundamental en la interacción célula-hospedador, están expuestas al sistema inmune y son más accesibles a los anticuerpos, pueden ser buenos candidatos para la fabricación de vacunas (Cordwell et al, 2006, Navarre et al., 1999; Baums et al., 2009; Mandanici et al., 2010).

Para alcanzar este objetivo, la proteómica se ha convertido en una técnica de elección para la detección de antígenos superficiales en diferentes grupos bacterianos, incluida la especie *S. suis* (Rodríguez-Ortega et al., 2008, Wu et al., 2008) y se ha aplicado para la identificación de proteínas en aislamientos de los serotipos 2 y 9 (Li et al., 2006; Wu et al., 2008; Zhang et al., 2007, 2009; Chen et al., 2009; Garibaldi et al., 2010; Mandanici et al., 2011; Wang et al., 2011). Para valorar la capacidad protectora de estas nuevas vacunas, los trabajos se deben completar con estudios de infección experimental en modelos animales. No obstante, hasta la fecha aun no hay consenso en el modelo animal que debe ser utilizado para evaluar la virulencia y capacidad protectora de las nuevas vacunas (Fittipaldi et al., 2012), y se han desarrollado modelos murinos y porcinos para valorar la eficacia de las

vacunas aunque los resultados han sido muy variables, e incluso contradictorios, entre laboratorios, dependiendo de factores relacionados con el inóculo e incluso el adyuvante utilizado, entre otros (Baums y Valentin-Weigand, 2009; Baums et al., 2009; Chen et al., 2010; Garibaldi et al., 2010; Hogenesch, 2012; Krejci et al., 2013). Asimismo, se debe valorar, según diferentes autores, la capacidad opsonica de los anticuerpos producidos, ya que estos protegen al animal frente a la enfermedad causada por este patógeno (Chabot-Roy et al., 2006), que pueden ser evidenciados mediante la técnica de opsonofagocitosis (Chabot-Roy et al., 2006; Baums et al., 2009, 2010).

La importancia económica que supone la presencia de *S. suis* en las explotaciones porcinas, junto con su relevancia sanitaria, hace necesario dedicar nuestros esfuerzos a profundizar en el desarrollo de nuevas vacunas que contengan antígenos comunes a los serotipos de mayor importancia clínica en la especie porcina y humana, para de esta forma aumentar la rentabilidad de la producción para el sector porcino, evitando los riesgos para la población humana de este importante agente zoonótico.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características generales de la especie *Streptococcus suis*.

El término estreptococo fue utilizado por primera vez por Billroth, en 1874, para describir unos microorganismos de forma cocácea, aislados de un proceso agudo en la especie porcina. La primera descripción de *Streptococcus suis* asociado a brotes clínicos en el cerdo se debe a Jansen y Van Dorsen (1951), que describieron un cuadro septicémico con signos meningíticos en lechones en Holanda, y algunos años más tarde en Inglaterra, Field y cols., (1954) observaron un proceso similar que afectaba a lechones y cerdos de engorde; estos procesos estuvieron asociados, en ambos casos, a estreptococos alfa-hemolíticos. *Streptococcus suis* fue oficialmente descrito como una nueva especie en 1987 por Kilpper-Balz y Schleifer incluida en el grupo D de Lancefield (Hill et al., 2005).

Esta especie se incluye dentro de la familia *Streptococcaceae*, género *Streptococcus*. El Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2009), divide al Género *Streptococcus* en 8 grupos:

1. **Grupo Piogénico o Piógeno**, que incluye a 13 especies que causan infecciones piógenas en el hombre y los animales, como *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equi*, *S. porcinus*, *S. uberis*, *S. iniae*.

2.- **Grupo Mutans**, que incluye a 8 especies que causan caries dental en el hombre y los animales. Su principal representante es *S. mutans*.

3.- **Grupo Anginosus**, constituido por 3 especies que se aíslan de la cavidad oral, intestino y tracto respiratorio superior y urogenital.

4.-**Grupo Salivarius**, formado por 3 especies que se aíslan de la cavidad oral y productos lácteos.

5.-**Grupo Mitis**, formado por 12 especies que se aíslan de la cavidad oral y faríngea del hombre. El más interesante, por su poder patógeno para el hombre, es *S. pneumoniae*.

6.-**Grupo Bovis**, que abarca a 6 especies que se aíslan de las heces de rumiantes, caballos y hombre.

7.-**Grupo Hyovaginalis**, incluye a 3 especies que se aíslan de aparato respiratorio y genital en humanos y animales.

8. **Especies no asignadas a ningún grupo**, son 7 especies de origen muy diverso, entre las que se encuentra *S. suis*.

Los estreptococos son cocos Gram positivos, redondeados u ovoides, con un diámetro inferior a dos micrómetros, y agrupados en parejas, o bien en cadenas cortas (Facklam, 2002). Son inmóviles, quimiorganotrofos y con metabolismo fermentativo, ya que producen ácido láctico sin formación de gas. Entre sus características fundamentales se incluye la incapacidad de producir catalasa, que permite diferenciarlos fácilmente del género *Staphylococcus* (Hardie, 1986). La célula estreptocócica, como otras bacterias Gram positivas, se compone de una pared celular que le confiere rigidez, formada por una capa gruesa de peptidoglucanos, carbohidratos específicos de grupo, unidos a la capa de peptidoglucanos mediante enlaces covalentes (Heraud y Le Bouguenec, 1989), proteínas y ácidos teicoicos. La cápsula es una estructura amorfa de naturaleza polisacáridica, no inmunógena, que se encuentra débilmente unida a la pared celular (Elliot y Tai, 1978; Arends y Zanen, 1988). En la actualidad, se ha secuenciado el genoma completo de varios serotipos de *S. suis* (1, 2, 3, 7, 9, 14, 16) y aunque parece ser que hay una estrecha relación entre cepas de un mismo serotipo, existe diversidad entre serotipos a nivel genómico (Hu et al., 2011; Zhang et al., 2011; Boyle et al., 2012; Wang et al.,

2013).

Los estreptococos son muy sensibles a las variaciones de pH, siendo el óptimo próximo a siete; pueden crecer en un intervalo de temperaturas entre 20 y 40°C, resultando la de 37°C la más adecuada (Jones, 1978), y la mayoría requieren medios enriquecidos con sangre o suero para su crecimiento. Los medios de cultivo más utilizados han sido el tripticasa-soja, proteosa-peptona, infusión cerebro-corazón, infusión corazón, agar triptosa, agar sangre, infusión de neopeptona y agar *Todd-Hewitt* (Facklam y Wilkinson, 1981). Para el primoaislamiento, la mayoría de los autores coinciden en aconsejar el uso de medios enriquecidos con un cinco a un siete por ciento de sangre de ovino, equino o bovino, y con un suplemento de antibióticos selectivo para estreptococos, compuesto generalmente por ácido nalidíxico y colistina. La incubación se lleva a cabo en cámaras a 37°C durante 24-48 horas, en aerobiosis o con un cinco por ciento de anhídrido carbónico (Hommeiz et al., 1986; Sihvonen et al., 1988; Boetner et al., 1987; Tarradas et al., 1994).

Los medios más empleados son el agar sangre y el agar Columbia (Tarradas y cols., 1994; Luque et al., 1998; Gottschalk, 2012). Las colonias son pequeñas, con un diámetro de 0'5 a 1 mm, de bordes regulares, transparentes u opacas y ligeramente mucosas, y presentan una hemólisis alfa cuando se utiliza sangre de ovino (Staats, 1997).

La identificación de los estreptococos se ha realizado clásicamente con pruebas bioquímicas y serológicas, no obstante, a medida que han evolucionado las técnicas de biología molecular, se han desarrollado sistemas de identificación más rápidos y seguros (Okwumabua et al., 2003; Bonifait et al., 2010). Las pruebas bioquímicas se basan en la determinación de enzimas y fermentación de azúcares, utilizando para su detección sistemas comerciales y pruebas convencionales. Dentro de los primeros, los sistemas más empleados

han sido galerías constituidas por una serie de microtubos que contienen los sustratos deshidratados para poner de manifiesto las enzimas y fermentación de azúcares (API System S.A., le Balme les Groeter, France) (Colman y Ball, 1984; Fertalli y Facklam, 1987; Vaissaire y Laroche, 1988). Se han propuesto una serie de parámetros marcadores para la especie, como la hidrólisis de esculina y fermentación de trehalosa, la producción de amilasa, incapacidad de crecer en un medio con un 6'5 por ciento de cloruro sódico y de producir acetoina, además de la ausencia de β hemólisis en medios con sangre de ovino (Higgins y Gottschalk, 1990; Tarradas et al., 1994; Devriese et al., 2001).

No obstante, para llegar a una adecuada identificación, se debe confirmar con técnicas de serotipificación, que pongan en evidencia los antígenos capsulares, utilizando para ello técnicas de reacción capsular, precipitación capilar, técnicas de coagulación o de aglutinación en porta (Feng et al., 2010; Gottschalk et al., 2013). La primera se basa en la observación, mediante microscopía electrónica de contraste de fases, de finas secciones de bacterias crecidas en agar sangre y estabilizadas con antisuero homólogo, mientras que el test de precipitación capilar se lleva a cabo poniendo en contacto el antisuero con un extracto antigénico obtenido con ácido hidrociorhídrico. La técnica de coagulación se ha utilizado ampliamente por su exactitud, rapidez y facilidad de realización (Gottschalk et al., 2013), y se basa en la unión de los anticuerpos específicos para cada serotipo (obtenidos por hiperinmunización de conejos), mediante la fracción Fc de las inmunoglobulinas, con la proteína A de la cepa Cowan de *Staphylococcus aureus*, quedando la fracción Fab libre para unirse al antígeno específico (Mittal et al., 1983). También se emplea la técnica de aglutinación en placa, que se basa en poner en contacto los anticuerpos específicos para cada serotipo con unas gotas de una suspensión de estreptococos o bien un número variable de colonias, apareciendo en el caso de reacciones positivas,

unos grumos visibles en el líquido transparente (Wisselink et al., 2000; Luque et al., 2010).

La tipificación de *S. suis* sólo puede llevarse a cabo con cepas capsuladas, se ha comprobado que las cepas sin cápsula presentan características particulares, como son la mayor hidrofobicidad, y esta cualidad puede ser utilizada para la identificación midiendo su absorción al n-hexadecano, o mediante microscopía electrónica, utilizando una tinción con ferritina (Bonifait et al., 2010; Gottschalk et al., 2013).

Como se ha indicado, el desarrollo de nuevas técnicas basadas en la detección de genes específicos resultan ser más sensibles y específicas y han desplazado a los métodos de identificación bioquímicos tradicionales. La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se ha revelado como una técnica rápida y específica para la identificación de la especie, mediante la detección del gen de la glutamato-deshidrogenasa (*gdh*), de 688pb (Okwumabua et al., 2003). Asimismo, se han desarrollado otras técnicas de PCR sencillas o múltiples, que permiten la detección de uno o varios serotipos y potenciales factores de virulencia de *S. suis* (Wisselink et al., 2002; Marois et al., 2004; Wang et al., 2012). Recientemente, se ha descrito una PCR múltiple para la detección de los 33 serotipos descritos (Liu et al., 2013).

El análisis filogenético de los 35 serotipos reconocidos de la especie sobre la base de secuencias de gen 16S ARNr y una región del gen chaperonina 60 ha revelado que los serotipos 32 y 34 pertenecen a otra especie, *S. orisratti*. Por otro lado, Then y colaboradores (2011) mediante homología ADN-ADN y estudio filogenético de los genes *soda* y *recN* también sugieren que los serotipos 20, 22, 26 y 33 no pertenecen al género *Streptococcus*, y deberían de ser clasificados taxonómicamente de nuevo, los tres primeros dentro de un mismo grupo (homología >98%, y serotipo 33 en otro grupo diferente, por lo

que el número de serotipos se reduciría a 29.

Además de las técnicas de PCR, se han desarrollado otros métodos moleculares, como el análisis de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), electroforesis de campos pulsantes (PFGE), el análisis de patrones de restricción (REA), Ribotipado, PCR con iniciadores de secuencia arbitrarios (RAPD) y la tipificación de múltiples locus (MLST) o el estudio de la amplificación de fragmentos de restricción (AFLP) que han permitido establecer la relación clonal y la diversidad entre aislamientos, lo que ha supuesto un gran avance para abordar estudios epidemiológicos (Mogollon et al., 1990; Allgaier et al., 2001; Tarradas et al., 2001; King et al., 2002; Cloutier et al., 2003; Vela et al., 2003; Rhem et al., 2007; Wang et al., 2008).

En la actualidad, ya está publicada la secuencia genómica completa de varios serotipos de *S. suis* (1, 2, 3, 7, 9, 14, 16), comprobando que hay una estrecha relación entre cepas de un mismo serotipo y diversidad genética entre serotipos (Hu et al., 2011; Zhang et al., 2011; Boyle et al., 2012; Wang et al., 2013).

2.2. Epidemiología

Como se ha indicado, las infecciones por *S. suis* constituyen una de las principales dominantes patológicas del cerdo en los últimos veinte años (Gottschalk et al., 2010). Tradicionalmente se han relacionado con países productores de Europa, América del Norte o Australia (Hampson et al., 1993; Aarestrup et al., 1998; Luque et al., 1998; Wisselink et al., 2000; Gottschalk et al., 2001). En los últimos años, no obstante, son cada vez más frecuentes las referencias en países de economía emergente, como América central y del sur o Asia, posiblemente por la alarma creada tras los brotes de infección en la

población humana de China en 2005 y al aumento de los intercambios comerciales con otros países productores (Tang et al., 2006; Wei et al., 2009; Zhang et al., 2009; Hoa et al., 2010; Schultzs et al., 2012).

Los principales reservorios de *S. suis* son los cerdos, en calidad de enfermos o aparentemente sanos. Una de las características más importantes de este microorganismo es la capacidad de quedar acantonado en distintas localizaciones orgánicas de los cerdos, fundamentalmente tonsilas y cavidad nasal, aunque también ha podido ser aislado de secreciones lácteas, tracto gastrointestinal, nódulos linfáticos, pulmones, vagina y prepucio de individuos sin manifestaciones clínicas (Robertson y Blackmore, 1989; Sanford y Higgins, 1992; Gottschalk, 2012). Estos animales portadores constituyen la principal vía de contagio para otros animales sensibles, e incluso para el hombre (Berthelot-Herauld et al., 2001; Luque et al., 2001; Wongsawan et al., 2006; Hoa et al., 2010). Además de los cerdos domésticos, los jabalíes pueden ser portadores de cepas relacionadas con brotes clínicos en cerdos y en el hombre (Baums et al., 2007).

Varios autores sugieren que deben existir otros agentes que intervengan en la transmisión, como pájaros, roedores y el hombre (Clifton-Hadley, 1985; Enright et al., 1987; Williams et al., 1988), que podrían actuar como portadores y propagadores de la infección entre granjas. Así, Enright et al., (1987) observan la persistencia de *S. suis* en el organismo de moscas (*Musca domestica*) durante un tiempo, pudiendo actuar como diseminadora de la bacteria al contaminar aguas y alimentos. Recientemente, Sánchez et al., (2013) aplicando técnicas PFGE sobre aislamientos obtenidos de conejos silvestre (*Oryctolagus cuniculus*), muestran diferencias genéticas con los aislados de las poblaciones porcina o humana, cuestionando su papel epidemiológico. Es indudable que la aplicación de estas herramientas

diagnósticas permitirá conocer la implicación de otras especies en la epidemiología de la enfermedad.

La edad es un factor determinante en la presentación de la enfermedad. La susceptibilidad a la infección va disminuyendo con la edad, a excepción de los animales en los que se presentan trastornos reproductivos (Erickson et al., 1984; Chengappa et al., 1984). Los trabajos de Tarradas (1993), relacionan las formas septicémicas con lechones en sus primeros días de vida y las formas nerviosas con individuos de edades próximas al destete. Otros factores predisponentes incluyen la raza, así Vaissaire y cols., (1987) observan que las razas *Landrace*, *Pietrain* y *Hampshire* son más sensibles a padecer la enfermedad, mientras que Tarradas et al., (1994a), consideran que la raza *Duroc-Jersey* es la más sensible.

Aunque la presentación de la enfermedad no se relacione inicialmente con la estación del año, sí parece estar ligada a cambios bruscos de temperatura y a los meses más fríos (Guise et al., 1986; Tarradas et al., 1994a). La enfermedad causada por *S. suis* es más prevalente en los sistemas modernos de explotación, en sistemas totalmente confinados (con una alta densidad de población), y con relaciones entre temperatura y ventilación no adecuadas, donde aparecen brotes a lo largo de todo el año (Erickson et al., 1984; Clifton-Hadley, 1985; Sanford y Higgins, 1992). Autores como Dee et al., (1993), consideran que los factores que más influyen en el incremento de portadores en una granja, son las fluctuaciones de temperatura en la sala de partos, una excesiva humedad relativa, convivencia de animales de distinta edad, una alta densidad de población, así como la existencia de suelos que facilitan el cúmulo de polvo y estiércol.

Las tasas de enfermedad en las infecciones por *S. suis* son extremadamente variables, estando condicionadas a los serotipos implicados,

edad, formas clínicas, sistema de cría y calidad sanitaria de las explotaciones afectadas; también puede influir toda una serie de factores externos, fundamentalmente medio ambientales (Madec et al., 1985; Vaissaire et al., 1985b; Robertson y Blackmore, 1987). La difusión de los procesos producidos por *S. suis*, pueden considerarse relativamente moderadas (Lamont et al., 1985; Sihvonen et al., 1988). Según Vaissaire et al., (1985a), las tasas de morbilidad y mortalidad desarrolladas por *S. suis* alcanzan valores máximos del 50 y 20 por ciento, respectivamente; sin embargo, en las formas nerviosas, si bien la morbilidad y mortalidad no suele superar el 10 por ciento, la letalidad puede alcanzar al cien por cien de los individuos afectados (Pedersen et al., 1981; John et al., 1982; Vaissaire et al., 1987; Sala et al., 1990).

La serotipificación es una herramienta utilizada por los profesionales veterinarios para entender la epidemiología de un brote en particular, así como para aumentar la posibilidad de éxito de un programa de vacunación dentro de una explotación (Gottschalk et al., 2013). La distribución de los serotipos es muy variable en función de la zona geográfica y del tiempo (Wisselink et al., 2000; Tarradas et al., 2001, 2004; Vela et al., 2003; Marois et al., 2006; Baums et al., 2009; Fittipaldi et al., 2009; Wei et al., 2009; Zhang et al., 2009; Gottschalk et al., 2013). Tradicionalmente, el serotipo 2 ha sido considerado el responsable de los brotes clínicos más graves y más prevalente en países europeos como Italia, España y Francia, (Luque et al., 1998; Wisselink et al., 2000). En cambio, en los Países Bajos, Bélgica y Alemania, ha sido el serotipo 9 el más frecuente (Wisselink et al., 2000; Allgaier et al., 2001; Marois et al., 2006; Baums et al., 2009). En el Reino Unido y Escocia, los serotipos 1 y 14 han ocupado un lugar predominante (MacLennan et al., 1996; Kerdsin et al., 2009) y en Finlandia predomina el serotipo 7 (Sihvonen et al., 1988; Jacobs et al., 1994). En Australia, Hampson y colaboradores (1993), detectaron una mayor prevalencia del serotipo 15 en cerdos enfermos y portadores. En

Dinamarca, donde el serotipo 7 era el más frecuente, este ha sido desplazado por el serotipo 2 como principal responsable de cuadros clínicos en cerdos (Perch et al., 1983; Aarestrup et al., 1998).

En los últimos años se ha producido en varios países europeos, incluida España, un incremento en la prevalencia del serotipo 9 (Vela et al., 2003; Tarradas et al., 2004). Podemos, pues, sugerir, que actualmente los serotipos 2 y 9 son los más difundidos y los que producen cuadros más graves en las explotaciones porcinas de Europa, incluida España (Wisselink et al., 2000; Tarradas et al., 2001, 2004; Vela et al., 2003; Marois et al., 2006; Baums et al., 2009; Fittipaldi et al., 2009; Wei et al., 2009; Zhang et al., 2009; Gottschalk et al., 2013), aunque otros serotipos también son responsables de enfermedad y deben ser tenidos en cuenta en los planes de lucha (Higgins and Gottschalk, 2013); siendo los serotipos del 1 al 10 (excepto 6) y 14 , 15 , 16 , ½ y 1/14 los más importante (Vela et al., 2003; Tarradas et al., 2004; Baums et al., 2009; Marois et al., 2006; Fitipaldi et al., 2009 ; Zhang et al., 2009).

La distribución de los diferentes serotipos de *S. suis* en Asia y, concretamente en China, en un periodo de cuatro años indica que el serotipo 2 es también el más prevalente, seguido por los serotipos 3, 4, 8, 5, 7 y ½ (Wei et al., 2009). Du et al. (2001), en Corea, comprobaron la importancia del serotipo 9 frente a otros serotipos como el 16, 4, 7, 5, 12, 28, 1, 8, 21 y 24. En América del Norte, en Canadá, los serotipos más frecuentemente aislados en los últimos años son los serotipos 3 y 2 a partir de animales enfermos, seguidos de los serotipos 1/2 , 4 , 8 y 22 (Gottschalk et al., 2013). En Estados Unidos, se han encontrado resultados similares a los publicados en Canadá, (Fittipaldi et al., 2009). Otros serotipos con una tasa relativamente alta de aislamiento a lo largo de los años en estos países han sido los serotipos 7 y 5, siendo la frecuencia de aislamiento del serotipo 9 muy baja, a diferencia de los países europeos (Vela

et al., 2003; Wisselink et al., 2000). Esta gran variabilidad en cuanto a la implicación de distintos serotipos en los brotes clínicos producidos en animales, hacen necesaria la detección de un antígeno común y conservado para poner en marcha planes de control verdaderamente eficaces frente a la enfermedad.

A pesar de la importancia de la serotipificación para el estudio de brotes, su valor para estudios epidemiológicos es limitado, debido al bajo poder de discriminación (Mogollon et al., 1990; King et al., 2002; Cloutier et al., 2003; Vela et al., 2003). Por este motivo, en los últimos años se han utilizado técnicas basadas en biología molecular para la caracterización genética, siendo las técnicas de la PFGE y MLST las más utilizadas (Berthelot-Herault et al., 2000; Vela et al., 2003; King et al., 2002; Rhem et al., 2007; Wang et al., 2008). Estas técnicas aplicadas al estudio de brotes clínicos, han permitido conocer la relación genética entre las cepas y se ha determinado la existencia de clones prevalentes, que podrían tener relación con la mayoría de los brotes clínicos en una zona, y podrían tener un origen común, así como la relación genética entre aislamientos obtenidos de animales enfermos y portadores tonsilares (Vela et al., 2003; Blume et al., 2009; Luque et al., 2010). Los estudios de Blume et al. (2009) con un grupo elevado de cepas de los serotipos 2 y 9 aislados en España demuestran la existencia de dos grupos genéticos separados entre ambos serotipos.

Los trabajos de King et al., (2002) aplicando la técnica MLST sobre un importante grupo de aislamientos, demostraron que existían complejos clonales más prevalentes en Europa, Estados Unidos y Hong Kong, que incluirían a varios de los serotipos de mayor importancia clínica: serotipo 2 (ST1), serotipo 7 (ST27), serotipo 9 (ST87). Los trabajos de Blume et al., (2009), demuestran que las cepas del serotipo 2 aisladas en España pertenecerían mayoritariamente

al complejo ST1, mientras que las cepas del serotipo 9 serían genéticamente diferentes a la mayoría de los aislamientos de Europa, y se incluirían en el complejo ST61, que podría ser un precursor del complejo ST87 europeo (Blume et al., 2009). Aplicando esta misma técnica, se ha comprobado que los aislamientos obtenidos en China parecen agruparse principalmente en el complejo clonal ST7, que fue el mismo que afectó a la población humana entre los años 2003 y 2005 (Ye et al., 2006, 2008).

Como se ha citado anteriormente, los cerdos portadores clínicamente sanos, pueden intervenir en el mantenimiento y difusión de *S. suis*, y representan el principal reservorio para otros animales. *S. suis* se ha asociado a casos de meningitis, endocarditis, neumonía y abortos en terneros, ovejas, cabras, caballos y perros, estando implicados los serotipos 2, 5, 8, 9, 16 y 20, (Robertson y Blackmore, 1990b; Hommez y cols., 1988; Higgins y cols., 1990; Hayakawa y cols., 1993, Muckle et al., 2010). También se han aislado de ruminantes los serotipos 2, 5, 8, 9, 16 y 20 de *S. suis*, (Wessman, 1986; Hommez y cols., 1988).

La primera descripción de *S. suis* en la especie humana se realizó en Dinamarca en 1968 (Perch et al. 1968), posteriormente se han descrito nuevos casos en varios países de Europa, Asia, así como en el Norte y Sur de América, Australia y Nueva Zelanda (Wertheim et al., 2009; Gottschalk et al., 2010). En humanos su incidencia es muy baja, aunque es posible que su importancia esté infravalorada debido a errores en la identificación de las cepas, como lo demuestran los estudios serológicos realizados (Smith et al., 2008; Palmieri et al., 2011). Además, no hay que olvidar que es considerada la primera causa de meningitis en adultos en Vietnam, la segunda en Tailandia y la tercera en Hong-Kong (Hui et al., 2005; Ip et al., 2007; Mai et al., 2008; Suankratay et al., 2004).

En general, se considera una enfermedad ocupacional, pues afecta principalmente a personas en contacto directo con los cerdos infectados o sus productos, aunque en Asia, esta bacteria afecta a la población general y representa un importante problema de salud pública. Entre los años 1998 y 2005 se produjeron dos grandes epidemias en China (Yu et al., 2006), que cambiaron el sentido de las investigaciones y obligó a muchos países a mantener un mayor celo en el control de este patógeno (Gottschalk et al., 2010). La enfermedad se ha descrito principalmente en ganaderos, trabajadores de matadero, transportistas de carne de cerdo, inspectores de sanidad y carniceros (Tang et al., 2005; Yu et al., 2006). Los estudios epidemiológicos realizados en los mataderos han demostrado la similitud de cepas aisladas de cerdos portadores y el hombre (Wongsawan et al., 2006; Hoa et al., 2010), y se ha sugerido que el polvo, purines y el agua del escaldado, donde la bacteria puede sobrevivir a 60 °C durante diez minutos, así como las zonas de evisceración, pueden ser puntos críticos para el contagio (Gottschalk, 2012).

En la especie humana, *Streptococcus suis* puede causar diversos procesos como septicemia, meningitis y endocarditis, y el Síndrome de Shock Tóxico por Estreptococos (STSS), nueva forma clínica conocida tras los brotes que se presentaron en China, y caracterizada por la aparición repentina de fiebre alta y de una erupción eritematosa, acompañada de palidez, petequias y disfunción multiorgánica (Feng et al., 2010). Los tipos capsulares aislados con mayor frecuencia en pacientes humanos han sido el 2, 4 y 14 (Kaufhold y Ferrieri, 1993; Nghia et al., 2011), siendo la vía de entrada pequeñas heridas y abrasiones de la piel, además de la vía oral. El periodo de incubación es muy variable y oscila entre unas horas y dos días (Gottschalk et al., 2010). La bacteria entra en la circulación y se puede localizar en una gran variedad de tejidos, incluyendo articulaciones y nódulos linfáticos, pasando también fácilmente la barrera hematoencefálica, que puede dar lugar a una meningitis

(Erickson, 1987; Arends y Zanen, 1988). Se ha comprobado que en humanos también se producen colonizaciones asintomáticas de las vías respiratorias altas (Gottschalk et al., 2010; Nghia et al., 2011).

2.3. Patogenia y Factores de virulencia.

Aunque la patogenidad es la parte de la medicina que estudia el origen y el desarrollo de las enfermedades, también se puede definir como la capacidad de los microorganismos de producir enfermedad en animales o plantas, y para que esta se produzca, el agente debe ponerse en contacto con el medio a colonizar y evitar la acción de las defensas del hospedador (Smith, 1977; Baums y Valentin-Weigand, 2009).

Como se ha indicado anteriormente, los animales pueden albergar microorganismo y nunca desarrollar la enfermedad (Madsen et al., 2002). En determinadas circunstancias, *S. suis* puede entrar en la circulación sanguínea desde las tonsilas u otras superficies mucosas, al igual que ocurriría en el caso de que un animal se infectara por primera vez; produciendo alteraciones en varias localizaciones orgánicas, generalmente cuando no hay una adecuada respuesta inmune (Cloutier et al., 2003).

Durante el transcurso de la infección, *S. suis* despliega un arsenal de factores de virulencia; como polisacáridos capsulares, proteínas de pared celular, de membrana o proteínas secretadas, que intervienen en la patogénesis (Higgins et al., 2005; Garibaldi et al., 2010; Mary et al., 2007; Fittipaldi et al., 2008, 2011). Realmente, aun no se conocen los verdaderos mecanismos de acción patógena, aunque diferentes grupos de investigación dedican gran parte de su trabajo a este campo (Baums y Valentin-Weigand, 2009); y poco se sabe acerca de los factores de virulencia para la especie *S. suis* (Higgins et al., 2005; Garibaldi et al., 2010; Mary et al., 2007; Fittipaldi et al., 2008).

En los últimos años debido al aumento de los casos clínicos de enfermedad en humana en el sudeste Asiático, ha aumentado el interés de la comunidad científica por este microorganismo, apareciendo así una gran cantidad de información sobre los factores de virulencia, teniendo en cuenta que la presencia de éstos no necesariamente definen a las cepas virulentas de *S. suis* (Berthelot-Herault et al., 2005; Fittipaldi et al., 2012).

Desde los estudios de Vecht y colaboradores (1991), dos proteínas, *Muramidase Released Protein* (MRP, proteína de la pared celular) y *Extracellular Factor* (EF, proteína secretada), se utilizan para intentar predecir el grado de virulencia de las cepas. Estas proteínas son reconocidas como marcadores de virulencia, ya que se ha demostrado que las cepas mutantes son tan virulentas como las cepas parentales y tampoco se conoce su intervención en la patogénesis (Fittipandi et al., 2011). Se ha sugerido que la producción de estas proteínas puede estar asociada a la producción de los verdaderos factores de virulencia de esta especie (Gottschalk et al., 2011).

El primer paso en una infección sería la adherencia e invasión de las células epiteliales de las tonsilas, vías respiratorias altas o piel de los animales infectados (Caparon y cols., 1991; Gottschalk et al., 2000). Cuando la bacteria entra por vía oronasal, se encuentra con la primera línea de defensa, el tejido linfoide de las tonsilas. En el cerdo, las tonsilas presentan profundas invaginaciones epiteliales dentro del tejido linfoide, formando las criptas tonsilares (Salles et al., 2002), esta morfología permite que la bacteria permanezca oculta al sistema inmune, y sobrevivir durante largos periodos de tiempo en esta localización (Gottschalk et al., 2011).

Se ha demostrado que *S suis* se adhiere a la superficie de las células epiteliales mediante las adhesinas, proteínas superficiales que permiten la adhesión de la bacteria a la célula hospedadora a través de receptores

específicos (Beachey et al., 1981; Kurl et al., 1989). Se ha sugerido que *S. suis* disminuye la expresión de la cápsula para facilitar el contacto de éstas con los receptores de las células diana (Benga et al., 2004). Además se ha evidenciado que este patógeno es capaz de interactuar con componentes de la matrix extracelular como la fibronectina, el plasminógeno o el colágeno (Esgleas et al., 2005); Los factores de virulencia involucrados en esta etapa de la patogenia de la enfermedad, hasta la fecha, se encuentran en la siguiente tabla.

ADHESIÓN E INVASIÓN CÉLULAS EPITELIALES		
Factor virulencia	Función/rol en la virulencia	Referencia bibliográfica
Cápsula	Sub-expresión facilita adhesión	Benga et al., 2004
Fbps	Adhesina unión fibronectina/fibrinógeno	De Greef et al., 2002
Enolasa	Adhesina unión fibronectina/plasminógeno	Esgleas et al., 2008
DppIV	Adhesina unión fibronectina	Ge et al., 2009
Ssa	Adhesina unión fibronectina	Wei et al., 2012
Colagenasa	Adhesina unión colágeno y degradación	Wilson et al., 2007
Cbp40	Adhesina unión colágeno	Zhang et al., 2013
GAPDH	Adhesina unión plasminógeno/anillos traqueales.	Wang et al., 2007
6-fosfogluconato-dehidrogenasa	Favorece adhesión	Tan et al., 2008
Amilopululanasa	Adhesina del epitelio y del moco	Ferrando et al., 2010
Glutamina sintetasa	Adhesina del epitelio	Si et al., 2009
Suilisina	Efecto citotóxico	Lun et al., 2003
IgA1 proteasa	Disminuye cantidad funcional IgA	Zhang et al., 2011
Sortasa A	Favorece adhesión	Vanier et al., 2008
Otras sortasas: srtF /srtG del pilo	Adhesina	Takamatsu et al., 2009

Los mecanismos por los que la bacteria logra vencer esta primera línea de defensa natural y producir la enfermedad son desconocidos (Cloutier et al., 2003; Fittipaldi et al., 2011); la hipótesis más aceptada es que la bacteria altera el epitelio de las mucosas (Gottschalk et al., 2000), cuando ésta interactúa con componentes de la célula hospedadora como la fibronectina, plasminógeno

o colágeno (Esgleas et al., 2005), puede liberar proteínas de secreción, como la *suilisina* (SLY). Esta hemolisina, de 54kDa, es una toxina que se activa en presencia de grupos thiol y se une al colesterol de la membrana celular, formando poros en la membrana celular y provocando la lisis de las células del hospedador (Boulnois et al., 1991; Lun et al., 2003). No obstante, deben existir otros mecanismos de difusión bacteriana para cepas que no producen suilisina (Gottschalk et al., 2011). Se ha comprobado que *S. suis* expresa una *proteasa de la IgA*, que escinde y limita la cantidad de IgA funcional, inmunoglobulina que juega un papel fundamental en la defensa de las mucosas (Zhag et al., 2010, 2011).

Una vez producida la adhesión e invasión de las células epiteliales de la tonsila u otra mucosa superficial, *S. suis* debe alcanzar los tejidos profundos y/o la circulación sanguínea, estando, a partir de este momento, expuesto a otros sistemas de defensa del organismo, como son las células fagocitarias de la respuesta inmune innata, así para sobrevivir en la sangre y diseminarse en el hospedador, es necesario que evite la fagocitosis por parte de las células inmunitarias (Fittipaldi et al., 2011).

DISEMINACIÓN/EVASION DE LA RESPUESTA INMUNE		
Factor virulencia	Función/rol en la virulencia	Referencia bibliográfica
Cápsula	Evita fagocitosis, mimetismo celular, “Caballo de Troya”	Gottschalk et al., 2001
PgdA	N-deacetilación peptidoglicanos. Evita fagocitosis	Fittipaldi et al., 2008
DltA	D-alanilación de LTA Evita fagocitosis	Fittipaldi et al., 2008
Suilisina	Evita fagocitosis. Citotóxicidad células blancas	Chabot-Roy et al., 2009
Superóxido dismutasa	Antioxidante. Evita toxicidad. Evita fagocitosis	Langford et al., 1991
Sistema Arginina deiminasa	Anti-acidez. Evita toxicidad. Evita fagocitosis	Gruening et al., 2006
SspA	Facilita permanencia y diseminación en sangre. <IL-8/neutrófilos	Vanier et al., 2009
Fhb	Inhibe via alternativa del complemento. Evita fagocitosis.	Pian et al., 2012
Ides _{suis}	IgM proteasa. Evita la via clasica del complemento.	Seele et al., 2013
SsnA nucleasas	Degrada NETs. Ayuda permanencia y diseminación.	Fontaine et al., 2004

La fagocitosis se desarrolla en dos fases, ataque e ingestión, para ello es necesario el reconocimiento de la invasión microbiana por los fagocitos, que parece depender de la liberación de sustancias bacterianas que actúan como quimiotaxinas, estimulando el movimiento directamente, o como quimiotaxigenos, que originan una respuesta quimiotáctica por activación del complemento (Densen et al., 1980). No obstante, la interacción con la superficie del fagocito no lleva necesariamente a la ingestión (Horwitz, 1982).

La cápsula (CPS) protege a la bacteria de la fagocitosis por los neutrófilos, monocitos y macrófagos y permite la larga supervivencia y la persistencia en altas concentraciones de la bacteria en la circulación sanguínea (Smith et al., 1999; Segura et al., 2004; Chabot-Roy et al., 2006; Gottschalk et al., 2011). La CPS está formada por varios componentes, como galactosa (Gal), 4-N-acetil-glucosamina (GlcNAc) y 3,4-ramnosa, y ácido N-acetil-neuraminico (ácido sialico) (Van Calsteren et al., 2010). Por ello, para que las cepas capsuladas sean ingeridas por los fagocitos son necesarios ligandos específicos del suero que se distribuyen sobre la superficie de la partícula, como son las inmunoglobulinas (IgG) y el complemento (fracción C3b) (Densen y Mandell, 1980; Whitnack et al., 1981; Horwitz, 1982; Almeida y Oliver, 1993). Una vez ingeridas, las bacterias son incluidas en los fagolisosomas, donde actúan diversas enzimas que tratan de destruirlas (Langford et al., 1991). Además de la cápsula, existen otros factores que parecen intervenir en la resistencia a la fagocitosis (Charland et al., 1996; Fittipaldi et al., 2008; Lecours et al., 2011 ; Chabot-Roy et al 2009).

S. suis también dispone de mecanismos que evitan la activación de la maquinaria intracelular de la fagocitosis y así persistir y diseminarse por el torrente sanguíneo (Valentin-Weigan et al., 2004; Langford et al., 1991; Gruening et al., 2006). Una vez que la bacteria se disemina por el organismo,

puede ejercer su acción a nivel sistémico o bien llegar a los órganos diana, como cerebro, articulaciones y otros órganos parenquimatosos, que dan lugar a la sintomatología clínica y lesiones típicas de la enfermedad (Fittipaldi et al., 2011; Gottschalk, 2013). Los factores de virulencia que se han asociado a estos procesos están enumerados en la siguiente tabla.

Aunque la activación del sistema inmune durante una infección bacteriana es normalmente protectora, puede suceder, que se produzca una respuesta exacerbada y poco regulada frente al microorganismo agresor. Esta reacción desequilibrada puede causar daño al hospedador a través de una mala regulación en la liberación de los compuestos inflamatorios endógenos; incluyendo la liberación de citoquinas, la activación de los neutrófilos, monocitos, y células endoteliales microvasculares, así como la activación de los reflejos neuroendocrinos y los sistemas de cascada de proteínas plasmáticas, tales como el sistema del complemento y las vías extrínseca de la coagulación, y el sistema fibrinolítico. Como consecuencia de estos efectos se produce la muerte por shock séptico, descrita principalmente en el hombre (Tsiotou et al., 2005; Feng et al., 2010).

Durante la infección por *S. suis* se ha descrito un importante aumento en la liberación de mediadores proinflamatorios (Gottschalk et al., 2010). Se ha comprobado que *S. suis* puede inducir la producción de diferentes citoquinas proinflamatorias por distintas líneas celulares de porcina, ratón y hombre (Segura et al., 1999, 2002, 2004; Dominguez-Punaro et al., 2007). La liberación de citoquinas sistémicas como TNF α IL-6 y 12, IFN- γ y moléculas quimiotácticas como CCL2/MCP-1, CXCL/KC y CCL5/RANTES pueden ser las responsables de la muerte súbita de ratones infectados experimentalmente en las primeras 24 horas tras la infección, además, la IL-10 presenta un mecanismo de retroalimentación negativo con estas citoquinas y por tanto

disminuye los casos de shock sépticos (Dominguez-Punaro et al., 2007). Por otro lado, parece ser que algunos receptores de las células hospedadoras como CD14 y Toll-like receptor (TLR)-2 pueden ser responsables de la activación de estas células por *S. suis*, lo cual daría lugar a la liberación de estos compuestos inflamatorios (Segura et al., 2002, 2006; Graveline et al., 2007; Lecours et al.,

2011). Se ha demostrado, no obstante, que la bacteria es capaz de modular la respuesta inflamatoria del hospedador, lo que permitiría la supervivencia y el retraso en la llegada de neutrófilos al sitio de infección (Vanier et al., 2009).

Los factores de virulencia asociados a este paso aún no son muy conocidos, hasta la fecha estudios realizados con cepas no encapsuladas hacen pensar que los componentes de la pared bacteriana pueden estar involucrados en la inducción de la producción de citoquinas (Fittipaldi et al., 2012); como las lipoproteínas. Los factores de virulencia descritos hasta la fecha se encuentran en la siguiente tabla.

LIBERACION/MODULACION DE MEDIADORES PROINFLAMATORIOS		
Factor virulencia	Función/rol en la virulencia	Referencia_bibliográfica
Cápsula	Inducción de citoquinas	Segura et al., 2006
Diacilgliceril transferasa (Lipoproteína)	Inducción de citoquinas	Wichgers et al., 2011
SspA	Inducción /degradación de citoquinas <neutrófilos	Bonifait et al., 2011
Cbp40	Inducción de citoquinas	Zhang et al., 2013

Si los animales sobreviven y los niveles de la bacteria en sangre se mantienen elevados, *S. suis* puede invadir el sistema nervioso central (SNC) y causar meningitis o encefalitis (Berthelot-Herault et al., 2001, 2005). Para ello

debe cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) o bien la barrera líquido cefalorraquídeo-sangre (LCR).

La barrera hematoencefálica es la única barrera anatómica y funcional que separa el cerebro del compartimento intravascular y mantiene la homeostasis del SNC (Rubbin et al., 1999). Las principales células de la BHE son las células del endotelio microvascular cerebral (CEMC). La adhesión e invasión de estas células es fundamental para el desarrollo de la enfermedad (Fittipaldi et al., 2011). Existe controversia entre los autores en cuanto a la capacidad de atravesar la BHE, mientras que algunos aseguran que la bacteria puede invadir las células y sobrevivir varias horas (Fittipaldi et al., 2011), otros sugieren que la bacteria podría ir unida a las células del sistema inmune sin invadirlas, especialmente a los monocitos (*Teoría del caballo de Troya modificada*) (Gottschalk et al., 2000).

Otra forma de llegar al sistema nervioso consiste en cruzar la barrera LCR-sangre por medio de la adhesión/invasión de las células epiteliales de los plexos coroides (CEPC). Tenembaun y colaboradores (2009) ya demostraron la invasión y translocación de *S. suis* a través de la barrera sangre-LCR *in vitro*. La invasión de las CEPC envuelve tres pasos, la invasión de las CEPC porcinas desde la zona basolateral de las células, endocitosis y transporte de la bacteria dentro de las vacuolas hasta la zona apical de éstas, y exocitosis en la membrana apical de la barrera sangre-LCR (Tenenbaum et al., 2009). Recientemente, se ha demostrado que *S. suis* es capaz de alterar la función y la integridad de la barrera, facilitando el tránsito de las bacterias y leucocitos, ya que es capaz de inducir necrosis de las CEPC, aunque también apoptosis (Tenenbaum et al., 2006), tanto por contacto directo de la bacteria con las CEPC como a través de proteínas secretadas, como la suilisina (Tenenbaum et al., 2005).

Una de los hallazgos lesionales más importantes son las meningitis. Se ha comprobado que la meningitis y la muerte neuronal están asociadas con la reacción inmune del hospedador frente a distintos componentes de la bacteria (Scheld et al., 2002). Por ejemplo *S. suis* induce la liberación de ácido araquidónico por las CEMC, mecanismo que facilita a las bacterias penetrar en el SNC y modular la inflamación a nivel local (Jobin et al., 2005). También produce la sobreexpresión de ciertos receptores TLRs, así como otras moléculas de adhesión en monocitos y células endoteliales, facilitando la adhesión de la bacteria a estas células (Grenier et al., 2008).

Estas lesiones, también son debidas a la respuesta exacerbada por parte del sistema inmune del hospedador frente a los distintos componentes de la bacteria, los cuales hasta la fecha siguen siendo desconocidos, como ya se comentó anteriormente (Scheld et al., 2002). Los factores de virulencia asociados a la afectación del SNC siguen siendo poco conocidos, entre los descritos hasta el momento se encuentran los enumerados en la siguiente tabla.

ADHESIÓN E INVASIÓN CÉLULAS DEL SNC		
Factores de virulencia	Función/rol en la virulencia	Referencia bibliográfica
DltA	D-alanilación de LTA	Fittipaldi et al., 2008
Sortasa A	Favorece adhesión	Vanier et al., 2008
Otras sortasas: srtF /srtG del pilo	Adhesina	Takamatsu et al., 2009
Enolasa	Adhesina	Esgleas et al., 2008
Suilisina	Efecto citotóxico . Sobre-expresión molecular inflamatorias.	Vanier et al., 2004
Cápsula	Sub-expresión facilita adhesión. Induce liberación distintos componentes que favorecen disrupción BHE.	Benga et al., 2004 Tenembaun et al., 2009 Jobin et al., 2006
Cbp40	Inducción citoquinas, aumenta permeabilidad de la BHE	Zhang et al., 2013

Otros muchos componentes de *S. suis* han sido asociados a la virulencia aunque los mecanismos de actuación o en el momento de la infección en el que intervienen no han sido aun descritos, simplemente se ha observado que las mutantes delectadas para esas proteínas eran menos virulentas que las cepas que las presentaban. Ejemplos de estos factores de virulencia son: glutamina sintetasa, factor de opacidad del suero, la proteína de superficie uno (Sao), una proteína de la triada de histidina (HtpS) (Fittipaldi et al., 2011).

Por otro lado, otros factores que claramente participan en la virulencia de otras bacterias, se han evidenciado en *S. suis*, pero no ha sido aun posible demostrar que verdaderamente interfieran en el poder patógeno de este microorganismo. El ejemplo más claro son los pilis, los cuales son importantes factores de virulencia para muchas especies de *Streptococcus* (Telford et al., 2006). Por otro lado, muchas bacterias utilizan la estrategia del biofilm para sobrevivir en condiciones inhóspitas. En un estudio reciente, se ha demostrado que *S. suis* es capaz de inducir la producción de estos biofilms, aunque no se ha podido comprobar si los produce en tejido tonsilar (Grenier et al., 2009; Wang et al., 2011; Tanabe et al., 2010).

2.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad se basa en datos epidemiológicos, signos clínicos y lesiones, que pueden orientar al veterinario de que se trata de una estreptococia, si bien, la confirmación se basa en el aislamiento e identificación del agente causal (Madec et al., 1986; Sanford y Higgins, 1992; Serhir et al., 1993). Las formas más frecuentes son sin duda la forma nerviosa y septicémica, responsables de aproximadamente el 80 por ciento de los casos descritos, aunque también se pueden presentar artritis, cuadros respiratorios en cerdos de transición y crecimiento, alteraciones de la reproducción, endocarditis y poliserositis (Tarradas et al., 1998; Gottschalk, 2012).

En la mayoría de los brotes causados por *S. suis*, los primeros signos de enfermedad suelen observarse en lechones lactantes o tras el destete, en los que se presenta un síndrome febril, con temperaturas elevadas, de 41 a 42°C y anorexia, evolucionando rápidamente hacia la muerte (Madec et al., 1985). Cuando la evolución adquiere un carácter agudo, se pueden observar animales que presentan fiebre, anorexia progresiva, depresión, enrojecimiento de la piel y signos nerviosos de incoordinación, que se van acentuando progresivamente, observándose también parálisis, opistótonos, pataleo, convulsiones y nistagmos (Pedersen et al., 1981; Clifton-Hadley y Alexander, 1989; Gogolewski et al., 1990; Sanford y Higgins, 1992; Martelli, 1992; Panin, 1992). Si no se aplica un tratamiento efectivo en las primeras fases del curso de la enfermedad, la muerte se produce en menos de cuatro horas (Guise et al., 1985; Clifton-Hadley y Alexander, 1989).

Las lesiones observadas en las formas nerviosas incluyen a nivel macroscópico, un engrosamiento con varios grados de congestión de cerebro y meninges, edema cerebral, con un aumento o no de fluido cerebroespinal (Clifton-Hadley y Alexander, 1989; Kwiecien et al., 1992; Sanford y Higgins, 1992). Histológicamente, las lesiones son típicas de una leptomeningitis fibrinopurulenta asociada a una coroiditis y una marcada y difusa infiltración de células inflamatorias mixtas, con predominio de neutrófilos (Sandford et al., 1982; Martelli, 1992; Kwiecien et al., 1992). Cuando el curso es crónico o en cerdos que han sido tratados, pueden predominar células mononucleares (Windsor, 1977; Sandford y Higgins, 1992). Los animales tratados y aquellos que están parcialmente recuperados pueden desarrollar una meningomieloencefalitis subaguda, con invasión del parénquima por células inflamatorias mixtas, que resulta más pronunciada a nivel del cerebelo; se puede observar también una acumulación de células inflamatorias en el espacio subaracnoideo, alrededor del bulbo olfatorio (Sanford y Park, 1987).

Ha sido descrito que animales que desarrollan una meningitis pueden presentar asociado también una laberintitis y como consecuencia una otitis interna uni o bilateral y daño vestibular (Madsen et al 2001) aunque algunos autores sugieren que esta clínica pueden ser independiente de una meningitis y producirse durante la fase de septicemia (Dominguez-Punaro et al., 2012). Esta forma se caracteriza por la presencia de un exudado inflamatorio con presencia de neutrofilos, monocitos y macrófagos en los conductos perilinfáticos de la coclea y en menor medida en las escalas timpánica y vestibular unido a una perineuritis del nervio vestibulococlear. En ocasiones puede producirse la ruptura del órgano de Corti, estas lesiones sugieren que los animales pudieran sufrir pérdida de audición y una disfunción vestibular (Madsen et al., 2001; Dominguez-Punaro et al., 2007).

Por otra parte, las formas septicémicas se caracterizan por la aparición de una canal enrojecida, con hipertrofia y congestión de nódulos linfáticos, congestión y hemorragias de órganos parenquimatosos, y poliserositis fibrinosa con formación de redes de fibrina en las cavidades torácica y abdominal (Pedersen et al., 1981; John et al., 1982; Madec et al., 1985; Sanford y Ross, 1986; Clifton-Hadley y Alexander, 1989; Gogolewski et al., 1990). A nivel histológico se puede observar depleción linfocitaria en pulpa esplénica blanca, con abundantes eritrocitos y neutrófilos polimorfonucleares en pulpa esplénica roja, así como dilatación y congestión de vasos. En hígado se pueden producir procesos congestivos y necrosis de hepatocitos de localización centrolobulillar, dilatación y edema de espacio perisinusoidal (Kwiecien et al., 1992; Tarradas et al., 1994a). Vaissaire y Laroche (1988) han observado también la formación de abscesos en las masas musculares y vísceras.

También se ha descrito la presencia de *S. suis* asociado a problemas reproductivos de las cerdas, que pueden cursar con repeticiones de celo,

acompañados de descargas vulvares de carácter mucopurulento (Sanford et al., 1982; Martelli et al., 1991) y abortos en las dos últimas semanas de gestación, con la expulsión de camadas completas, sin momificar y fetos con abundante líquido hemorrágico en cavidades y congestión de órganos, sin acompañarse de otras manifestaciones en la cerda, así como la presencia en algunas camadas de lechones débiles al nacimiento (Tarradas et al., 1994a).

Streptococcus suis también está implicado en cuadros de bronconeumonía, asociado o no a otros patógenos respiratorios, que cursan con tos, estornudos y disnea (Sandford et al., 1982; John et al., 1982; Erickson et al., 1987; Griffiths et al., 1991; Galina et al., 1992; Wasteson et al., 1994). La forma respiratoria ha sido siempre muy controvertida, porque para algunos investigadores no es una forma como tal sino un aislamiento secundario a otros agentes, tanto víricos como bacterianos (Galina et al., 1991). Parece ser que el aislamiento de cepas a partir de pulmón es consecuencia del acantonamiento en el parénquima pulmonar, de hecho actualmente existen una tendencia generalizada de considerar a las cepas aisladas de pulmón como cepas no invasivas frente a las invasivas que son las aisladas a partir de procesos nerviosos, septicémicos y artritis (King et al., 2002; Vela et al., 2003; Blume et al., 2009).

En estas formas, las lesiones suelen variar dependiendo de los otros agentes concomitantes con los que se suele asociar y generalmente incluyen congestión pulmonar, consolidación lobular con enfisema interlobular marcado, edema, pleuritis fibrinopurulenta y linfadenopatía del mediastino (Clifton-Hadley y Alexander, 1989; Martelli, 1992; Tarradas et al., 1994a). El examen microscópico revela la existencia de una neumonía intersticial (Li et al 2011) o bronconeumonía fibrinosa o supurativa con hemorragia septal y

linfocitos acumulados a nivel perivascular, peribronquial y peribronquiolar (John et al., 1982; Clifton-Hadley y Alexander, 1989).

En animales en crecimiento, se pueden observar formas articulares, con engrosamiento y enrojecimiento de las membranas sinoviales y la presencia de un líquido serofibrinoso, de claro a purulento, sin afectarse las superficies articulares (Sanford y Ross, 1986; Clifton-Hadley y Alexander, 1989; Gogolewski et al., 1990; Tarradas et al., 1994a). El examen histológico muestra una sinovitis proliferativa fibrinopurulenta, con infiltración de neutrófilos y células mononucleares (Clifton-Hadley y Alexander, 1989).

Para Sanford (1987), el corazón puede ser un órgano diana, produciendo en animales destetados unas lesiones similares a la enfermedad del corazón de mora, con una miocarditis necrotizante hemorrágica (Sanford y Park, 1987). En animales en las fases de crecimiento y terminación se pueden encontrar otras formas, como son pericarditis fibrinopurulentas y endocarditis valvulares vegetativas, mostrando predilección por la válvula atrioventricular izquierda (Pedersen y cols., 1981; John y cols., 1982; Sanford, 1987; Sanford y Park, 1987). El estudio histológico revela la presencia de una miocarditis necrótica, con hemorragias difusas, necrosis e infiltración de neutrófilos y células mononucleares a través del miocardio, así como trombosis, mineralización miofibrilar e invasión de bacterias en miocardio (Sanford y Park, 1982; Cook et al., 1988; Li et al., 2011).

Como se ha indicado, el diagnóstico debe ser confirmado mediante el aislamiento o la puesta en evidencia del agente causal. Las muestras a examinar para realizar el diagnóstico microbiológico de casos clínicos son hígado, bazo, pulmón, riñón, corazón, articulaciones, cerebro, cerebelo, meninges, líquido cefalorraquídeo y líquido sinovial (Chengappa et al., 1984; Touil et al., 1988; Kwiecien et al., 1992; Tarradas, 1993). En los casos

asociados a trastornos reproductivos, se pueden obtener de riñón, contenido estomacal y pulmones de fetos, así como del contenido uterino y secreciones vaginales de las cerdas (Touil et al., 1988; Devriese et al., 1990). Cuando se trata de animales clínicamente sanos, las muestras se obtienen bien en el matadero a nivel de tonsilas, o en la propia explotación, a partir de animales vivos, mediante torundas tonsilares y nasales, de mucosa rectal, prepucial y vaginal (Clifton-Hadley y Alexander, 1980; Clifton-Hadley et al., 1984; Robertson y Blackmore, 1987). Además, en matadero se pueden tomar muestras del linfocentro mandibular, tracto reproductor y ocasionalmente de otras vísceras (Robertson y Blackmore, 1987).

Para la puesta en evidencia de los estreptococos, tanto de muestras patológicas como de tonsilas, la mayoría de los investigadores utilizan medios de cultivo enriquecidos, como el agar sangre, o agar Columbia (Tarradas y cols., 1994; Staats et al., 1997; Luque et al., 1998; Gottschalk, 2012)., adicionados de un 5 o 7 por ciento de sangre de ovino, ternero o equino. La incubación se realiza en cámaras de aerobiosis o con un 5 por ciento de anhídrido carbónico a una temperatura de 37°C, durante 24 a 48 horas. También se emplean medios selectivos, que impiden el crecimiento de gérmenes Gram negativos, con el uso de agar sangre o agar Columbia, al que se adiciona un suplemento selectivo para estreptococos (Vela et al., 2003; Luque et al., 2010). Para el mantenimiento e identificación de las colonias aisladas se emplean medios líquidos, como caldo Todd-Hewitt o caldo Infusión Cerebro Corazón (Hommeiz et al., 1986; Kataoka et al., 1993; Monter et al., 1993; Tarradas, 1993).

Una vez aislado en medios de cultivo específicos, se pueden utilizar pruebas bioquímicas para la identificación preliminar, confirmando posteriormente con técnicas de PCR y otras técnicas moleculares (Okwumabua

et al., 2003; Vela et al., 2003; Wang et al., 2008), posteriormente, se realiza la detección del antígeno capsular, para determinar el serotipo en las cepas que presentan cápsula (Gottschalk et al., 2013), como se ha indicado anteriormente en el apartado de características generales de la especie.

En cuanto al diagnóstico serológico, hasta la fecha no se tienen resultados satisfactorios debido a la dificultad de discernir mediante técnicas de detección de anticuerpos (como ensayos ELISAs), entre animales de granjas infectadas y libres, ya que los títulos de anticuerpos de los animales portadores son muy bajos (Del Campo Sepulveda et al., 1996; Kataoka et al., 1996). Vetch y colaboradores desarrollaron en 1993 dos ELISAs directos doble sándwich usando anticuerpos monoclonales frente a las proteínas MRP y EF pero únicamente con el fin de diferenciar cepas virulentas del serotipo 2 frente cepas avirulentas. También se han usado para tapizar las placas de ELISAs la cápsula y células enteras del serotipo 2, dando también resultados decepcionantes (Blouin et al., 1994; Del Campo Sepulveda et al., 1996; Kataoka et al., 1996). Paralelamente, Serhir (1993) desarrolló un ELISA para determinar la presencia de la bacteria directamente desde los tejidos del animal, pero la sensibilidad y especificidad fueron muy bajas.

Yang y colaboradores (2007) desarrollaron una tira inmunocromatográfica para detectar la presencia de anticuerpos frente a la capsula del serotipo 2 de *S. suis* en el suero de animales; pero presenta las mismas limitaciones que los ensayos de ELISA, no permiten diferenciar entre animales de granjas infectadas y no infectadas y se limita solo a cepas del serotipo 2.

Por lo que como ha sido descrito anteriormente, actualmente, los estudios para el diagnóstico de este patógeno van encaminados al desarrollo de técnicas moleculares mucho más sensibles y específicas para detectar la

presencia de la bacteria en los animales portadores, determinar su carácter virulento y al serotipo que corresponden.

2.6. Lucha.

Las enfermedades debidas a estreptococos se consideran de carácter multifactorial, puesto que la prevalencia de estas infecciones aumenta cuando animales susceptibles son sometidos a condiciones de explotación inadecuadas. Las medidas de control se emplean para reducir las tasas de morbilidad y mortalidad, que se consiguen con medidas terapéuticas y preventivas, mientras que la erradicación implica la eliminación de estos microorganismos de las explotaciones (Madec y cols., 1985; Alexander, 1990).

Frente a un cuadro producido por *S. suis*, la mayoría de los investigadores están de acuerdo en afirmar que el grupo de los β -lactámicos y sus derivados son los que presentan mejores resultados (Sanford y Ross, 1986; Clifton-Hadley y cols., 1989); una terapia individual temprana con estos antimicrobianos, por vía parenteral, pueden prevenir la muerte y llevar a una recuperación completa del animal (Sihvonen y cols., 1988; Chengappa y cols., 1990; Sanford y Higgins, 1992). Para la terapia en masa, se emplean estos mismos antimicrobianos que sean efectivos por vía oral (Martelli, 1992).

Se ha demostrado que las cepas clínicas de *S. suis* muestran una marcada sensibilidad a penicilina, ampicilina y amoxicilina, una sensibilidad intermedia frente a la gentamicina, trimetoprin-sulfametoxazol, cefotaxime, cefalotina, oxaciclina, ceftiofur, cloranfenicol y meticiclina (Sanford y cols., 1982; Vaissaire y cols., 1983; Chengappa y cols., 1984; Touil y cols., 1988; Kwiecien y cols., 1992; Shryock y cols., 1992; Stuart y cols., 1992; Prieto y cols., 1993; Reams y cols., 1993; Tarradas y cols., 1994).

El uso continuado e indiscriminado de antimicrobianos en la industria porcina puede llevar al aumento y el desarrollo de resistencias (Mathew et al., 2007; Hendiksen et al., 2008; Palmieri et al., 2011). Esta puede ser transferida por plámidos o transposones y mediada por conjugación, transducción y transformación. Además, se ha demostrado que varios elementos responsables de la resistencia son similares a los que presentan otras especies de *Streptococcus* como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*; *S. agalactiae* y comparten el mismo sitio de inserción en el cromosoma, lo que sugiere que *S. suis* podría ser un importante reservorio de resistencias antimicrobianas para otras especies y el hombre (Mathew et al., 2007; Hendiksen et al., 2008; Palmieri et al., 2011).

S. suis presenta bastantes resistencias frente a las tetraciclinas y macrólidos y pueden presentar también resistencias frente a algunos β -lactámicos, fluoroquinolonas, aminoglucosidos como la neomicina, kanamicina o estreptomycin, a algunas lincosamidas como la lincomicina y clindamicina, al cloranfenicol, a las sales de cadmio, entre otros (Palmieri et al., 2011).

Los mayores porcentajes de resistencia se han detectado frente a tetraciclinas (más del 90%) y a los macrólidos (más del 70%) en cepas procedentes de cerdos de todo el mundo desde los años 80, así como en cepas humanas (Wisselink et al., 2006; Zhang et al., 2008; Palmieri et al., 2011). La resistencia frente a las tetraciclinas es debida a genes de protección ribosomal, principalmente *tet(M)* y *tet(O)* aunque se han descrito actualmente mas genes *tet* (Palmieri et al., 2011). La resistencia a los macrolidos está asociada a la presencia de genes *mef* que dan lugar al eflujo activo y a los genes *erm* que producen modificaciones en el sitio de unión de la metilasa. Estas resistencias han sido apreciadas en cepas porcinas y actualmente descritas en cepas humanas (Palmieri et al., 2011; Hoa et al., 2011). El aislamiento de cepas

negativas para ambos genes y que son resistentes a estos antibióticos hace pensar que existen otros mecanismos de resistencia frente a los macrólidos (Hoa et al., 2011).

Las bases genéticas para la resistencias frente al resto de antibióticos descritas hasta la fecha están en vías de estudio, la resistencia a las penicilinas, por ejemplo fueron descritas primero en cepas humanas en los años 80 y posteriormente en cepas porcinas, los mecanismos envueltos en esta resistencia son los cambios en tamaño y afinidad de la proteína de unión a la penicilina de la bacteria (Palmieri et al., 2011). Se han descrito también genes de resistencia a la kanamicina y a la streptomycin en cepas multiresistentes y además en la actualidad las cepas resistentes al cloranfenicol están aumentando en aislados humanos (Hoa et al., 2011). Ocasionalmente se ha descrito la resistencia a las fluoroquinolonas la cual parece ser debido a una mutación en regiones del genoma bacteriano y aun eflujo activo (Escudero et al., 2011).

Junto con la quimioprevención e inmunoprevención, se deben establecer una serie de medidas de control, las denominadas medidas de bioseguridad, sobre aquellos factores que puedan intervenir de una u otra forma en la presentación y difusión de la enfermedad; estas abarcan medidas sobre El diseño y la construcción de las instalaciones, la aplicación de un conjunto de medidas sanitarias y de manejo y la formación de recursos humanos, de tal forma que permitan proteger a una explotación de la entrada de agentes infecciosos y/o minimizar su difusión y consecuencias. Ejemplo de estas medidas serian; una higiene rigurosa, evitar sobrepoblación y mezcla de animales de distintas edades, detección y eliminación de animales portadores y reposición con animales libres de la enfermedad conociendo su historia clínica así como los antecedentes de las granjas que les suministran animales (Erickson, 1989; Alexander, 1990; Sanford y Higgins, 1992)., así como

desinfecciones regulares y completas entre lotes (Ripley y col., 1980; Vaissaire y cols., 1984; Erickson, 1989), entre otras. Las cuales son tan importantes que existe un RD 324/2000 sobre ordenación de explotaciones porcinas, aplicaciones prácticas, donde se establecen las normas de bioseguridad para nuevas explotaciones y/o ampliaciones.

La creciente preocupación por el desarrollo de resistencias antimicrobianas en medicina veterinaria y el posible riesgo para la salud pública obliga a centrar los esfuerzos en la prevención de las enfermedades, siendo la vacunación una de las medidas más eficaces de control (Lee et al., 2012). En el caso de *S. suis*, el uso de autovacunas ha tenido un éxito relativo; los resultados obtenidos con vacunas comerciales (basadas en cepas completas de uno o más serotipos) han sido infructuosos debido a la gran diversidad genética y la ausencia de reacciones cruzadas entre serotipos (Pallares et al., 2004; Baums et al., 2009; Blume et al., 2009; Chen et al., 2010; de Greef et al., 2011). Esto sumado al amplio número de serotipos virulentos y a la falta de conocimiento de los factores de virulencia, explican que desde hace años prevalezca la necesidad de descubrir antígenos comunes a todos los serotipos, con gran capacidad inmunógena, para la elaboración de vacunas comerciales que puedan ser aplicadas a nivel mundial (Baums et al., 2009). En este sentido, las proteínas de superficie bacteriana, que desempeñan un papel fundamental en la interacción célula-hospedador, están expuestas al sistema inmune y son más accesibles a los anticuerpos, pueden ser buenos candidatos para la fabricación de vacunas (Cordwell et al, 2006, Navarre et al., 1999; Baums et al., 2009; Mandanici et al., 2010).

Para alcanzar este objetivo, la proteómica se ha convertido en una técnica de elección para la detección de antígenos superficiales en diferentes grupos bacterianos, incluida la especie *S. suis* (Rodríguez-Ortega et al., 2008,

Wu et al., 2008; Cordwell et al., 2006; Navarre et al., 1999; Baums et al., 2009; Mandanici et al., 2010).

La proteómica es una rama de la genómica que estudia los proteomas, conjunto de proteínas que se expresan a partir del genoma de un organismo (Wilkins et al., 1996). Así, la proteómica se encarga de la identificación de las proteínas, estructura primaria (secuencia de a-a), identificación de sus modificaciones postraduccionales, localización y cuantificación de la expresión proteica (Aebersold et al., 2003; Hanash et al., 2003; Steen et al., 2004).

La principal herramienta de la investigación proteómica es la espectrometría de masas (EM), una tecnología que incluye la instrumentación (espectrómetros de masas), métodos de adquisición y *software* de análisis de datos. Los espectrómetros de masas constan de tres componentes fundamentales: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector. (Ziuzdak et al., 1996; Steen et al., 2004;). La EM es una técnica analítica que mide la relación masa/carga de una molécula y se utiliza para la detección e identificación de moléculas pequeñas. A finales de los años ochenta, gracias a la adopción de dos nuevos métodos de ionización de macromoléculas, la EM revolucionó la investigación de proteínas. El método de ionización por electrodispersión (ESI, del inglés *electrospray ionization*) permite la ionización de moléculas a partir de una solución acuosa bajo la aplicación de alto voltaje, mientras que la ionización por MALDI (del inglés *matrix laser assisted desorption/ionization*) produce iones a través del bombardeo con rayos láser de muestras en estado sólido asistido por matrices cristalizables (Tanaka et al., 1988; Fenn et al., 1989).

La aplicación de estas técnicas presenta varios puntos críticos, como son las posibles variaciones que pueden presentar las proteínas respecto al genoma, en cuanto a las características físico-químicas, abundancia,

localización subcelular y la interacción con otras moléculas o estructuras (Solis et al., 2011). Por ello, la preparación de la muestra biológica es uno de los pasos críticos para su posterior análisis e identificación, especialmente para evitar o minimizar la contaminación por proteínas indeseables. Asimismo, el estudio de proteínas superficiales es especialmente complicado, debido a que suelen encontrarse en menor cantidad que otras proteínas citoplasmáticas y la baja solubilidad, particularmente aquellas con dominios transmembrana (Rabilloud et al., 2008). Cuando se utiliza la proteómica de primera generación (es decir, la separación de proteínas por 2-DE seguido por el análisis MALDI - TOF), las proteínas de membrana son generalmente poco representadas, ya que su baja solubilidad en la mayoría de los tampones de rehidratación hace que precipiten durante la fase de isoelectroenfoque (IEF). Las proteínas extracelulares secretadas no presentan estos problemas, debido a la alta solubilidad. Aunque se han propuesto nuevas soluciones para superar estas limitaciones, como el uso de agentes reductores alternativos (DeStreak) o métodos de carga (*cup loading*, *paper-bridge loading*), que aumentan el número de proteínas de membrana identificadas a partir de un gel 2-DE, pero se pierde información topográfica (Görg et al., 2009).

La proteómica de segunda generación utiliza enfoques exentos de gel para la identificación de cientos o miles de especies (generalmente péptidos, después de tratamiento de la muestra con una proteasa) en una muestra líquida, seguido por LC/MS/MS de análisis en la mayoría de los casos. La amplia gama de combinaciones posible supera las limitaciones atribuidas a la proteómica a base de gel con respecto a proteínas de la membrana (Speers et al., 2007). Por otra parte, la información topológica de las proteínas que atraviesan a través de una membrana lipídica se puede obtener por diferentes combinaciones de digestión de la proteasa y el pH sobre las preparaciones de membrana, con el

fin de "rasurar " selectivamente el exterior y los dominios internos, de una manera secuencial (Wu et al., 2003).

A lo largo de más de dos décadas de investigación con este microorganismo, se han propuesto varios componentes de la bacteria como candidatos vacunales, que han tenido o no alguna relación con la virulencia como es el caso de la cápsula, que a pesar de ser un importante factor de virulencia, es pobremente inmunogénica y además se ha demostrado que es específica de serotipo (Wisselink et al., 2001; Baums et al., 2009).

Como se ha indicado, las investigaciones actuales se centran en proteínas de superficie (Cordwell et al., 2006, Navarre et al., 1999; Baums et al., 2009; Mandanici et al., 2010). Como en otras bacterias, estas juegan un papel clave en la interacción con sus hospedadores, ya que participan en procesos importantes para el desarrollo de las infecciones, como son la adhesión e invasión de células hospedadoras, toxicidad y evasión del sistema inmune. Pero también, al estar más expuestas, tienen una alta posibilidad de entrar en contacto con los elementos del sistema inmune del individuo, y por lo tanto ser reconocidas como antígenos (Navarra et al., 1999).

Entre las proteínas de las bacterias que cumplen esta función se encuentran las proteínas secretada (ya sean solubles liberadas libremente o encapsulado dentro de una estructura vesicular) y las proteínas ancladas a la superficie dentro de las cuales se encuentran las de la membrana lipídica externa y las de pared celular (motivo LPXTG).

En los últimos años se ha evaluado la capacidad protectora de varias proteínas de anclaje a la pared con el motivo LPXTG, como la *Muramidase Released Protein* (MRP), con una elevada capacidad inmunógena (Zhang y Lu, 2007; Baums et al., 2009). No obstante, su capacidad protectora ha resultado

controvertida, en función del modelo experimental utilizado. Autores como Geng et al., (2008) observaron una importante actividad bactericida de fagocitos de origen humano, cuando eran activadas con suero anti-MRP, pero en ensayos experimentales con cerdos, Baums y colaboradores (2009) no detectaron anticuerpos opsonicos, protectores, en los animales vacunados, y tampoco demostraron la capacidad protectora ante una infección, resultados similares a los obtenidos por otros autores (Wisselink et al., 2001). Otra de las proteínas ancladas a la pared evaluada como candidato vacunal es la denominada como *Surface-Anchored portein One* (SAO) (Li et al., 2006), también inmunógena, aunque los resultados obtenidos en ensayos experimentales son similares a los obtenidos con la proteína MRP, sin capacidad de proteger frente a infecciones con serotipos distintos del 2 (Li et al., 2007; Baums et al., 2009; Zhang et al., 2009).

La proteína *Opacity factor* (OFS), responsable de la opacidad del suero, también ha demostrado ser inmunógena, aunque los anticuerpos desaparecen pronto y además no protege frente a diferentes serotipos (Baums et al., 2006). Mandanici y colaboradores (2010) detectaron otra proteína de pared celular *Surface-Anchored Protein Two* (SAT) mediante proteómica, con la que obtuvieron buenos resultados en modelos murinos, aunque como ha sucedido con otros candidatos, los resultados obtenidos en otros laboratorios no han sido satisfactorios (Geng et al., 2008) y se ha comprobado que esta proteína no está presente en otros serotipos de importancia clínica (Chen et al., 2010). Otra proteína de pared *Hypothetical Protein* (HP0197) detectada mediante inmunoproteómica por Geng y colaboradores (2008) ha dado buenos resultados tanto *in vitro*, con la producción de anticuerpos opsonicos, como *in vivo* con modelos murinos, aunque la protección frente a la infección en cerdos resulta ser parcial (Zhang et al., 2009). Fontaine y colaboradores (2004) detectaron una *ADN nucleasa* con elevada capacidad inmunógena y producida por varios

serotipos, aunque su capacidad protectora aun no ha sido evaluada (Fontaine et al., 2004; Zhang y Lu, 2007).

Otras proteínas superficiales, a pesar de no presentar un dominio CWS conocido, han demostrado expresarse en superficie, también se han propuesto como candidatos vacunales; entre ellas, la *proteína de unión a la fibronectina y al fibrinógeno* (FBPS), la *enolasa* o la *6-fosfogluconato dehidrogenasa* (6PGD) no han mostrado buenos resultados, o son contradictorios entre los diferentes laboratorios (Zhang and Lu, 2007; Tan et al., 2008; Baums et al., 2009; Esgleas et al., 2009; Liu et al., 2009; Tan et al., 2009). Recientemente, Shao y colaboradores (2010) ponen de manifiesto la expresión en superficie de una de las proteínas de la triada de histidina de *S. suis* (HtpS) y es muy inmunógena y presenta un carácter protector en ratones e “in vitro” (Shao et al., 2010).

Por otro lado algunas lipoproteínas y proteínas de membrana de *S. suis* se han sugerido como candidatos vacunales; entre ellas; Aranda y colaboradores (2008) identifican tres lipoproteínas *divalent-cation-binding* de las cuales una de ellas demostró inducir fuerte protección en ratones.

Los trabajos de Geng y colaboradores (2008) identifican dos lipoproteínas la *ABC transporter periplasmic protein* y la *oligopeptide-binding protein OppA* mediante inmunoproteómica muy inmunógenas y dieron buenos resultados en ensayos “in vitro”. Por otro lado una proteína multitransmembrana anotada como *hypothetical protein* (HP0245) (Li et al., 2010) también ha dado buenos resultados “in vitro” e “in vivo”.

Las proteínas secretadas también han sido diana para estudiar su capacidad como candidatos vacunales frente a este patógeno. La *sulisina* o metaloendopeptidasa denominada *SsPepO* han presentado buenos resultados en

modelos murinos, pero no en cerdos (Jacobs et al., 1994; Jacobs et al., 1996; Kock et al., 2009; Li et al., 2011). La proteína *extracelular factor* (EF) (Vecht et al., 1991) parece ser muy inmunogénica, aunque la inmunización de animales con esta proteína no confiere protección pero combinada con la MRP, tuvo buenos resultados frente a *S. suis* serotipo 2 (Wisselink et al., 2001).

También se han propuesto como candidatos vacunales las proteínas del pilo, que podrían intervenir en la patogenia (Telford et al., 2006; Gianfaldoni et al., 2007). Recientemente se ha probado una proteína del pilo (PAPI-2b) como candidato vacunal frente a infecciones por *S. suis* en un modelo murino, con buenos resultados (Garibaldi et al., 2010).

La mayoría de estos trabajos se han centrado en *S. suis* serotipo 2, aunque la importancia de otros serotipos en los brotes clínicos producidos tanto en cerdos como en humanos, ha sido ampliamente demostrada (Kaufhold y Ferrieri, 1993; Lun et al., 2007; Princivalli et al., 2009; Feng et al., 2010; Gottschalk et al., 2010; Nghia et al., 2011). Algunos autores han intentado evaluar la eficacia de preparados vacunales frente a diferentes serotipos de *S. suis*, fundamentalmente del 2 y 9 (Li et al., 2006; Wu et al., 2008; Zhang et al., 2007, 2009; Chen et al., 2009; Garibaldi et al., 2010; Mandanici et al., 2011; Wang et al., 2011). Baums y colaboradores (2009), comprobaron que no había protección cruzada para los serotipos 2 y 9 usando como vacuna un conjunto de proteínas superficiales al que denominó *MAP*.

No obstante las investigaciones en el uso de vacunas vivas atenuadas con este microorganismo siguen estando a la orden del día, a pesar de no haber demostrado que confieran protección frente a más de un serotipo (Baums et al., 2009; Kock et al., 2009), ya que estas han demostrado tener buenos efectos frente a otros patógenos como *Actinobacillus pleuropneumoniae* o *Streptococcus pneumoniae* (Roche et al., 2007; Ramjeet et al., 2008).

Diferentes trabajos lo corroboran como los realizados por Baums y colaboradores (2009) comprobaron que no había protección cruzada para los serotipos 2 y 9 usando una *bacterina* (vacuna completa inactivada) del serotipo 2. Por otro lado, Dekker y colaboradores (2011) y Büttner y colaboradores (2012) no obtuvieron buenos resultados de protección homóloga y heteróloga con bacterinas elaboradas con una cepa de *S. suis* serotipo 9. También se han usado vacunas vivas, usando cepas mutantes que no expresaban una proteína (*ofs*) obteniendo malos resultados de protección frente a los serotipo 2 y 9 (Kock et al., 2009).

Por tanto como se ha indicado anteriormente para poder afrontar un programa de lucha basado en la vacunación, las investigaciones deber ir dirigidas a la identificación de antígenos comunes a todas o la mayoría de los serotipos de *S. suis* para el desarrollo de una vacuna de amplia cobertura (Baums et al., 2009).

Como es evidente uno de los pasos fundamentales en la búsqueda de vacunas es determinar si los candidatos que se seleccionan verdaderamente tienen un efecto protector frente a una infección por el patógeno. Para demostrar la capacidad protectora de estos nuevos productos, se deben realizar estudios de infección experimental, en condiciones *in vitro* e *in vivo*, de forma que los resultados puedan ser correctamente analizados y extrapolables (Fittipaldi et al., 2012). Tradicionalmente, los modelos in “vitro” se han utilizado para conocer los mecanismos de interacción bacteria-hospedador en líneas celulares de diferentes orígenes (LLC-PK1, PK15, A549, HeLa, HeP2, PBMEC) (Charland et al., 2000; Lalonde et al., 2000; Benga et al., 2005). Otra de las aplicaciones que presentan, es evaluar la respuesta inmune que se activa frente a la infección, tanto celular, en cuanto a la liberación de citoquinas y quimioquinas, se refiere (Segura et al., 2004; Dominguez-Punaro et al., 2008;

Vanier et al., 2009; Ye et al., 2009), como humoral (Chabot-Roy et al., 2006; Baums et al., 2009).

Diferentes autores señalan que los anticuerpos opsonicos protegen al animal frente a la enfermedad causada por este patógeno (Chabot-Roy et al., 2006), por ello, la técnica de opsonofagocitosis permite de forma rápida y sencilla determinar *in vitro* la capacidad protectora de los nuevos antígenos vacunales (Chabot-Roy et al., 2006; Baums et al., 2009, 2010). La opsonización por anticuerpos es la acción por la cual se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito; ésta conlleva la unión de un anticuerpo a un receptor en la membrana celular del patógeno y tras la unión, los fagocitos son atraídos al patógeno y en presencia de complemento, fagocitan a la bacteria (Chabot-Roy et al., 2006; Baums et al., 2009). Como se ha descrito previamente son muchos los autores que utilizan estos modelos “*in vitro*” para determinar de forma rápida y sencilla si los anticuerpos creados frente a un antígeno son protectores (Zhang et al., 2009; Baums et al., 2009; Geng et al., 2008; Li et al., 2007).

En referencia a los estudios *in vivo*, como se ha puesto de manifiesto aun no hay consenso en el modelo animal que debe ser utilizado para evaluar la virulencia y capacidad protectora de las nuevas vacunas (Fittipaldi et al., 2012). Hasta la fecha, se han desarrollado modelos murinos (Dominguez-Punaro et al., 2008-2012; Chen et al., 2010; Garibaldi et al., 2010; Seitz et al., 2012), porcinos (Li et al., 2007; Baums et al., 2009) y más recientemente se está utilizando el zebrafish (Zheng et al., 2013; Zhang et al., 2013) para valorar la eficacia de las vacunas, que han dado resultados muy variables, en función de la cepa, dosis y vía de infección, así como de los adyuvantes utilizados (Li et al., 2006, 2007; Hogenesch, 2012; Krejci et al., 2013).

Aunque diferentes estudios señalan que los resultados obtenidos con modelos murinos podrían no ser extrapolables al cerdo (Vecht et al., 1991-1997), estos se siguen usando para el desarrollo de vacunas frente a *S. suis* (Hogenesch, 2012; Krejci et al., 2013; Fu et al 2013; Lin et al., 2013; Wang et al., 2013). Los modelos murinos se han utilizado desde hace décadas para el estudio de las infecciones por *S. suis*, ya que se ha demostrado que es la especie que mejor reproduce la enfermedad de los cerdos (Robertson y Blackmore, 1990; Dominguez-Punaro et al., 2008). Otros autores señalan diferencias entre líneas de ratones, en cuanto a la susceptibilidad a la infección se refiere, como la línea CD-1 frente a otras como la BALB/c (Dominguez-Punaro et al., 2008), al ser además una línea no consanguínea es más apropiada para la valoración de nuevos tratamientos (Zuñiga, 2001); o la susceptibilidad de las BALB/c y la SS frente a otras como la ICR, ddY o la C57BL/6 (Kataoka et al., 1991). Por tanto urge la necesidad de estandarizar la metodología para evaluar la protección de los diferentes antígenos frente a las infecciones causadas por este patógeno (Fittipaldi et al., 2011).

Por otro lado ha de tenerse en cuenta que las nuevas vacunas recombinantes elaboradas con antígenos, y no células completas, son menos inmunógenas, y es necesario utilizar diferentes adyuvantes para potenciar la respuesta inmune en el huésped (Baums y Valentin-Weigand, 2009; Singh y O'Hagan, 2003).

Los adyuvantes son sustancias inmunomoduladoras que pertenecen a familias muy heterogéneas en cuanto a su naturaleza química, origen y actividad biológica específica que provocan. Dentro de ellos están los agentes inmunopotenciadores, a los cuales se le atribuye la estimulación de la respuesta inmune adaptativa por la activación de las células inmunitarias innatas que, a

su vez, proporcionan señales para la activación de los linfocitos; favoreciendo la resistencia no específica del huésped contra las enfermedades infecciosas y la potenciación de la inmunogenicidad de las vacunas (Hogenesch, 2012; Krejci et al., 2013).

Entre los factores involucrados en la selección de un adyuvante se encuentran: el tipo de respuesta deseada o que se quiere evitar, la especie vacunada, la ruta de administración y los efectos colaterales inducidos por él; deben ser baratos, no tóxicos y poco inmunogénicos. Además, deben ser estables, biodegradables y, preferiblemente, deben promover inmunidad tanto humoral como celular dependiendo de las características del antígeno y los mecanismos de protección contra la enfermedad en cuestión (aumentar el envío de antígenos a las células presentadoras; dirigir la respuesta en el sentido Th1 o Th2; promover respuestas citotóxicas) (Hogenesch, 2012; Krejci et al., 2013).

Además, se debe evaluar el riesgo de reacciones adversas que pueden ser locales o sistémicas. Las locales incluyen dolor, inflamación y/o necrosis en el sitio de la inyección o en zonas adyacentes. Las sistémicas incluyen anafilaxis, toxicidad específica de órgano e inmunotoxicidad, como liberación de citocinas, inmunosupresión y enfermedades autoinmunes (Gupta et al., 1993; Allison et al., 1991).

La lista de productos adyuvantes es cada vez mayor; sin embargo, sólo un reducido número se utiliza en la formulación de vacunas veterinarias. Los más utilizados en vacunas en condiciones experimentales en ratones han sido el hidróxido de aluminio (Al(OH)_3), adyuvante incompleto de Freund (FIA) y las emulsiones de aceite en agua (OW) y en cerdos emulsiones de aceite en agua,

agua en aceite, hidróxido de aluminio y el Quil A (una saponina) (Baums y Valentín-Weigand, 2009).

Los mecanismos de acción de estos adyuvantes son poco conocidos. La inmunización con vacunas que contienen $\text{Al}(\text{OH})_3$ inducen la activación de una población mixta de células Th_1 y Th_2 y un aumento de las células T_{FH} en los ganglios linfáticos. Estudios recientes sugieren que las T_{FH} en lugar de las células Th_2 son críticas para las respuestas inmunes mediadas por anticuerpos (Hogenesch et al., 2012; Serre et al., 2010). Este adyuvante también permite la diferenciación de las células Th_{17} en ratones, que es crítica para la protección contra la colonización de la bacteria (Lu et al., 2008). Además provocan una buena adsorción a los antígenos, que influye de manera positiva en la presentación de estos al sistema inmune (Zlatkovic et al., 2013) y estimular al sistema del complemento (Güven et al., 2013), a lo que hay que añadir que es barato, fácil de usar y que no produce lesiones en el punto de inoculación, como sucede con otros adyuvantes (Krejci et al., 2012).

FIA y OW son emulsiones de alta viscosidad que inducen una liberación lenta del antígeno desde el sitio de inyección, provocando una respuesta inflamatoria que estimula el reclutamiento de células presentadoras de antígeno, como macrófagos y linfocitos, así como diferentes citoquinas o quimiquinas específicas. FIA es una emulsión de agua en aceite que induce la producción de niveles más elevados de anticuerpos IgG2a que otros tipos de adyuvantes y también puede mejorar la respuesta inmune celular (Aucouturier et al., 2001). Las emulsiones de aceite - en - agua (OW) inducen una fuerte respuesta inmune a corto plazo y se caracteriza por la estimulación de una respuesta de anticuerpos de memoria, con una activación mixta de la respuesta Th_1 - Th_2 (Aucouturier et al., 2001; Coffman et al., 2010).

Entre las propiedades asociadas al Quil A se incluyen: un excelente efecto adyuvante para antígenos T-dependientes y T-independientes, y la estimulación de respuestas de células T auxiliaadoras de tipo 1 (Th1). Las saponinas también potencian el efecto inmunitario con vacunas administradas a través de mucosas y han sido utilizadas en combinaciones con otros adyuvantes, como el hidróxido de aluminio (Kensil, 1996).

El descubrimiento de nuevos antígenos con alta capacidad inmunógena, que sean capaces de proteger frente a la infección con los serotipos de mayor importancia clínica en el ganado porcino y en la especie humana debe ser un objetivo prioritario de todos los países productores de cerdo, y especialmente en aquellos donde esta enfermedad es considerada emergente. Los objetivos de este trabajo de investigación pretenden aportar conocimientos sobre la búsqueda y selección de nuevos candidatos vacunales frente a las infecciones por *Streptococcus suis*.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

OBJETIVO 1:

Identificación y selección de proteínas de superficie comunes a la mayoría de los serotipos de *S. suis* de importancia clínica mediante estrategias proteómicas para la fabricación de vacunas recombinantes.

OBJETIVO 2:

Determinación de las condiciones experimentales y valoración de la capacidad protectora *in vitro* e *in vivo* de la vacuna recombinante Wellvac- suis frente a las infecciones por *S. suis* en cerdos.

Para el desarrollo de este objetivo, se han marcado los siguientes objetivos específicos:

- 2.1. Selección de una cepa virulenta de *S. suis* serotipo 2 mediante una infección experimental en ratones.
- 2.2. Evaluación de tres adyuvantes para el desarrollo de vacunas frente a *S. suis* y capacidad protectora de la una vacuna recombinante rSsnA en modelos murinos.
- 2.3. Selección de una cepa virulenta de *S. suis* serotipo 2 mediante una infección experimental en ratones.
- 2.4. Valoración de la capacidad protectora de la vacuna recombinante Wellvac- suis frente a las infecciones por *S. suis* en cerdos.

CAPÍTULO 4. *ENSAYOS EXPERIMENTALES. OBJETIVO 1*

OBJETIVO 1: IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE PROTEÍNAS SUPERFICIALES COMUNES A DIFERENTES SEROTIPOS DE *S. SUIIS*, MEDIANTE ESTRATEGIAS PROTEÓMICAS, PARA LA FABRICACIÓN DE VACUNAS RECOMBINANTES.

JUSTIFICACION:

Hoy en día, aún no disponemos de una vacuna eficaz frente a la especie *S. suis*, a pesar de la importancia para el sector porcino y el carácter zoonótico de este microorganismo. La gran diversidad de serotipos, así como la ausencia de reacciones cruzadas, hace que los compuestos que se han desarrollado tengan una eficacia limitada para el control de brotes (Baums et al., 2009). Actualmente, y con la finalidad de conseguir una vacuna comercial eficaz, se presta especial atención a las proteínas de superficie, especialmente aquellas ancladas a la pared celular, ya que se expresan en grandes cantidades y son más accesibles a los anticuerpos, factores que pueden influir en una respuesta inmune elevada y eficaz (Cordwell et al, 2006, Navarre et al., 1999; Baums et al., 2009; Mandanici et al., 2010).

Para alcanzar este objetivo, la proteómica se ha convertido en una técnica de elección para la detección de antígenos superficiales en diferentes grupos bacterianos, incluida la especie *S. suis* (Rodríguez-Ortega et al., 2008, Wu et al., 2008). En el desarrollo de vacunas frente a patógenos bacterianos, la técnica del *shaving*, basada en el tratamiento de las células vivas con proteasas y posterior análisis de los péptidos generados por LC/MS/MS, se ha convertido en una técnica muy valiosa para identificar de manera más rápida y fiable las proteínas de superficie (Doro et al., 2009; Rodríguez et al., 2006).

El objetivo de este estudio fue identificar un conjunto de proteínas comunes a los serotipos (*pan-surfoma*) más importantes y prevalentes de *S. suis* en Europa, mediante la técnica del *shaving*, con la finalidad de detectar nuevos antígenos superficiales que puedan ser utilizados en una vacuna de subunidades.

MATERIAL Y MÉTODOS

A. Cepas de *S. suis* analizadas y condiciones de cultivo.

Se analizaron 39 cepas de *S. suis* aisladas de animales enfermos, pertenecientes a 19 serotipos (Tabla 2.1), que habían sido aisladas en un periodo de 11 años en el Servicio de Diagnóstico del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba, a excepción de las cepas con referencia número 5215, 8010, 5225, 6217, 6218, 6221, que fueron cedidas amablemente por el profesor Henk Wisselink (Instituto Central de Veterinaria de Wageningen, Lelystad, Holanda) y la cepa P1/7 (cepa de referencia europea).

Todas las cepas, mantenidas a -80 °C, se sembraron en placas de agar Columbia suplementadas con un 6% (v/v) de sangre desfibrinada de oveja (CNA). Una vez cultivadas en este medio, se incubaron en 100 mL de un medio químicamente definido (CDM) (van de Rijn et al., 1980) a 37 °C y 5% CO₂ hasta una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀= 0.25, equivalente a la mitad de la fase exponencial).

Tabla 2.1. Cepas de *S. suis* utilizadas en este trabajo.

Referencia	Año	Lesión	Órgano	Serotipo
638/03	2003	Artritis	Articulación	1
P1/7	-	Meningitis	Cerebro	2

235/02	2002	Septicemia	Riñón	2
365/03	2003	Meningitis	Cerebro	2
682/06	2006	Septicemia	Hígado	2
123/11	2011	Artritis	Articulación	2
225/00	2000	Artritis	Articulación	3
14/03/	2003	Septicemia	Riñón	4
636/03	2003	Bronconeumonia	Pulmón	4
196/05	2005	Septicemia	Bazo	4
633/99	1999	Aborto	Feto	5
5215	-	-	-	6
22/02	2002	Septicemia	Pulmón	7
204/03	2003	Meningitis	Cerebro	7
40/03	2003	Artritis	Articulación	8
160/03	2003	Bronconeumonia	Pulmón	8
553/05	2005	Septicemia	Hígado	8
3144	2011	Meningitis	Cerebro	9
8010	-	-	-	9
233/01	2001	Artritis	Articulación	9
10/06	2006	Meningitis	Cerebro	9
228/06	2006	Meningitis	Cerebro	9
34/11	2011	Meningitis	Cerebro	9
340/05	2005	Bronconeumonia	Pulmón	10
546/05	2005	Meningitis	Cerebro	14
232/06	2006	Artritis	Articulación	14
5225	-	-	-	15
609/02	2002	Bronconeumonia	Pulmón	15
668/02	2002	Meningitis	Cerebro	15
724/02	2002	Septicemia	Riñón	16
226/03	2003	Nervioso	Cerebro	16
592/06	2006	Nervioso	Cerebro	16
574/02	2002	Nervioso	Cerebro	20
6217	-	-	-	24
6218	-	-	-	25
6221	-	-	-	28
635/03	2003	Nervioso	Cerebro	1/2
658/02	2002	Nervioso	Cerebro	1/14
699/02	2002	Nervioso	Cerebro	1/14

B. Análisis proteómico

B.1. Digestión superficial de las bacterias vivas.

El cultivo se centrifugó a $3500 \times g$ durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se lavó tres veces con PBS (*Phosphate Buffer Saline*, pH 7,4). Posteriormente, las células se resuspendieron en 0,8 ml de PBS con un 30% de sacarosa. Las reacciones proteolíticas se llevaron a cabo con tripsina (Promega) a $10\text{ }\mu\text{g/mL}$, durante 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, en agitación.

Las mezclas resultantes de las digestiones se centrifugaron a $3500 \times g$ durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y los sobrenadantes (los "surfomas" con los péptidos) se filtraron, utilizando filtros con un tamaño de poro de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore). A continuación, los surfomas fueron redigeridos con $2\text{ }\mu\text{g}$ de tripsina durante toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación, deteniendo la reacción con ácido fórmico al 0,1%. Las sales se eliminaron mediante columnas de extracción de Oasis HLB (Waters) y los péptidos se eluyeron con concentraciones crecientes de acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1%, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las fracciones de sobrenadantes donde estaban los péptidos se concentraron con un concentrador de vacío (Eppendorf), y se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

B.2. Análisis LC/MS/MS.

Las muestras de "surfomas" fueron analizadas en la Unidad de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba (SCAI) mediante espectrometría de masas LTQ-Orbitrap (Thermo

Fisher Scientific, San José, EE.UU.) equipado con una interfaz de ionización nanoelectrospray (nESI).

Se utilizó una columna de separación de 150 mm × 0.150 mm ProteoPep2 C18 (New Objective, EEUU), y una velocidad de flujo postsplit de 1 µL/min. Para la captura de la digestión, se utilizó una precolumna de 5 mm × 0,3 mm Zorbax 300 SB-C18 (Agilent Technologies, Alemania). Del volumen total de la muestra, se tomaron 5 µL y se cargaron a una velocidad de flujo de 10 µL/min durante 10 minutos en 5% acetonitrilo/0.1% de ácido fórmico. A continuación, se alineó la precolumna con la columna de separación y comenzó el gradiente de separación. Los péptidos se eluyeron entonces con un gradiente 5-40% de solución de acetonitrilo/0.1% ácido fórmico, a una velocidad de flujo de 250 nL/min, durante 60 minutos.

Los datos de MS (“Full Scan”) fueron adquiridos en modo ion positivo en el intervalo de m/z 400-1500. Los datos MS/MS se adquirieron en modo dependiente de barrido, seleccionando automáticamente los cinco iones más intensos de la fragmentación, en modo de exclusión dinámica. En todos los casos, se utilizó un voltaje de pulverización nESI de 1,9 kV.

B.3. Búsqueda en la base de datos e identificación de proteínas.

Las búsquedas e identificaciones de los péptidos se realizaron utilizando el programa MASCOT v2.1 con una base de datos local que contiene 1825 proteínas derivadas de la secuencia completa del genoma de la

cepa *S. suis* P1/7 (Ref Seq NC_012925.1 descargado de ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria/Streptococcus_suis_P1_7, versión NCBIInr 20090707). Los parámetros de búsqueda de MASCOT fueron: (i) especie, *Streptococcus suis* cepa P1/7; (ii) cortes permitidos que pierda la enzima, 3; (iii) modificaciones post-traduccionales, oxidación de metionina y desamidación de residuos de glutamina y asparagina; (iv) tolerancia de masa de péptido, ± 1 Da.; (v) tolerancia de masas de fragmentos, ± 0.6 Da y (vi) la carga de péptido, desde +1 a +4. Todos los espectros correspondientes a identificaciones positivas o cerca de los umbrales, se inspeccionaron manualmente.

B.4. Análisis bioinformático de las secuencias de las proteínas identificadas.

A continuación, para determinar la localización subcelular de las proteínas identificadas, se utilizó el algoritmo LocateP (Zhou et al., 2008), así como el algoritmo TMHMM (Krogh et al., 2001) para la búsqueda de las hélices transmembranas, SignalP (Bendtsen et al., 2004) para saber el tipo de señal de las proteínas (tipo I secretadas) y el LipoP (Juncker et al., 2003) para identificar a aquellas proteínas con el péptido señal tipo II (lipoproteínas). Las representaciones topológicas de las proteínas de membrana se realizaron con el software Topo2 (<http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/>).

C. Selección de candidatos vacunales proteicos

C.1. Expresión de las proteínas recombinantes SsnA y OppA.

Para la obtención de las proteínas recombinantes, expresamos un fragmento de la proteína SsnA (*surface-anchored DNA nuclease*), codificada por el ORF SSU1760 en la secuencia de la cepa P1/7 de *S. suis*, que abarca los aminoácidos G36-L352, y un fragmento de la proteína OppA (*oligopeptide-binding protein OppA precursor*), codificada por el ORF SSU1664, que abarca los aminoácidos S281-E596. Los fragmentos de ADN correspondientes se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de la cepa de *S. suis* P1/7. Por otra parte, los fragmentos de las proteínas recombinantes se produjeron como polipéptidos fusionados a la glutatión S-transferasa (GST) en *Escherichia coli* DH5 α con el vector pRGSTENT (Biomedal), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos recombinantes se expresaron después de la inducción con IPTG en *E. coli* BL21, y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con una columna de GSH, comprobando que la pureza era superior al 95%. Las identificaciones de las proteínas se confirmaron mediante análisis MALDI-TOF/MS.

C.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la detección de los genes que codifican cada una de las proteínas, se extrajo el ADN genómico de cada aislamiento. Los cebadores diseñados para la detección de los genes de la SsnA y de la OppA se muestran en la Tabla 2.2. El protocolo de PCR fue 5 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 90 s a 56 °C y 1 min a 72 °C. Los productos resultantes se visualizaron en un gel de agarosa al 1% y fueron de 913 pb para SsnA y 955 pb para OppA.

Tabla 2.2. Cebadores diseñados para las proteínas OppA y SsnA

Proteína	Forward	Reverse
OppA	5' CTTTCAGCATCTGTTCTTGCAG 3'	5' TCTTACCAGCTGCTTCGTCATA 3'

SsnA 5' TATCGGATTGATTGAAGTGCAG 3' 5' TGGTGGCTTGTTATTGTTGGTC 3'

C.3. Producción de suero hiperinmune anti-SsnA y anti-OppA en conejos.

Se utilizaron dos conejos New Zealand para la obtención de los sueros hiperinmunes frente a las dos proteínas recombinantes obtenidas, mediante un protocolo basado en 6 inmunizaciones. La primera consistió en una inyección subcutánea de la proteína recombinante rSsnA o rOppA (250 µg) mezclada con el adyuvante completo de Freund en el día 0. Las demás inmunizaciones se realizaron los días 14, 28, 35, 57 y 64 por vía intramuscular (125 µg de proteína) con adyuvante incompleto y completo de Freund alternativamente. El suero preinmune de los conejos se recogió antes de la primera inyección, y se utilizó como control negativo.

C.4. Infección experimental de ratones.

Para demostrar el carácter inmunógeno de ambas proteínas, seis ratones hembras de la estirpe CD1 (Charles River Laboratories, Francia), de 4 semanas de edad, se dividieron en dos jaulas aleatoriamente, con tres animales por grupo. Los animales se aclimataron a unas condiciones de 12 horas luz/12 horas oscuridad, y se mantuvieron con comida y agua *ad libitum*. Los animales del grupo 1 fueron infectados con 1mL de una suspensión de *S. suis* (ref. 235/02, cps2, mrp+ef+sly+) que contenía 2×10^6 ufc/mL en PBS y los animales del grupo 2 fueron inoculados con 1mL de PBS. Una vez transcurridos treinta días tras la infección, los animales fueron sacrificados y se obtuvo la sangre por punción cardíaca en tubos con sistema de vacío BD Vacutainer® sin anticoagulante para recoger el suero. Las infecciones se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de la Unión Europea para el

manejo de animales de laboratorio y fueron aprobadas por el Comité de Ética de la Universidad de Córdoba (Ref. número 5177).

C.5. Análisis de inmunofluorescencia por citometría de flujo.

Para demostrar la expresión en superficie de las proteínas seleccionadas, las distintas cepas de *S. suis* se sembraron en caldo Todd-Hewitt (THB) y se dejaron incubar hasta la mitad de la fase exponencial, se recogieron por centrifugación y se diluyeron hasta una concentración de 10^7 células/mL. A continuación, se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon durante 30 min a 20 °C con 100 µL de PBS que contenía 10% de suero fetal bovino (PBS-FCS). Los tubos se lavaron dos veces con tampón de lavado que contenía PBS con albúmina sérica bovina al 1% (BSA).

Los antisueros de conejo frente a la SsnA y a la OppA se diluyeron (1:200) en PBS-BSA y se incubaron con las bacterias durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, se incubaron con anti-IgG de conejo de cabra conjugado con ficoeritrina (Invitrogen), diluido 1:50, a 4 °C en oscuridad durante 30 min. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en PBS que contenía un 4% de paraformaldehído. Finalmente, se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson), utilizando el software FlowJo (Tree Star, Inc., EE.UU.) para el estudio de los datos. Se consideraron positivas aquellas muestras que daban una fluorescencia mayor de 2. Se estima que el valor de 2 representa el umbral por encima del cual no hay prácticamente solapamiento (o es menor del 5%) entre las dos poblaciones de células (suero inmune y preinmune) para las que se hace el ensayo.

C.6. Western blot de extractos totales de las bacterias.

Se realizó el Western blot para poner en evidencia la expresión de la proteína OppA. Todas las cepas de *S. suis* utilizadas en este trabajo fueron sometidas a un tratamiento con mutanolisina toda la noche a 37 °C, se sonicaron (6 ciclos de 20 segundos a media potencia) y centrifugaron. A continuación, 30 µL del sobrenadante del extracto total fue separado mediante electroforesis SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico) al 12%. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 20 minutos a 15 V, utilizando un sistema de transferencia semiseca (Amersham Pharmacia Biotech). Luego se incubaron durante 1 hora a 37 °C con el suero hiperinmune anti-OppA a una dilución 1/5000. Para revelar la reacción se utilizó suero anti-IgG de cabra frente a conejo, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (1/2500) y se revelaron con el kit ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

C.7. Técnica ELISA para valoración de anticuerpos en suero

Se utilizó una técnica de Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) indirecto, de fabricación propia, para valorar el título de anticuerpos generado frente a ambas proteínas. Las placas de microtitulación se tapizaron con 0,5 mg/mL de rSsnA u rOppA en tampón de tapizado (0,05 M de NaHCO₃, pH 9,6) y se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Después de lavar tres veces con PBS-0,05% de Tween-20, las placas se bloquearon con 100 µL de BSA al 2% durante 1 h a 37 °C, y se lavaron de nuevo tres veces. Posteriormente, se incubaron con los sueros problema diluidos (diluciones dobles seriadas) durante 40 min a 37 °C. Para revelar la reacción, cada pocillo se incubó con

Inmunoglobulinas G (IgG) anti-conejo o anti-ratón unidas a HRP (Sigma-Aldrich), diluida 1:5.000 en tampón de lavado durante 40 min a 37 °C.

Las placas se lavaron tres veces y la reacción se reveló mediante la adición de 100 µL de la solución sustrato 3,3',5,5' tetrametil-bencidina (sustrato TMB, Sigma-Aldrich) en oscuridad durante 20 min. La reacción se detuvo añadiendo 100 µL de solución de parada (Sigma-Aldrich) y por último, medimos la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA (BIO-RAD). Se consideraron positivos todos aquellos sueros que dieron una DO_{450} mayor a la del control negativo por dos veces su desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Pan-surfoma de un conjunto de aislados clínicos de *S. suis*.

En este trabajo, se presenta por primera vez la comparación del proteoma de un amplio número de serotipos, con el objetivo de identificar proteínas comunes a la mayoría de ellos, cuya capacidad inmunógena o de protección aún no haya sido descrita.

Buscando aquellas proteínas con un buen potencial como candidato vacunal (es decir, aquellas que estén expuestas en superficie y ampliamente distribuidas entre serotipos), se aplicó la técnica del *shaving* a cepas pertenecientes a la mayoría de los serotipos de *S. suis* de importancia clínica en Europa. Para ello, analizamos una colección de 39 cepas de *S. suis* aisladas de cerdos enfermos en granjas de España y Holanda durante los últimos 11 años, pertenecientes a 19 serotipos diferentes.

Se definió el surfoma de cada cepa mediante su análisis individual, es decir, la lista de las proteínas de superficie identificadas experimentalmente de las predichas en el genoma de la cepa de *S. suis* P1/7. El "pan-surfoma" global, es decir, el conjunto de proteínas que se identificaron en todas las cepas, fue de 113 proteínas (Tabla 2.3). En esta tabla, se muestra la clasificación de las proteínas de acuerdo a las predicciones subcelulares del algoritmo LocateP: lipoproteínas (proteínas unidas a lípidos); proteínas de la pared celular (con el motivo LPXTG); proteínas secretadas (aquellas que poseen un péptido señal de tipo I), proteínas de membrana con un dominio transmembrana (TMD), o proteínas multi-transmembrana (aquellas proteínas de membrana con >1 TMD). De todas las proteínas encontradas, las lipoproteínas fueron en número absoluto las más identificadas (33 de las 42 predichas en el genoma de P1/7, que representa 78,6% del total). Las proteínas de la pared celular identificadas representaron el 85% de las predichas en el genoma (17 de 20). También se identificaron 9 proteínas secretadas (50% del total), 28 de membrana con un solo motivo transmembrana (TMD) (26,2% del total predicho) y 26 con más de un TMD (7,5% del total predicho).

Tabla 2.3: Clasificación de las proteínas de acuerdo a las predicciones subcelulares del LocateP.

Categoría	Proteínas identificadas	Proteínas predichas (<i>S. suis</i> P1/7)	Identificadas/predichas (%)
Lipoproteína	33	42	78.6
Pared Celular	17	20	85.0
Secretada	9	18	50.0
Membrana (1 TMD)	28	107	26.2
Membrana (>1 TMD)	26	347	7.5
Total	113	534	21.2

La lista de todas las proteínas de superficie identificadas dentro de las predichas se muestran en la Tabla 2.4, donde también se indica la frecuencia de identificación para cada proteína entre los serotipos y cepas analizadas. De

todas las categorías, las proteínas de la pared celular fueron las que se expresaron con mayor frecuencia: 7 proteínas se encontraron en más de la mitad (≥ 10) de los serotipos, y tres de ellas (*cell envelope proteinase*-SSU0757, *5'-nucleotidase*-SSU0860 y *surface-anchored DNA nuclease*-SSU1760) fueron identificadas en más del 50% (es decir, 20 o más) de los aislados clínicos analizados. Por otra parte, 6 lipoproteínas se encontraron en ≥ 10 serotipos, y sólo dos de ellas fueron identificadas en ≥ 20 aislamientos (*Streptococcal histidine triad-family protein*-SSU1390, *Lipoprotein*-SSU0656).

Se identificaron dos proteínas secretadas en $\geq 50\%$ de los serotipos: *exported protein*-SSU0465, que se encontró en 14 serotipos diferentes y 25 aislados, y *N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase*-SSU1127, que se detectó en 10 serotipos diferentes y 16 cepas. Se identificaron asimismo cuatro proteínas transmembrana con sólo 1 TMD en ≥ 10 serotipos diferentes (*Streptococcal histidine triad-family protein*-SSU0309, *Mac family protein*-SSU0496, *amidase*-SSU0020, *Streptococcal histidine triad-family protein*-SSU1103), pero ninguna estaba presente en más de la mitad de las cepas de *S. suis* analizadas, aunque la *streptococcal histidine triad-family protein*, estaba presente en un número elevado de serotipos (14) y casi la mitad de los aislados (19). Entre las proteínas multitransmembrana, ninguna pasó estos umbrales.

Podemos observar que, de todas la categorías establecidas, la proteínas de pared celular fueron las más prevalentes en términos relativos, ya que se identificaron en una alta proporción de los serotipos y/o cepas analizadas (7 de las 20 proteínas en $\geq 50\%$ de los serotipos, 35%) seguida de las lipoproteínas (6 de las 42, es decir, 14%), proteínas secretadas (2 de 18, es decir 11%) y de las de membrana (menos del 1%). Esto indica que las proteínas con el motivo LPXTG de anclaje son normalmente las más expresadas y expuestas en la

superficie de las bacterias Gram-positivas, como ya ha sido descrito (Navarre et al., 1999).

Clasificación de las proteínas identificadas según su potencial como candidatos vacunales.

Las proteínas, para ser buenos candidatos vacunales, deben cumplir las siguientes características: estar expuestas en superficie y bien accesibles a los anticuerpos, expresarse en cantidad y en una amplia variedad de serotipos, para proporcionar una respuesta inmune efectiva e inducir una buena protección cruzada (Grandi et al., 2001).

La variabilidad genética dentro de una especie puede hacer que el patrón de expresión de una proteína sea diferente entre las cepas (de Greef et al., 2011; Zhang et al., 2011). De hecho, en otros trabajos con un número inferior de aislados encuentran similitudes inferiores al 10% en cepas de *Streptococcus* y *Staphylococcus* (Dreisbach et al., 2010; Olaya-Abril et al., 2012). Teniendo en cuenta el gran número de cepas estudiadas en el presente trabajo, era de esperar que no encontráramos ninguna proteína presente en todas las cepas analizadas. Sin embargo hemos podido identificar un gran número de proteínas comunes a la mayoría de los serotipos estudiados.

Las proteínas se clasificaron en función de la frecuencia de expresión en los distintos serotipos después de la digestión con tripsina. Se definieron tres grupos según su potencial para su posterior evaluación en estudios de inmunización y/o de vacunación: el grupo A (>70 % serotipos) , que consta de 7 proteínas; B (50-70 % serotipos), con 12 proteínas y C (30-50% serotipos), en el que se encuadran 15 proteínas (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Clasificación de las proteínas en función de la frecuencia de expresión en los distintos serotipos.

Categoría	Proteínas
A (7)^a	Pared celular: SSU1760, SSU0757, SSU0860 Lipoproteínas: SSU1390, SSU0115 Proteínas secretadas: SSU0465 Proteínas de membrana(1 TMD): SSU0309
B (12)	Pared celular: SSU1879, SSU0253, SSU1355, SSU1128 Lipoproteínas: SSU0656, SSU1078, SSU1664, SSU1933 Proteínas secretadas: SSU1127 Proteínas de membrana(1 TMD): SSU0496, SSU0020, SSU1103
C (15)	Pared celular: SSU1773, SSU0186, SSU0706, SSU1143, SSU1201, SSU1849 Lipoproteínas: SSU1560, SSU1093, SSU1915, SSU1869 Proteínas secretadas: SSU1968 Proteínas de membrana(1 TMD): SSU0141 Proteínas de membrana(>1 TMD): SSU0879, SSU0015, SSU1210

^a A: >70% serotipos analizados; B: 50-70% serotipos analizados; C: 30-50% serotipos analizados.

Consideramos que las proteínas que pertenecen a la categoría de proteínas de pared celular, secretadas y lipoproteínas están, en principio, bien expuestas en superficie, excepto aquellas regiones de las mismas que pueden estar embebidas dentro de la capa de peptidoglicanos (Navarre et al., 1999), que presenten un plegamiento muy compacto o bien estén escondidas debajo de la cápsula. Por otro lado, las proteínas de membrana se hallan a mayor profundidad y por lo tanto menos expuestas en la superficie, a menos que tengan dominios lo suficientemente grandes como para llegar a ella a través de la capa de peptidoglicanos. Esto hace que la proporción de proteínas de membrana identificadas mediante la técnica del *shaving*, en comparación con el total de proteínas de membrana predichas, sea mucho menor que para el resto de las categorías de las proteínas estudiadas (Doro et al., 2009; Rodríguez-Ortega et al., 2006). Las proteínas con sólo 1 TMD pueden tener dominios lo suficientemente grandes en el lado extracelular de la membrana, y

por lo tanto ser más propensas a ser identificadas por esta técnica que las proteínas multitransmembrana, ya que es menos probable que tengan bucles lo suficientemente grandes para alcanzar la superficie.

Basándonos en la representación topológica de las regiones identificadas experimentalmente de las proteínas de membrana (Figura 2.1) y de acuerdo con el criterio de la distribución que presentan en los distintos serotipos, también hemos incluido en la categoría A (Tabla 2.5) una proteína con 1 TMD (Ssu0309), 3 en la categoría B y 1 en la categoría C. Tanto la proteína SSU0020 (grupo B) como la proteína *exported protein*-SSU0141 no se incluyeron en la Figura 2.1, ya que se utilizó el algoritmo LocateP para la asignación de la localización subcelular, pero ninguno de los otros algoritmos de predicción utilizados (TMHMM, PSORT, LipoP, SignalP) encontraron regiones transmembrana para estas proteínas.

La proteína *exported protein*-SSU1950 (que se encuentra en el 42% de los serotipos analizados) no se incluyó en la categoría C porque su dominio expuesto era muy corto y, en principio, no sería accesible a los anticuerpos. En cuanto a las proteínas multitransmembrana, 3 fueron incluidas en la categoría C, ya que tienen dominios teóricamente grandes en la parte extracelular, en los cuales se identificaron algunos péptidos. Sin embargo, como en el caso de SSU1950, no incluimos la proteína *oligopeptide transport system permease protein OppB*-SSU1661, ya que el dominio extracelular para el que se identificó el único péptido de dicha proteína era demasiado corto.

Selección de los candidatos vacunales.

Para evaluar la utilidad del análisis del “pan-surfoma” en la selección de nuevos candidatos vacunales, se seleccionaron dos proteínas: a) un candidato de la categoría A (Tabla 2.5), la proteína de pared celular SSU1760, anotada como *surface-anchored DNA nuclease* (SsnA), que fue la proteína identificada en más serotipos (16 de 19, es decir 84%) y cepas analizadas (28 de 39, es decir, 72%) y b) Un candidato de la categoría B, la lipoproteína SSU1664, anotado como *oligopeptide-binding protein OppA precursor* (OppA), que fue identificada en 12 serotipos (63%) y 19 aislados clínicos (49%).

Las DNA nucleasas estreptocócicas son importantes exoenzimas y posibles factores de virulencia en *S. pyogenes* (Matsumoto et al., 2005). Estas digieren el ADN liberado de las células muertas, reducen la viscosidad del pus, y permite que el microorganismo tenga una mayor motilidad (Bisno et al., 2003). Fontaine y colaboradores (2004) señalaron que esta proteína puede ser secretada y está presente en los serotipos 1-10 de *S. suis*. Además, se ha sugerido que podría contribuir en la patogénesis de esta especie favoreciendo la evasión de la respuesta inmune innata (Sumby et al., 2005). Por otra parte, la OppA ha sido previamente propuesta como un potencial candidato vacunal, ya que muestra actividad inmunogénica (Geng et al., 2008).

Una vez seleccionadas las proteínas comunes, se definió un protocolo para determinar su utilidad como candidato vacunal basado en tres parámetros: presencia del gen que codifica las proteínas seleccionadas (PCR); localización en superficie y cuantificación de las mismas (citometría de flujo) y carácter inmunogénico (ELISAs).

Presencia del gen que codifica a las proteínas OppA y SsnA en los aislados clínicos.

La expresión de una proteína puede cambiar en función de las diferentes etapas del ciclo celular y también en respuesta a acciones externas, por ello, se amplificó por PCR, a partir del genoma de todos los aislados, los fragmentos de ambos genes, que están conservados entre todas las cepas secuenciadas disponibles de *S. suis*, aunque no las detectáramos por proteómica (tabla 2.6). Como se muestra en la figura 2.2, ambos genes fueron detectadas en todos los serotipos y cepas analizadas en este trabajo.

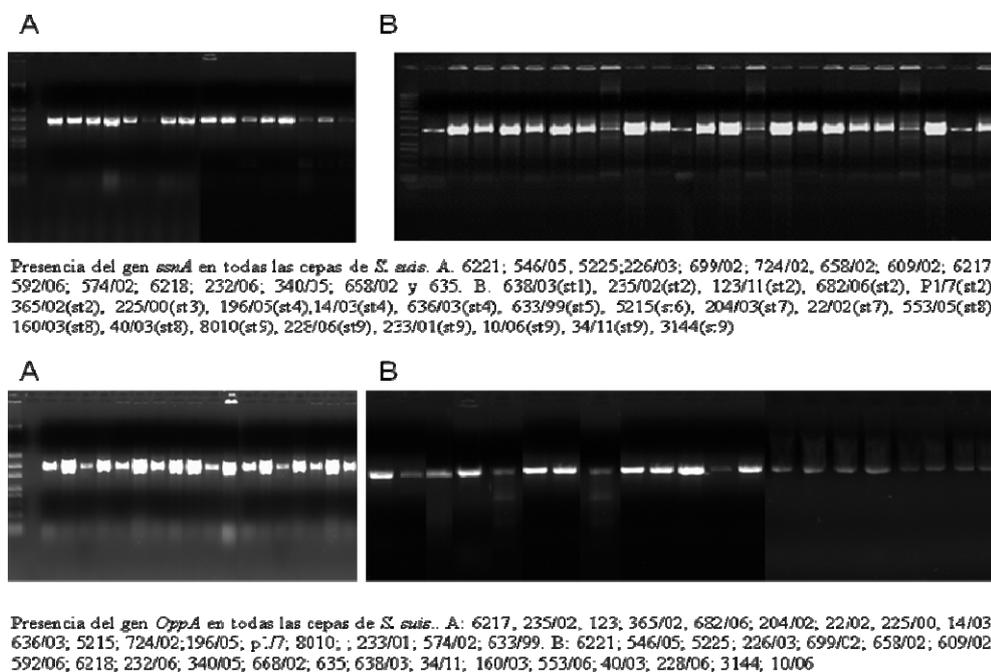


Figura 2.2. Resultados de la PCR de los genes que codifican la SsnA y OppA en todas las cepas analizadas

Inmunogenicidad de ambas proteínas en animales infectados experimentalmente.

Para probar la capacidad inmunógena de las proteínas, se determinaron los títulos de anticuerpos anti-SsnA y anti-OppA en los sueros de los ratones infectados experimentalmente, mediante un ensayo de ELISA tapizando las placas de microtitulación con los fragmentos recombinantes purificados de las proteínas. El título de IgG frente a la SsnA fue $> 1/100.000$, lo que indica que la SsnA parece ser una proteína fuertemente inmunógena. Sin embargo, el título de IgG frente OppA fue $1 > 200$, lo que indica que, a pesar de que muestra inmunogenicidad, es mucho menor que la mostrada por la SsnA.

Localización superficial de las proteínas y accesibilidad de los anticuerpos a los distintos serotipos.

Posteriormente, se estudió mediante citometría de flujo la capacidad de los anticuerpos presentes en los sueros hiperinmunes de unirse a las dos proteínas, con el fin de comprobar que estas proteínas verdaderamente se encuentran expuestas y que tienen un potencial como candidatos vacunales. Respecto a la SsnA, después de analizar los 39 aislados clínicos, los resultados no fueron homogéneos entre cepas, ni dentro de serotipos (Tabla 2.6 y Figura 2.3).

En 20 cepas, se observó una reacción positiva por citometría y además se identificó mediante proteómica. En este grupo se encuentran 4 de las 5 cepas del serotipo 2, en las que se identificó por proteómica la proteína SsnA y 3 de las 4 cepas del serotipo 9. Sin embargo, en 7 aislados, se observó una reacción positiva, y muy fuerte, aunque no fueron identificadas por proteómica (por ejemplo, cepa 6221, el serotipo 28).

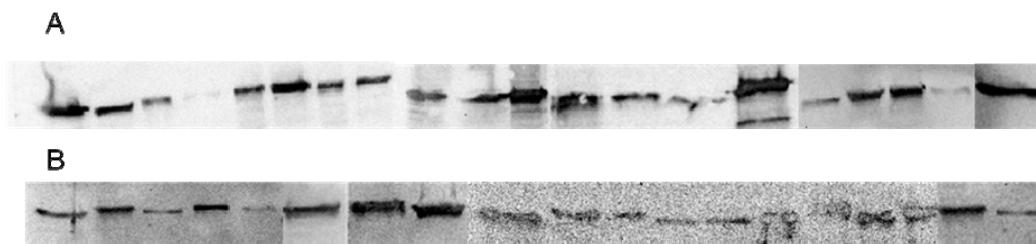
Por el contrario, se obtuvo una respuesta negativa por citometría de 8 aislamientos para los que SsnA había sido identificada por proteómica, incluso cuando se encontró un gran número de péptidos (por ejemplo, los dos aislamientos del serotipo 14). En 4 aislados, pertenecientes a diferentes serotipos (204/03 ss 7, 3144 ss 9, 5225 ss 15 y 574/02 ss 20), la proteína no fue identificada por proteómica ni por citometría. Por tanto, se puede considerar que la SsnA puede ser un buen candidato para vacunas, ya que es una proteína ampliamente distribuida entre cepas, identificada por proteómica en 16 de los 19 serotipos analizados, y accesible a los anticuerpos en 13 de los 19 serotipos (y 27 de los 39 aislados) estudiados en este trabajo.

Tabla 2.6. Identificación de las proteínas mediante citometría y proteómica en todas las cepas analizadas.

Referencia	Serotipo	Identificación Shaving SsnA	Identificación Citometría de flujo SsnA	Identificación Shaving OppA	Identificación Citometría de flujo OppA
638/03	1	-	3.0	-	
635	½	+	negativo	+	
658/02	1/14	+	2.2	+	
699/02		-	2.1	+	
P1/7		+	2.7	+	
365/02		+	2.4	+	
123	2	+	negativo	-	
682/06		+	11.6	+	Negativo
235/02		+	3.5	-	Negativo
225/00	3	+	14.2	+	Negativo
196/05		+	28.3	+	Negativo
636/03	4	+	49.0	+	
14/03		+	49.8	+	
633/99	5	+	negativo	+	
5215	6	+	4.0	-	Negativo
22/02	7	+	negativo	-	
204/03		-	negativo	+	
160/03		+	4.5	+	
40/03	8	+	3.1	-	7.7
553/05		-	3.1	-	
10/06	9	+	3.2	-	2.2
8010		+	70.0	-	
233/01		+	2.2	-	

3144		+	negativo	-	
34/11		-	negativo	-	
228/06		-	3.6	-	3.6
340/05	10	+	2.0	-	
546/05	14	+	negativo	+	2.7
232/06		+	negativo	-	
668/02		+	3.7	-	Negativo
609/02	15	-	5.3	-	
5225		-	negativo	-	Negativo
592/06		+	2.9	+	
724/02	16	+	7.3	-	
226/03		-	4.7	+	
574/02	20	-	negativo	-	
6217	24	+	negativo	-	
6218	25	+	9.0	+	2.0
6221	28	-	12.5	+	

En cuanto a la OppA, los resultados indicaron que su potencial para futuros estudios de vacunación era peor que la SsnA: se identificó en menos serotipos y aislados clínicos, y la citometría de flujo mostró que era menos accesible a los anticuerpos, dando una señal positiva sólo en 5 cepas. Se confirmó por *Western blot*, que la proteína se expresaba en todas las cepas (Fig. 2.4). La ausencia de reacción positiva por citometría de flujo en la gran mayoría de los aislados, unido a su relativamente pobre inmunogenicidad y menor identificación por la estrategia de *shaving*, hacen que esta proteína sea, a priori, un candidato menos interesante que la SsnA.



Western Blot frente OppA usando suero policlonal anti-rOppA: A: 5215, 22/02, 204/03, 40/03, 553/05, 160/03;8010, 233/01, 228/06, 3144, 10/06, 34/11, 340/05, 546/05, 323/06, 609/02, 668/02, 5215, 592/06.
B. 6217, 6218, 6221, 226/03, 724/02, 574/02, 658/02, 638/03, 235/02, P17, 682/06, 365/02, 123, 14/03, 196/05, 636/03, 699/02, 635, 633/99.

Figura 2.4. Western Blot frente a la OppA de todas las cepas analizadas.

CONCLUSIONES.

Se demuestra la utilidad del análisis del "pan-surfoma" para una rápida detección de proteínas de superficie ampliamente distribuidas en una colección de cepas de serotipos de *S. suis* clínicamente relevantes, la cual debe ser complementada por técnicas inmunoquímicas, como la citometría de flujo, que permiten revelar su capacidad inmunógena y por lo tanto su potencial como candidatos vacunales, solos o combinados para futuras formulaciones de vacunas.

Se han identificado 7 proteínas en más del setenta por ciento de los serotipos. Consideramos que tres de ellas, denominadas *cell envelope proteinase* (SSU0757), 5'-nucleotidase (SSU0860) y *surface-anchored DNA nuclease* o SsnA (SSU1760), podrían ser buenos candidatos vacunales, ya que han sido identificadas en más del 50% de los aislados clínicos analizados y son proteínas de pared celular.

La proteína SsnA se presenta como un interesante candidato vacunal, ya que parece estar muy conservada en los distintos serotipos de *S. suis*, está bien expuesta y accesible a los anticuerpos, siendo además muy inmunógena.

CAPÍTULO 5. ENSAYOS EXPERIMENTALES.
OBJETIVO 2

OBJETIVO 2: DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES Y VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LA VACUNA RECOMBINANTE WELLVAC-SUIS FRENTE A LAS INFECCIONES POR *S. suis* EN CERDOS.

JUSTIFICACION

En este trabajo, una vez seleccionada la proteína *surface-anchored DNA nuclease* con unas características que la hacen ser un buen candidato vacunal a priori, al estar presente en la mayoría de los serotipos clínicos analizados, con gran capacidad inmunógena y accesible a los anticuerpos, decidimos probar su capacidad protectora. Para ello, se deben realizar estudios de infección experimental, de forma que los resultados puedan ser correctamente analizados y extrapolables (Fittipaldi et al., 2012).

Para realizar estos trabajos, se debe seleccionar una cepa que pueda reproducir la enfermedad en condiciones experimentales. Además, es un hecho ampliamente aceptado que las vacunas recombinantes elaboradas con antígenos son menos inmunógenas, y es necesario utilizar diferentes adyuvantes para potenciar la respuesta inmune en el huésped (Baums y Valentin-Weigand, 2009; Singh y O'Hagan, 2003). Aunque se reconoce que los adyuvantes tienen un efecto protector en los preparados vacunales, son limitadas las publicaciones donde se comparen estos en distintos modelos animales y con distintas vías de administración (Baums y Valentin-Weigand, 2009) y, por lo que carecemos de información a la hora de seleccionar el mejor adyuvante para una vacuna frente a la infección por *S. suis*.

Por ello, como segundo objetivo de este trabajo nos propusimos realizar un estudio experimental para establecer un protocolo para evaluar nuevas

vacunas frente a la enfermedad, valorando la eficacia de una nueva vacuna recombinante *WELLVAC-SUIS*, elaborada con la proteína recombinante *r-Ssna* frente a las infecciones por *S. suis* en cerdos.

Para cumplir este objetivo general, nos marcamos los **objetivos específicos** que se enumeran a continuación.

2.1. Selección de una cepa de *S. suis* serotipo 2 con capacidad patógena para ratones en condiciones experimentales.

2.2. Evaluación de tres adyuvantes para su utilización en vacunas frente a *S. suis* en modelos murinos.

2.3. Selección de una cepa de *S. suis* serotipo 2 con capacidad patógena para cerdos en condiciones experimentales.

2.4. Valoración de la capacidad protectora *in vitro* e *in vivo* de la vacuna recombinante *Wellvac-suis*, frente a las infecciones por *S. suis* en cerdo.

Para el desarrollo de estos objetivos se llevaron a cabo cuatro ensayos experimentales, que presentaron una metodología similar en algunos aspectos, por lo que se desarrolla a continuación el material y los métodos genéricos utilizados, y de forma concreta se describirán los diseños experimentales en cada uno de los objetivos, así como los resultados obtenidos y la discusión con otros estudios publicados.

MATERIAL Y MÉTODOS GENÉRICO

Cepas utilizadas. Preparación del inóculo.

En este trabajo hemos utilizado dos cepas de *S. suis* serotipo 2, que previamente habíamos aislado de animales enfermos y pertenecen al cepario

del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba, con el objetivo de seleccionar una que permitiera reproducir la enfermedad o la muerte de ratones y cerdos en condiciones experimentales, y que pueda ser utilizada para la valoración de las nuevas vacunas recombinantes. La referencia de las cepas utilizadas y la concentración final del inóculo utilizado para la infección experimental se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1: Cepas de *S. suis* serotipo 2 seleccionadas para el estudio.

Referencia	Características	RATONAS		CERDOS	
		Ensayo 1 (DO)	Ensayo 2 (DO)	Ensayo 3 (DO)	Ensayo 4 (DO)
235/02	mrp+ef+sly+	3x10 ⁹ (0,4)	5x10 ⁸ (0,4)	1x10 ⁹ (0,4)	1x10 ⁸ (0,28)
123/11	mpr-ef-sly-	5x10 ⁹ (0,4)	-	1x10 ⁹ (0,4)	-

* *unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL). Todos los animales se infectaron con 1 mL del inóculo, preparado en Caldo Todd-Hewitt por vía intraperitoneal (ratonas) o intravenosa (cerdos).*

En todos los casos, se siguió la misma metodología para la recuperación de las cepas y preparación del inóculo, cuya concentración final se muestra en la tabla anterior. Las bacterias, mantenidas a -80 °C, se sembraron en placas de agar Columbia suplementadas con un 6% (v/v) de sangre desfibrinada de oveja (CNA) y se cultivaron en caldo de Todd-Hewitt (THB) a 37 °C y un cinco por ciento de CO₂. El inóculo de cada ensayo consistió en una suspensión bacteriana (1mL) que contenía las bacterias en la fase exponencial del crecimiento, ajustando la turbidez hasta conseguir la concentración deseada, midiendo la Densidad Óptica en un espectrofotómetro (ZUZI 411-OED). La concentración del inóculo se comprobó posteriormente, sembrando diluciones seriadas del cultivo en placas de CNA y realizando el recuento de colonias tras 18 horas de incubación.

Análisis laboratorial.

Estudio histopatológico.

Después del sacrificio o muerte de los animales, se realizó la necropsia y se tomaron muestras de los siguientes órganos: cerebro, pulmón, hígado, riñón y bazo. Estas muestras se fijaron en formol tamponado al 10% y una vez embebidas en parafina, se realizaron secciones de 4 micras y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), de acuerdo a protocolos estándar. Posteriormente, se analizaron al microscopio óptico, para evaluar la distribución e intensidad de las lesiones observadas en estos órganos.

Recuento de las bacterias viables en sangre y órganos.

Durante las necropsias, se extrajeron los siguientes órganos: cerebro, pulmón, hígado, riñón y bazo. La sangre se extrajo por punción cardiaca (ratones) o de la vena marginal de la oreja (cerdos). Para los recuentos, se siguió el protocolo descrito por Dominguez-Punaro y colaboradores (2007). De forma resumida se puede indicar que se tomaron 0.05g/órgano y se añadieron a 500 µl de PBS, homogeneizando la mezcla en un vórtex. Posteriormente, se sembraron 50 µl de las diferentes diluciones y 50 µl de sangre directa en placas de CNA y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Finalmente, se contaron las colonias y se expresaron como ufc/0,05g para las muestras de órganos o ufc/mL para las muestras de sangre.

Valoración de anticuerpos en suero frente a la proteína r-Ssna y S. suis.

En el momento del sacrificio o en los puntos seleccionados, se extrajo la sangre como se ha indicado anteriormente en tubos vacutainer sin anticoagulante y se centrifugaron a $1500 \times g$ durante 10 minutos para obtener el suero, que fue conservado a -20 °C hasta su uso. Se midieron los títulos de

anticuerpos específicos frente a la SsnA y frente a *S. suis* serotipo 2 en los sueros de los animales, utilizando un ELISA indirecto de elaboración propia en el laboratorio.

Las placas de microtitulación se tapizaron con 0,5 µg/mL de proteína recombinante SsnA o 200 µg/mL de extracto de proteína total de la cepa 235/02 en tampón de recubrimiento (NaHCO₃ 0,05 M, pH 9,6), incubando a 4 °C durante toda la noche. Después, cada placa se lavó tres veces con PBS adicionado de 0,05% de Tween-20 y se bloquearon con 100 µl de BSA al 2% durante 1 hora a 37 °C. Se lavaron con la solución anterior tres veces. A continuación, se añadieron los sueros problema y se hicieron diluciones seriadas, incubando durante 40 min a 37 °C. Posteriormente, se añadió IgG anti-ratón o anti-cerdo, conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma-Aldrich) diluido 1:5000 en tampón de lavado, y las placas se incubaron durante 40 min a 37 °C. A continuación, se lavaron tres veces y se reveló la reacción añadiendo 100 µL de la solución sustrato activado (sustrato TMB, Sigma-Aldrich), incubando en oscuridad durante 20 min. La reacción se detuvo con 100 µL de solución de parada (Sigma-Aldrich) Finalmente, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de ELISA (Bio-Rad).

Análisis estadístico.

Para comprobar la normalidad de las variables de estudio se realizó el Test de K-S (Kolmogorov-Smirnov) de bondad de ajuste y para comprobar si las varianzas poblacionales entre los grupos eran iguales o no, se empleó el estadístico de Levene. Las diferencias en las puntuaciones clínicas y los recuentos bacterianos medios entre todos los grupos de animales, así como las diferencias en el título de anticuerpos y supervivencia de la bacteria en los ensayos de opsonofagocitosis, se realizaron mediante la prueba Student's *t*-test.

Para aquellas variables que no siguieron una distribución normal se usaron los estadísticos de Kruskal-Wallis y la prueba de Mann-Whitney. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS v.12.0 para Windows. La significación estadística se definió en $p < 0,05$. El estudio de los estimadores de riesgo (objetivo 2.2) se realizó utilizando el programa Winepiscopes para Window 2.0. (<http://www.winepi.net/>).

Normas de bioética.

Para la manipulación y sacrificio de los animales se siguieron en todo momento las normas establecidas en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de la Unión Europea para el manejo de animales de laboratorio y fueron aprobadas por el Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba (Autorización. Nº 5177). La experiencia realizada con cerdos para demostrar la eficacia de la vacuna Wellvac-suis se llevó a cabo en el DTU National Veterinary Institute de Lindholm (Dinamarca), y obtuvimos la autorización del *Danish Animal Experiments Inspectorate*.

OBJETIVO 2.1. SELECCIÓN DE UNA CEPA DE *S. SUI*S SEROTIPO 2 CON CAPACIDAD PATÓGENA PARA RATONES EN CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Según Zúñiga (2001) el animal de laboratorio es “cualquier especie animal que se mantiene bajo condiciones determinadas y se utiliza con fines científicos”. Estos animales representan un elemento imprescindible para el desarrollo de nuevos tratamientos y prevención de enfermedades que afectan a los animales y al hombre. Los modelos murinos se han utilizado desde hace

décadas para el estudio de las infecciones por *S. suis*, ya que el ratón es la especie que mejor reproduce la enfermedad de los cerdos (Robertson y Blackmore, 1990; Kataoka et al., 1991).

MATERIAL Y MÉTODOS

Inmunización e infección de los animales.

El estudio se llevó a cabo en unas instalaciones acondicionadas en el edificio de Sanidad Animal, con ciclos de luz/oscuridad de 12h luz/12h oscuridad, Este trabajo se desarrolló con nueve ratones hembras de 7 semanas de edad, libres de patógenos específicos de la línea CD-1 (Charles River Laboratories, Francia), que se alojaron aleatoriamente en tres jaulas con acceso libre al pienso y agua. Se establecieron tres grupos con tres animales cada uno, dos grupos se infectaron con *S. suis* y el tercer grupo se mantuvo como control y se le administró por vía intraperitoneal 1mL de PBS. El sacrificio de los animales con signos graves de enfermedad se realizó por dislocación cervical.

Se utilizaron dos cepas de *S. suis* serotipo 2 (Tabla 1), aisladas en España de animales enfermos, con la finalidad de seleccionar una con capacidad de provocar la muerte en ratones a las 7 semanas de vida. Todos los animales fueron infectados intraperitonealmente con 1 mL de una suspensión bacteriana en THB, preparada como se indicó anteriormente. En este primer ensayo sólo se valoró la mortalidad de los animales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mortalidad de los animales

Como se puede observar (Tabla 2), las dos cepas utilizadas provocaron la muerte de los animales en menos de cuarenta y ocho horas con signos de septicemia (erizamiento del pelo, depresión, ojos hinchados), por lo tanto, ambas cepas podrían ser utilizadas para valorar la eficacia de nuevas vacunas en modelos murinos.

Tabla 2: Cepas de *S. suis* seleccionadas para el estudio.

Ref.	Características	Ratonas CD1 (7 semanas)	
		(Inoculo ip 1mL)	Muerte
235/02	cps2mnp+ef+sly+	3×10^9	3/3 (<30h)
123/11	cps2mnp-ef-sly-	5×10^9	3/3 (<40h)

Para los análisis posteriores, dados los buenos resultados obtenidos en este trabajo, así como los publicados en estudios previos (Garidibaldi et al., 2010; Mandanici et al 2010), se seleccionó la cepa 235/02.

OBJETIVO 2.2. EVALUACIÓN DE TRES ADYUVANTES PARA SU UTILIZACIÓN EN VACUNAS FRENTE A *S. suis* EN MODELOS MURINOS.

Hasta la fecha, se han puesto de manifiesto diferencias en el efecto protector de los adyuvantes para distintas enfermedades de los cerdos, pero no existen trabajos en el caso de infecciones por *S. suis*. En este trabajo nos propusimos determinar el efecto protector de tres adyuvantes ampliamente utilizados en modelos murinos (Baums y Valentin-Weigand 2009).

MATERIAL Y MÉTODOS

Inmunización e infección de los animales.

Utilizamos cuarenta ratones hembras de 4 semanas de edad, CD1 (Charles River Laboratories, Francia), que se dividieron en cinco grupos de

ocho animales aleatoriamente, que se mantuvieron en las mismas instalaciones y condiciones que en el experimento anterior.

Tras un periodo de aclimatación de una semana, los ratones del grupo 1 fueron inyectados por vía intraperitoneal con 100 μ L de PBS mezclado con el mismo volumen de hidróxido de aluminio (ALOH). Los animales del grupo 2, con adyuvante incompleto de Freund (FIA) en PBS (1:1), los del grupo 3 con aceite-en-agua (OW) en PBS (1:1) y los animales del grupo 4 y 5 (control) se inyectaron sólo con PBS (mismo volumen). Pasadas dos semanas, a los animales se les administro una segunda dosis de cada adyuvante (grupos 1-3) o de PBS (grupos 4-5), respectivamente. Una semana después de la segunda inyección, los animales de los grupos 1-4 fueron infectados por vía intraperitoneal *S. suis* serotipo 2 (5×10^8 ufc/mL, Tabla 1). El grupo 5 fue inoculado con PBS dejándose como grupo control.

Evaluación de los parámetros clínicos de la enfermedad y mortalidad.

Después del desafío, todos los animales se examinaron cada 8 h hasta el final del experimento (siete días). Se valoró el estado sanitario, dándole a cada animal una puntuación (Tabla 3) en función de los signos clínicos de septicemia, de moderados a graves, alteración del sistema nervioso central (SNC) y/o síndrome vestibular y/o muerte; como se muestra en la siguiente tabla. La puntuación total de cada animal se obtuvo sumando las puntuaciones de cada bloque. Al tercer día pi, se sacrificaron tres animales de cada grupo para determinar las posibles diferencias en la cinética bacteriana o la respuesta inmune frente a la infección.

Tabla 3: Valoración clínica tras la infección por *S. suis*.

Signos clínicos	Puntuación
Septicemia	0 Normal
	S1 Pelo erizado Leve/moderado hinchazón de los ojos. Depresión
	S2 Fuerte erizamiento del pelo. Severa hinchazón ojos. Apatía. Falta de acicalamiento
SNC	0 Normal
	N1 Hiperexcitación. Moderada inclinación/temblor de cabeza
	N2 Hiperexcitación. Severa inclinación de cabeza. Anda en círculos.
Muerte	D5 Muerte

S1/S2: signos de septicemia leves / graves; N1/N2: afección del SNC leve / grave, D5: muerte

Análisis laboratorial y estudio estadístico.

El estudio histopatológico, recuento de bacterias en sangre y órganos, así como la valoración de la respuesta inmune frente a la infección y el estudio estadístico se realizaron según la metodología anteriormente indicada en el apartado de material y métodos generales de este objetivo.

Asimismo, en este estudio se cuantificaron los niveles de INF- γ y la IL-17A mediante dos ELISAs comerciales tipo sandwich (mouse IFN-gamma ELISA Ready-Set-Go! y mouse IL-17A ELISA Ready-Set-Go!, EBioscience), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de la estirpe de ratón y de los adyuvantes.

En este trabajo, hemos evaluado el efecto protector de tres adyuvantes ampliamente utilizados en formulaciones de vacunas frente a la infección por *S. suis* en el modelo murino. La selección de la línea CD1 obedeció a las recomendaciones de otros investigadores (Domínguez-Punaro et al., 2007; Kataoka et al 1991). Se ha utilizado en todos los experimentos como vía de

infección la intraperitoneal (Domínguez-Punaro et al., 2007; Nakayama et al., 2011), aunque la vía intranasal podría ser más interesante, ya que es la forma natural de entrada del patógeno en los cerdos. No obstante, Seitz y colaboradores (2012) no pudieron reproducir la enfermedad usando ésta vía en modelos murinos.

Hemos seleccionado estos adyuvantes debido a que son ampliamente utilizados en formulaciones de vacunas contra diferentes enfermedades humanas y animales (Aucouturier et al., 2001; Coffman, et al., 2010; Hogenesch, 2012; Lu et al., 2008). Además, son los más utilizados en las infecciones experimentales frente a *S. suis* en el modelo murino (Baums y Valentin-Weigand 2009).

Evaluación de los parámetros clínicos de la enfermedad y mortalidad.

La siguiente tabla (Tabla 4) muestra los signos clínicos y mortalidad observados en cada grupo, con las puntuaciones que se asignaron. Todos los animales del grupo control murieron durante las primeras 12-72 horas postinfección, que fueron los resultados esperados. No obstante, las tasas de mortalidad de los animales que habían sido tratados con cualquiera de los adyuvantes utilizados, fueron significativamente más bajas ($p= 0,000$). Dos animales del grupo OW y un animal del grupo FIA murieron durante los tres primeros días, mientras que todos los del grupo ALOH sobrevivieron. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los grupos tratados.

Tabla 4. Resultados de la valoración clínica y mortalidad de los ratones infectados con *S. suis* durante la experiencia.

Grupos*	Puntuación**	Días post-infección							
		<24h [†]	1	2	3	4 ²	5	6	7

AIOH	S1	4	6	8	-	-	-	-	-
	S2	4	2	-	-	-	-	-	-
	N1	-	-	-	-	-	-	-	1
	N2	-	-	-	-	-	-	-	-
	D5	-	-	-	-	-	-	-	-
FIA	S1	4	6	6	2	-	-	-	-
	S2	4	1	-	-	-	-	-	-
	N1	-	-	-	-	-	2	1	1
	N2	-	-	-	-	-	-	1	1
	D5	-	-	1	-	-	-	-	-
OW	S1	-	2	3	2	-	-	1	-
	S2	7	5	3	2 ^{&}	-	-	1	-
	N1	-	-	-	-	-	-	-	1
	N2	-	-	-	2	-	-	-	1
	D5	1	-	1	-	-	-	-	-
PBS	S1	-	-	-	-	-	-	-	-
	S2	2	-	-	-	-	-	-	-
	N1	-	-	-	-	-	-	-	-
	N2	-	-	-	-	-	-	-	-
	D5	6	1	1	-	-	-	-	-

* Al 3 dpi, se sacrificaron tres animales de cada grupo. Al 7 dpi, se sacrificaron todos los animales supervivientes. ** S1/S2: signos de septicemia leves/graves; N1/N2: signos de afección SNC leve/grave, D5: la muerte.¹Ocho animales en cada grupo, ² Cinco animales en el grupo ALOH, cuatro en el FIA y tres en el OW, respectivamente. [&]3 dpi, dos animales mostraron signos nerviosos y septicemia simultáneamente.

Los signos relacionados con un proceso septicémico representaron la clínica más llamativa y predominante durante los primeros tres días (Tabla 4), observándose una recuperación gradual en las primeras 72 horas en los animales tratados, lo que demostró un efecto protector de los adyuvantes. Para comparar dicho efecto entre grupos, se calculó la media de las puntuaciones clínicas anotadas durante los 3 primeros días postinfección. Comprobamos que existían diferencias significativas entre los grupos tratados con adyuvante en comparación con el grupo control ($p=0,000$ a $0,003$). Además, se obtuvieron diferencias entre los grupos ALOH y OW ($p = 0,003$). Estos datos sugieren que los tres adyuvantes utilizados en este estudio protegieron a los ratones de la muerte tras la infección con *S. suis*. La fracción protegida debido a la

utilización de $\text{Al}(\text{OH})_3$ fue del 87,53%, mientras que la del FIA y OW fueron de 83,47% y 80,49%, respectivamente.

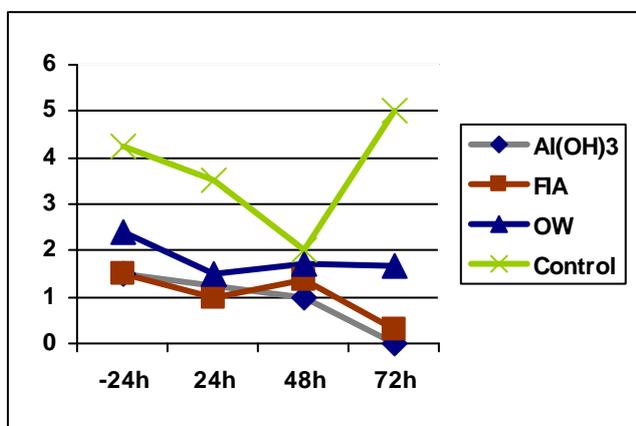


Figura 1: Diferencias en las puntuaciones clínicas entre grupos durante 3 dpi.

Los signos clínicos derivados de una alteración del SNC aparecieron después de los 3 días postinfección en tres animales pertenecientes al grupo FIA, en dos animales del grupo OW y en uno del grupo ALOH. El resto de los animales se mantuvieron aparentemente sanos hasta el final del experimento. No se observaron diferencias significativas entre grupos en cuanto a clínica nerviosa.



Figura 2. Detalle de los signos nerviosos y septicémicos observados

En el análisis histopatológico se comprobó que los animales muertos de durante las primeras 72 horas pi mostraban lesiones compatibles con un proceso de septicemia bacteriana (Domínguez-Punaro et al., 2007; Nakayama et al., 2011) y una depleción linfoide severa (Figura 1A), lo que puede explicar la rápida progresión hacia la muerte.

Las principales diferencias observadas entre los grupos de animales tratados previamente con los adyuvantes estuvieron relacionadas precisamente con esta severa depleción linfoide, acompañada de fenómenos de apoptosis y necrosis de los linfocitos (Tabla 5), que se observaron en 3 (37,5%) de los animales del grupo FIA y en 7 (87,5%) del grupo OW, no detectándose estas lesiones en ninguno animal del grupo AIOH.

Tabla 5: Lesiones observadas en los animales tras la infección con *S. suis* 2

Lesión	Control	ALOH	FIA	OW
Presencia de bacterias en el lumen	5/7*	1 ^a /8	1*/8	2*/8
Edema alveolar	5/7*	2/8	0/8	3/8
Tromboembolismo	2/7*	0/8	1*/8	0/8
Hemorragias	4/7*	4/8	4/8	3/8
Perihepatitis	0/7*	1 ^a /8	2/8	3/8
Hepatitis	3/7*	8/8	7/8	5/8
Neumonía intersticial	3/7*	5/8	5/8	5/8
Nefritis intersticial	1/7*	0/8	1/8	3/8
Meningoencefalitis purulenta	0/7*	1 ^a /8	0/8	0/8
Necrosis Focal en hígado	2/7*	8/8	3/8	3/8
Necrosis Focal en SNC	1/7*	0/8	0/8	0/8
Depleción linfoide	6/7*	0/8	3 (1*)/8	7 (2*)/8

*Animales muertos 24-48 h pi (sólo se analizaron 7 animales del grupo control).

^aCaracterísticas histopatológicas observadas en el mismo animal, sacrificado 7 dpi.

Los animales que sobrevivieron a los tres primeros días presentaron infiltrados inflamatorios en diferentes órganos, principalmente en el hígado, aunque algunas de estas lesiones, como la perihepatitis estaban relacionados con la administración intraperitoneal del adyuvante. En un animal del grupo

AIOH, sacrificado el día 7 pi, que presentaba signos nerviosos de hiperexcitación e inclinación de cabeza se observó una meningoencefalitis purulenta, así como la existencia de bacterias en el lumen de los vasos sanguíneos, edema alveolar y perihepatitis (Fig. 3).

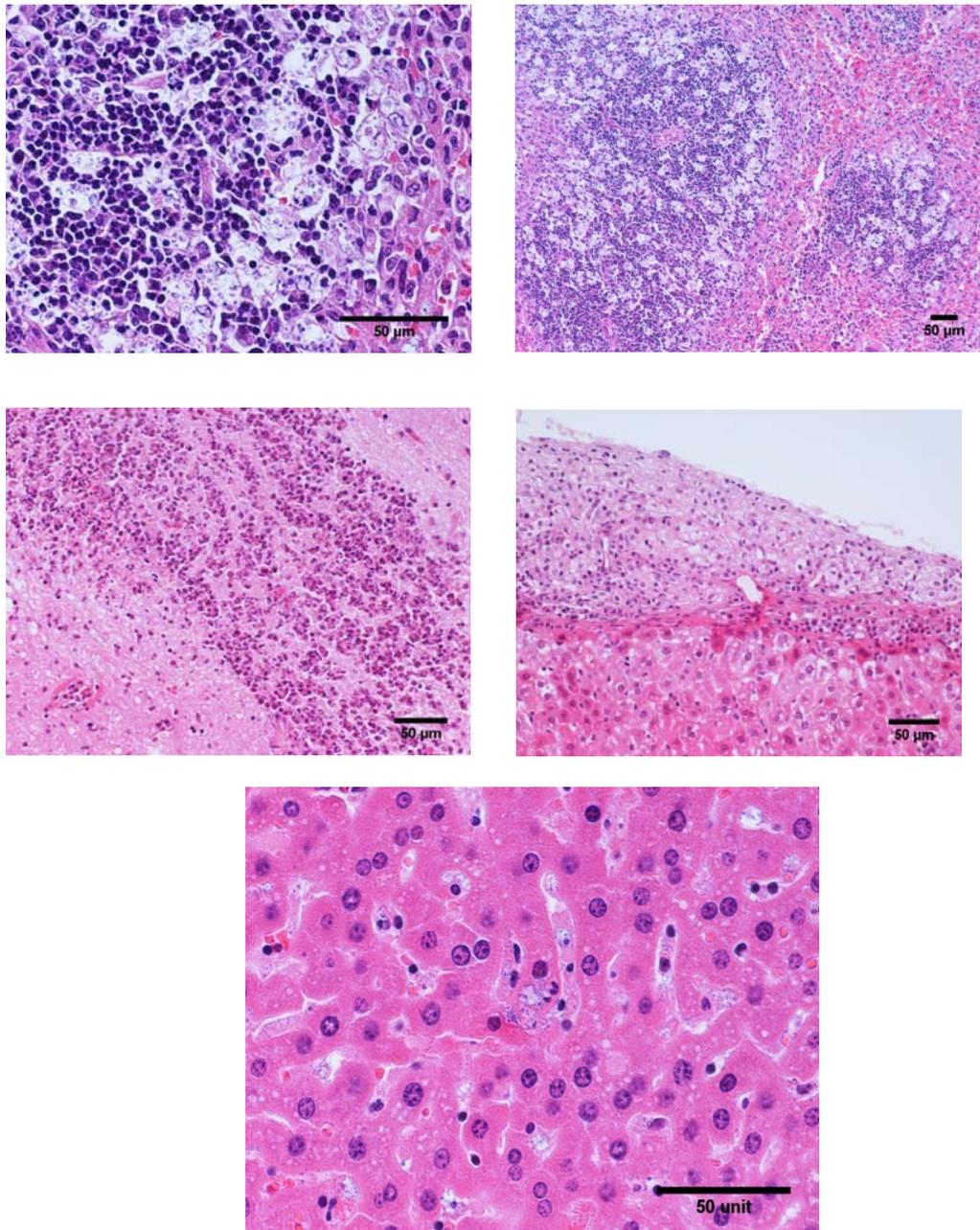


Figura 3: Hallazgos histopatológicos de bazo, hígado y cerebro de los ratones CD1 después de la infección con *S suis* serotipo 2. De arriba abajo y de izquierda a derecha; 1 y 2) Bazo, depleción linfoide severa con apoptosis y necrosis de los linfocitos, 3) Hígado, perihepatitis multifocal crónica, 4) Hígado, apoptosis y necrosis de hepatocitos, con PMNs y MNs (células inflamatorias) en los espacios de Disse y en los vasos sanguíneos. 5) Cerebro, meningoencefalitis purulenta.

Recuentos de bacterias viables en órganos y sangre.

Uno de los parámetros utilizados para evaluar las posibles diferencias en la patogénesis y la eficacia de la vacuna es la difusión de la bacteria en los tejidos (Garibaldi et al., 2010; Domínguez-Punaro et al., 2012). Con el objetivo de determinar si la administración de los adyuvantes reduce el mantenimiento de las bacterias en sangre y tejidos, se realizaron los recuentos bacterianos de de sangre (Fig. 4), cerebro, hígado, bazo, pulmón y riñón (Fig. 5), de los animales que sobrevivieron a los 3 primeros días pi. En general, se obtuvieron los recuentos más altos a partir de la sangre y órganos de los animales muertos en los tres primeros días, sin diferencias entre grupos (datos no mostrados).

En nuestro estudio, los recuentos bacterianos medios en sangre en animales muertos fueron altos, mientras que en los supervivientes se obtuvieron recuentos más bajos (10^2 - 10^3 ufc/mL) (Figura 4). Algunos estudios previos sobre la cinética bacteriana en el modelo ratón han mostrado que *S. suis* persiste en la sangre durante más de 7 días (Dominguez-Punaro et al., 2007; Nakayama et al., 2011). En este trabajo, se obtuvo una reducción

importante del número de bacterias en el día 7 pi en los grupos ALOH y FIA (0-75 ufc/mL), pero no en el grupo OW, que tuvo un ligero ascenso.

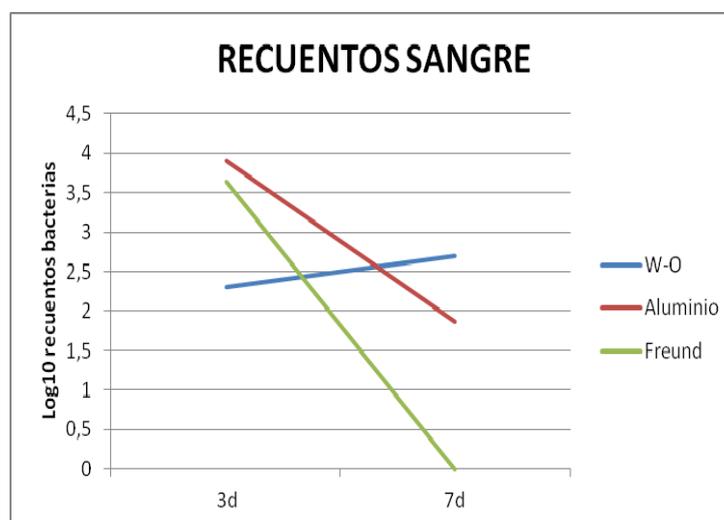


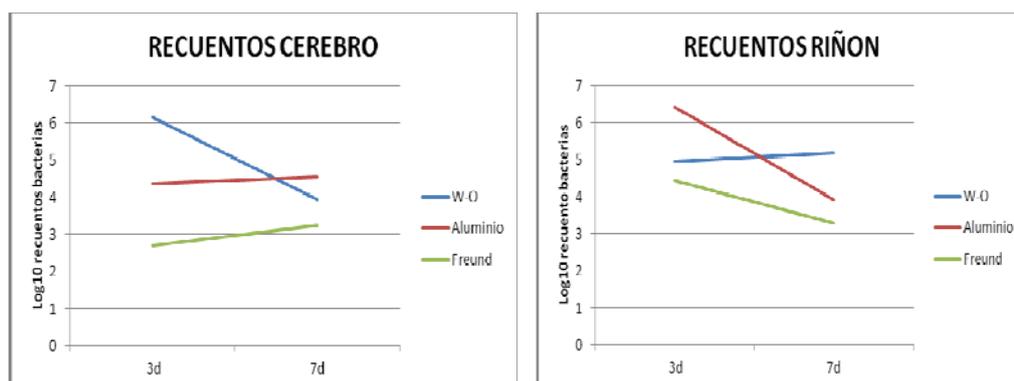
Figura 4: Recuentos bacterianos en sangre. Representado de forma logarítmica en base 10.

Analizando la cinética de la bacteria en el resto de los órganos, y al igual que ocurrió con los recuentos en sangre, se obtuvieron los valores más altos en los tres primeros días. Los recuentos medios el día 3 pi fueron de 10^4 - 10^6 ufc/0.05g en todos los órganos, excepto en el grupo FIA, en el que los recuentos en el cerebro fueron inferiores (5×10^2 cfu/0.05g).

Al séptimo día, se observó también una reducción drástica en los recuentos bacterianos de hígado, bazo y pulmón de los animales supervivientes, sin diferencias entre los grupos ($<10^3$ ufc/mL o 0,05 g). Estos datos coinciden con los obtenidos por otros autores (Garibaldi et al., 2010; Nakayama et al., 2011), que muestran una disminución de los recuentos en todos los órganos hasta el día 7. En cambio, los recuentos obtenidos en riñón y cerebro mostraron un comportamiento diferente, como se observa en la figura

5. En el cerebro se observó un leve incremento en los recuentos desde el día 3 al 7 pi en los grupos FIA o ALOH, aunque se mantuvo a unos niveles semejantes a los del grupo OW. Estos resultados fueron para nosotros inesperados si los relacionamos con la clínica y lesiones observadas en este órgano. Posiblemente, si los animales se hubieran mantenido durante más tiempo, habrían desarrollado una sintomatología nerviosa más evidente, y se habrían detectado las lesiones, sobre todo teniendo en cuenta que a los 7 días, la bacteria no había desaparecido de la sangre en los grupos OW o ALOH.

En nuestro trabajo, no hemos observado la desaparición de la bacteria de órganos en el día 7 postinfección, como se ha descrito en otros estudios, que señalan que *S. suis* desaparece de todos los órganos, excepto en el riñón donde se mantienen hasta los 12 días (Garibaldi et al., 2010; Nakayama et al., 2011). En nuestro trabajo, en los animales tratados con FIA y ALOH, los recuentos en el riñón disminuyeron, pero en los animales tratados con OW no se observó este descenso (10^7 ufc/0,05g). De acuerdo con nuestros resultados, aunque los adyuvantes tengan un efecto protector frente a la muerte, en ningún caso evitaron la diseminación de la bacteria por el organismo.



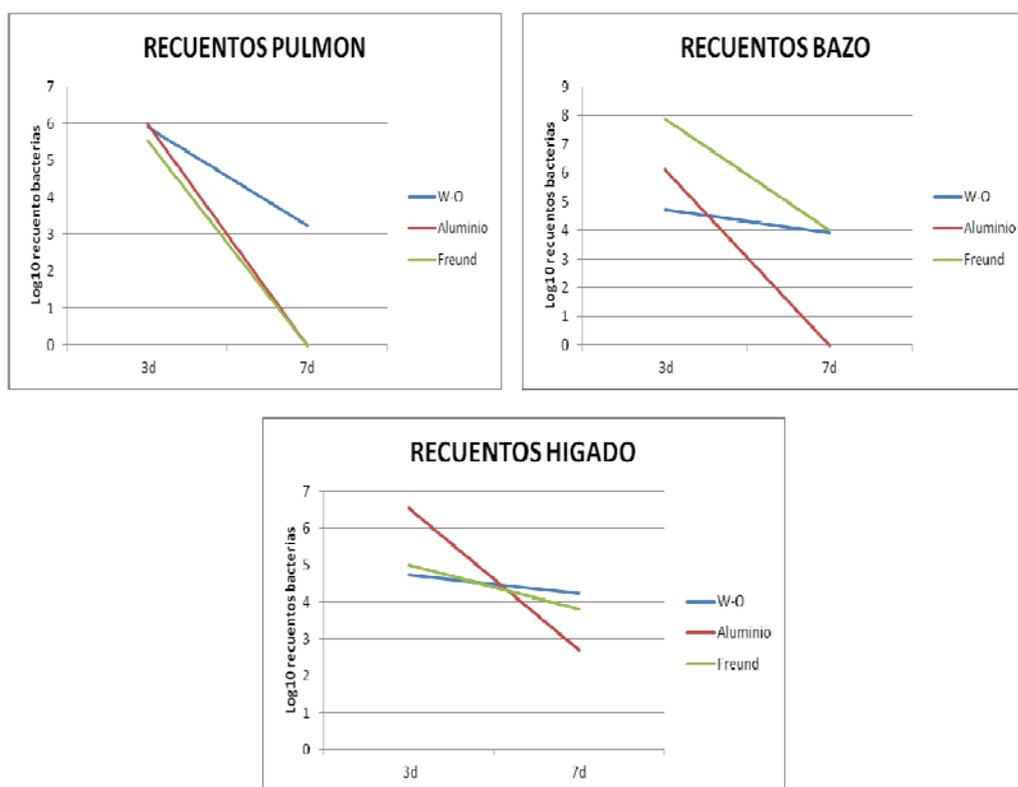


Figura 5: Recuentos bacterianos en todos los grupos en las diferentes localizaciones.

Estudio de la respuesta inmune.

Por último, se analizaron los títulos de anticuerpos en el suero de los animales supervivientes a los 3 y 7 días pi frente a la infección para determinar si existía una respuesta inmune específica, valorando las posibles diferencias entre grupos (Tabla 6). Como era de esperar, los títulos de anticuerpos a los tres días eran bajos en los tres grupos, aumentaron a los 7 días en los grupos FIA y OW, pero no en el ALOH, donde se mantuvieron constantes. El grupo que presentó los mayores títulos fue el OW, aunque también fue el que mantuvo los recuentos en sangre más elevados (Fig. 4), por lo que no podemos asegurar que el responsable de esta mayor tasa de anticuerpos fuera el

adyuvante o la propia bacteria. No obstante, en otros trabajos se ha comprobado que el OW es capaz de inducir una producción de anticuerpos más alta y rápida que otros adyuvantes como el hidróxido de aluminio en cerdos (Wisselink et al., 2001), resultados que coinciden con los obtenidos en nuestro trabajo.

Tabla 6. Títulos de anticuerpos frente a *S. suis* en el suero de los animales a los 3 y 7 dpi.

Grupo	Días post-infección	
	3	7
ALOH	1/1280	1/1280
	1/160	1/1280
	1/80	-
FIA	1/80	1/1280
	1/80	1/10400
	-	1/1280
OW	1/1280	1/10400
	1/1280	1/20800

Además del título de anticuerpos específicos frente a la infección, se midieron los niveles de dos citoquinas INF- γ e IL-17, que según los trabajos consultados pueden intervenir en la respuesta inmune frente a este microorganismo en los primeros días tras la infección. El INF- γ es una citoquina secretada por las células Th1, que atrae a los leucocitos al sitio de infección, y puede ser responsable del desarrollo del shock séptico y la meningitis cuando se expresa en grandes cantidades (Dominguez-Punaro et al., 2007; Fittipaldi et al., 2011). También es un importante regulador de la respuesta Th2, y estimula la fagocitosis de las bacterias por parte de los macrófagos. La interleuquina 17 tiene un papel protector, ya que atraen a los monocitos y a los neutrófilos al sitio de la infección, como se ha demostrado para otras bacterias extracelulares, como *Bordetella pertussis*, e intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*. Se ha sugerido que las células Th17 son

críticas para inducir una buena respuesta inmune de memoria (Lu et al 2008; Hogenesch 2012).

En este trabajo, medimos la producción de INF- γ e IL-17 en los sueros de los animales a los 3 y 7 días después de la infección para detectar posibles cambios en la expresión de estas citoquinas. La expresión de INF- γ no se evidenció en ningún animal, pero no podemos asegurar que no se hubiera expresado antes de los tres días (Dominguez-Punaro et al., 20097). La IL-17 no se detectó tampoco en ningún animal, resultados que difieren de los obtenidos por Hogenesch y colaboradores (2011) en *Streptococcus pneumoniae*, posiblemente debido a la metodología empleada o que la IL-17 no tiene un mecanismo de acción similar en las infecciones por *S. suis*.

CONCLUSIONES

Se propone un nuevo protocolo en base la clínica y lesiones, recuentos bacterianos y respuesta inmune específica para evaluar la capacidad protectora de las nuevas vacunas y tratamientos frente la infección por *S. suis* serotipo 2 en modelos murinos.

El hidróxido de aluminio se presenta como una opción interesante para su uso como adyuvante en vacunas frente a las infecciones por *S. suis*. Sin embargo, son necesarios más estudios para evaluar la combinación de éste con otros adyuvantes que estimulen una mejor respuesta inmune humoral y su uso para los cerdos y el hombre.

OBJETIVO 2.3. SELECCIÓN DE UNA CEPA DE *S. SUIIS* SEROTIPO 2 CON CAPACIDAD PATÓGENA PARA CERDOS EN CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Los modelos de experimentación con ratones pueden orientarnos en el conocimiento de ciertos aspectos relacionados con el desarrollo de la infección por *S. suis*, y de hecho ha sido el modelo más utilizado hasta la fecha, no obstante estos estudios deben completarse en el cerdo, especie donde se desarrolla la enfermedad en condiciones naturales (Vecht et al., 1991; Liu et al., 2011; Lin et al., 2013; Wang et al., 2013). En este trabajo nos propusimos determinar la acción patógena de dos cepas, que pudieran ser utilizadas en los ensayos para valorar nuevas vacunas frente a la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para cumplir este objetivo, se utilizaron las dos cepas de *S. suis* pertenecientes al serotipo 2 (235/02 y 123/11 que previamente habíamos seleccionado para el modelo murino (Tabla 1). Las condiciones de cultivo y preparación del inóculo se realizaron según la metodología previamente indicada. El inóculo consistió en una suspensión bacteriana (1mL) que contenía 1×10^9 ufc/mL, de bacterias en la fase exponencial del crecimiento.

Grupos de animales.

Para el estudio se utilizaron 10 cerdos convencionales de la raza Landrace x Largewhite, de 7 semanas de edad, procedentes de una granja de selección y multiplicación libre de *S. suis*. Seleccionamos esta explotación tras el seguimiento realizado durante el último año, donde no se habían presentado casos clínicos de la enfermedad. Además, en esta granja se había descartado la presencia de animales portadores en un muestreo realizado sobre tonsilas de animales sacrificados en matadero (prevalencia esperada del 10% y nivel de

confianza del 99%), mediante aislamiento y técnicas de PCR específicas para la especie (Okwumabua et al., 2003).

Infección experimental y valoración clínica.

La experiencia se llevó a cabo en la Granja Universitaria Experimental de Rabanales. Los animales, tras su llegada, fueron identificados y alojados de forma aleatoria en tres cubículos separados (grupo A y B con 4 animales cada uno y el grupo C con dos animales) de forma que no existiera contacto físico entre ellos.

Tras el periodo de adaptación (cinco días), los animales fueron infectados (Grupo A-cepa 235/02; grupo B-cepa 123/11 grupo C- PBS) por vía intravenosa, en la vena marginal de la oreja, con 1 mL de una solución con 1×10^9 ucf/mL. Se seleccionó la vía intravenosa por ser aquella en la que podemos asegurar que todos los animales reciben la misma dosis infectante y permite el desarrollo de la enfermedad.

Posteriormente los animales fueron observados diariamente cada ocho horas, durante 15 días, donde se valoró la presencia de signos clínicos (signos nerviosos, articulares) y la temperatura (Tabla 7). Estos datos se anotaban en una hoja de control, diseñada para el estudio, donde además se daba una puntuación a cada animal (0 a 8) según la gravedad clínica (Li et al., 2007). La puntuación total de cada animal se obtuvo sumando la de cada bloque. Aquellos animales que mostraban una puntuación superior a 3 fueron sacrificados con una inyección de T61® por vía intravenosa (4 – 6 ml/50 kg).

Tabla 7: Valoración de signos clínicos. Anotación diaria (puntuación de 0 a 6).

Signos clínicos	Puntuación
Signos articulares	0 Forma de caminar y postura normal. 1 Cojeras y/o hinchazón articular pero se levanta sin ayuda. 2 Moderada incoordinación, cojeras pero se mantiene en pie. 3 Severa cojera y/o ataxia
Signos SNC	0 normal 1 Leves, signos de incoordinación. Poca respuesta a estímulos 2 Moderados. Solo responde a estímulos repetidos 3 Severos, no responde, ignora el entorno
Muerte	4 Muerte

A partir de los animales muertos o sacrificados, se tomaron muestras de diferentes órganos (Tabla 8) para valorar la distribución y gravedad de las lesiones, difusión orgánica de la bacteria y la respuesta a la infección, en su caso.

Análisis laboratorial y estudio estadístico.

El estudio histopatológico, microbiológico y la valoración de la respuesta inmune y el análisis estadístico de los resultados se realizaron como se indicó anteriormente. La evaluación de la distribución e intensidad de las lesiones observadas en órganos, se realizó de acuerdo a la Tabla 8. La puntuación total de cada individuo se obtuvo sumando las obtenidas de cada órgano, con un máximo de 75 puntos por animal.

Tabla 8: Valoración de lesiones en el análisis histopatológico

<i>Cerebro/Cerebelo</i>						
Inf. Meninges	Inf. Ventrículo	Manguitos	Trombos (hemorragias)	Gliosis	Neuronofagia	Necrosis Neuronal
1	Focal	Focal	<3	<3	Focal	<3

2	Multifocal	Multifocal	3-6	3-6	Multifocal	3-6	3-6
3	Difusa	Difusa	>6	>6	Difusa	>6	>6
Pulmón							
	Edema septos	Edema alveolar	Eng. septos	Trombos (hemorragias)	Descamación MAPs	Infil. Pleura	
1	Leve	Focal	Focal	<3	Focal	Focal	
2	Moderado	Multifocal	Multifocal	3-6	Multifocal	Multifocal	
3	Intenso	Difusa	Difusa	>6	Difusa	Difusa	
Tonsila							
	Depleción TLR	Depleción FL	Apoptosis	Inf. Criptas	Trombos		
1	Focal	<50%	<3	Leve	<3		
2	Multifocal	≈50%	3-6	Moderado	3-6		
3	Difusa	>50%	>6	Intenso	>6		
Hígado							
	Inf. Periportal	Perihepatitis	Trombos (Hemorragias)		Degeneración hidrópica		
1	Focal	Focal	<3		Focal		
2	Multifocal	Multifocal	3-6		Multifocal		
3	Difusa	Difusa	>6		Difusa		
Riñón							
	Inf. Intersticial		Tubulonefrosis	Trombos (Hemorragias)			
1	Focal		Focal	<3			
2	Multifocal		Multifocal	3-6			
3	Difusa		Difusa	>6			

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se valora la capacidad patógena de dos cepas, con la finalidad de fijar condiciones de cultivo y comportamiento en cuanto a unos parámetros clínicos y lesionales, así como de distribución en tejidos, para que puedan ser utilizadas en estudios de protección *in vivo* con nuevos tratamientos y vacunas.

Como se observa en la figura 6, en los animales del grupo A, infectados con la cepa 235/02, se observó un pico de temperatura el primer día postinfección, aunque esta no fue muy acusada.

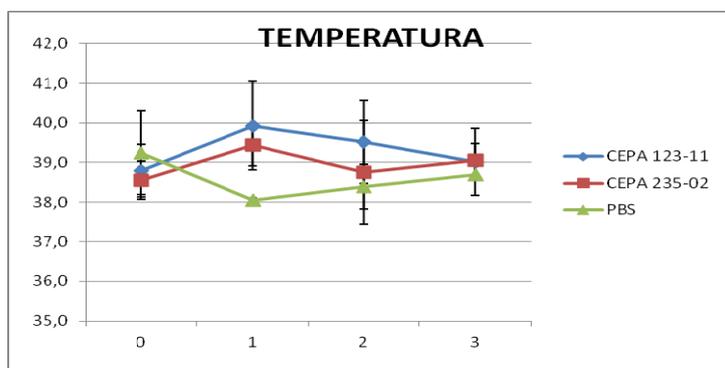


Figura 6. Evolución de las temperaturas medias rectales de los cuatro animales del grupo A (cepa 235/02) y los cuatro del grupo B (cepa 123/11). Se representa la media (+/- desviación típica).

En relación a los signos clínicos, se observó un aumento paulatino de la gravedad de los mismos desde el día 1 pi hasta el día 3 (Figura 7), en que fueron sacrificados por razones de bienestar animal. La puntuación media obtenida en este grupo fue de 2,4. Los signos clínicos más importantes fueron los articulares, que aparecieron en las primeras 24 horas. A partir del tercer día, aparecieron los signos nerviosos, caracterizados por una reducida respuesta a los estímulos, temblores, opistótonos, pataleo y ceguera. En todos los animales se presenció una secreción oculonasal. Uno de los animales del grupo murió a las 72 horas pi.

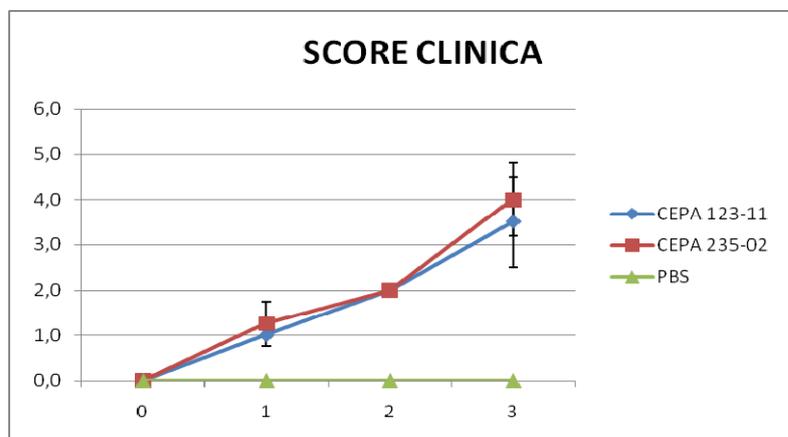


Figura 7: representación gráfica de las medias (\pm -DT) de las puntuaciones anotadas de cada animal en los días que duró la experiencia.

Las lesiones macroscópicas más frecuentemente observadas en los animales fueron meningitis, áreas de congestión y degeneración en cerebelo y cerebro, áreas de neumonía, con depósitos de fibrina en pulmón y poliserositis y poliartritis

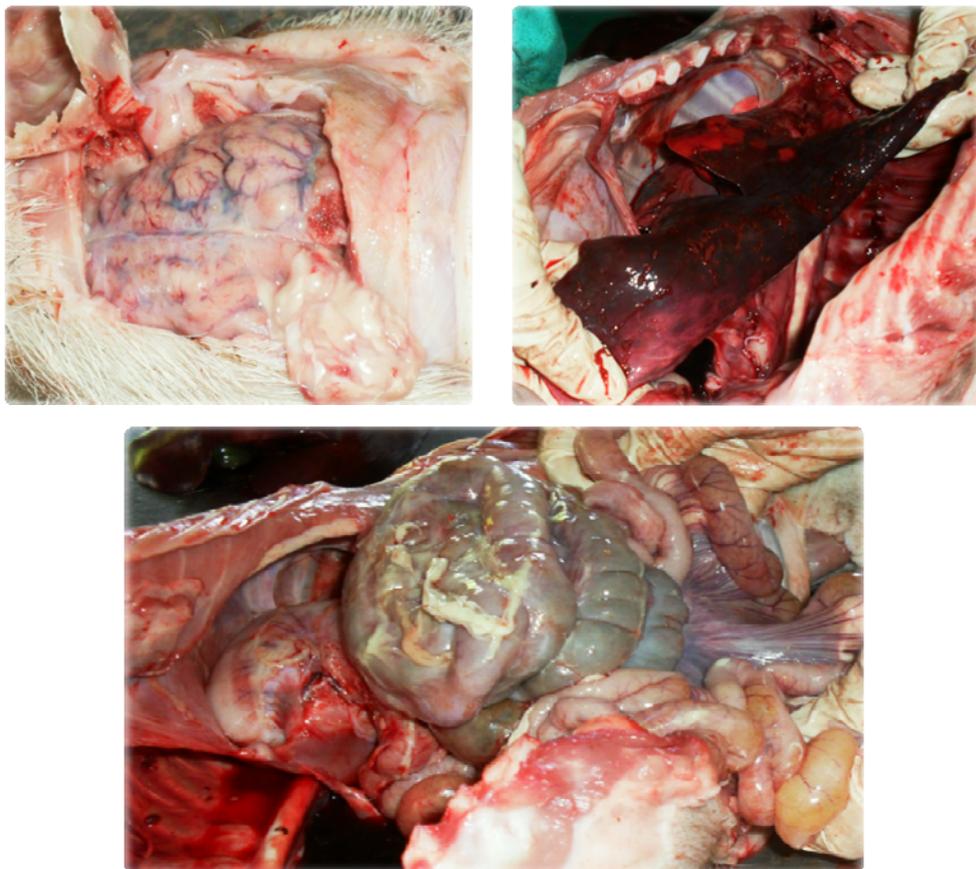


Figura 8: Lesiones macroscópicas. Arriba a la izquierda meningitis, a la derecha áreas de neumonía, abajo poliserositis.

Los cambios histopatológicos alcanzaron un valor medio de 49,33. A nivel del sistema nervioso central (SNC) se observó un marcado infiltrado de tipo mixto en el espacio subaracnoideo del encéfalo, cerebelo y ventrículo, así como la formación de numerosos manguitos perivasculares. Los fenómenos de gliosis fueron abundantes, y también se evidenció neuronofagia y ocasionalmente necrosis neuronal. A nivel vascular observamos trombos aislados y pequeñas hemorragias multifocales. Las principales lesiones observadas en pulmón fueron de tipo vascular, edema interlobulillar y edema alveolar, congestión, hemorragias y formación de trombos. Asimismo, se observó un ligero engrosamiento de los septos alveolares y la descamación ocasional de macrófagos alveolares pulmonares (MAPs). En la tonsila de los animales infectados se observó una depleción linfoide moderada de los folículos linfoides, así como un moderado infiltrado de tipo mixto en las criptas tonsilares. En el hígado y riñón se observó la formación de trombos, así como pequeñas áreas de hemorragia y congestión, e infiltrado periportal en el hígado.

Los animales del grupo B, infectados con la cepa 123/11 también mostraron fiebre el primer día tras la infección. Todos los animales presentaron signos clínicos a partir de las 24 horas tras la infección. La puntuación media obtenida fue de 2,2 y también estuvieron representados fundamentalmente por los signos articulares apareciendo los signos nerviosos al tercer día postinfección y similares a los observados en los animales del Grupo A (Figura 7). Un animal se recuperó a partir de las 72 horas y el resto fueron sacrificados al tercer día postinfección. Los cambios histopatológicos alcanzaron un valor de 37,75 puntos. Las lesiones observadas presentaron una distribución e intensidad similar a las descritas para los animales del grupo A; en uno de los animales se observó un marcado infiltrado de tipo mixto a nivel de la pleura.

Como se ha indicado, la valoración de los signos clínicos fue muy similar en los animales infectados. No hubo diferencias significativas entre los grupos A y B; siéndolos signos articulares más evidente durante las primeras 48 horas, aunque a partir de las 72 horas se empezaron a manifestar signos nerviosos y obligaron al sacrificio al sacrificio, por razones humanitarias. Las lesiones histopatológicas fueron más marcadas en el grupo A, y se centraron principalmente en SNC, aunque en ningún caso estas diferencias fueron significativas. En ambos grupos se recuperaron las cepas de todos los órganos y sangre, excepto del animal que sobrevivió, del que sólo pudo ser aislada a partir de las tonsilas.

CONCLUSIONES

Ambas cepas muestran un comportamiento similar en cuanto a los signos clínicos, histopatológicos y recuentos bacterianos en una infección aguda experimental en cerdos.

A partir de los resultados de este estudio, seleccionamos la cepa 235/02 para la valoración de la capacidad protectora de nuevas vacunas en cerdos. Aunque consideramos que dada la virulencia de la cepa para los cerdos en este modelo experimental se deberán estudiar otras condiciones de infección, reduciendo la dosis infectante.

2.4. VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA VACUNA RECOMBINANTE *WELLVAC-SUIS*, FRENTE A LAS INFECCIONES POR *S. SUIS* EN CERDO.

Para llevar a cabo este objetivo, presentamos nuestra propuesta de trabajo a la convocatoria de Proyectos NADIR, financiado por la Unión

Europea, para llevar a cabo estudios experimentales sobre enfermedades infecciosas de los animales que requieren bio-contención en el nivel 3 (L3). Tras su aprobación por el comité de expertos (Enero de 2013), ha recibido financiación del Séptimo Programa Marco de la Comunidad Europea (FP7, 2007-2013), Investigación en Infraestructuras, bajo el acuerdo de subvención No. FP7-228394 (Valoration of a new recombinant protein as vaccine candidate against *Streptococcus suis* infection in pigs-Wellvac-suis, application nº 49). El trabajo experiemtnal con animales se ha desarrollado, como se ha indicado anteriormente, en las instalaciones de experimentación animal del Centro Veterinario Nacional DTU-Lindholm (Dinamarca) durante los meses de marzo y abril de 2013.

MATERIAL Y MÉTODOS

Inmunización e infección de los animales

Se utilizaron para este ensayo experimental dieciséis cerdos de la raza Landrace x Largewhite de cuatro semanas de edad, procedentes de una explotación danesa libre de *S. suis* serotipo 2, que se dividieron aleatoriamente en dos grupos de ocho animales cada uno. Estos animales se identificaron con un crotal auricular con números 1-16 el día de su llegada y se mantuvieron en el mismo local hasta la infección experimental, en que se separaron los dos grupos en habitáculos independientes. Tras el periodo de adaptación, que fue de cuatro días, siete animales del Grupo 1 se inmunizaron, por vía intramuscular, con la vacuna *Wellvac-suis*, que contenía 130 µg de la proteína r-SsnA purificada, mezclada con una combinación de hidróxido de aluminio y QuilA como adyuvante, y este mismo producto se le aplicó a los 14 días de la primera inmunización. Los animales del grupo 2 fueron inmunizados con el adyuvante y PBS. Finalmente, y como control de infección se dejaron dos

animales, uno en cada grupo, a los que se les administró 1 mL de PBS, siguiendo el mismo protocolo (dos inyecciones vía intramuscular, con un intervalo de 14 días).

Todos los productos que se inyectaron a los cerdos, tanto la vacuna que contenía la proteína recombinante (wellvac-suis), el placebo, que contenía solo el adyuvante con PBS y el PBS, fueron preparados por la empresa HIPRA, S.A. bajo la dirección de Dña. Carmen Moreno, investigadora del departamento I+D+i de la empresa, que también realizó los controles de calidad habituales para los preparados comerciales.

Una semana después de la segunda inyección, todos los animales se infectaron por vía intravenosa, en la vena marginal de la oreja, con 1×10^8 ufc/mL de la cepa 235/02 de *S. suis* en 1 mL de THB.

Evaluación de los parámetros clínicos de la enfermedad y mortalidad en cerdos.

El diseño del estudio contemplaba la valoración de temperatura, signos clínicos y mortalidad de los animales diariamente, cada 8 horas los dos primeros días y cada 24 horas a partir del tercer día hasta el día 10 pi. Desde el inicio de la experiencia, en los días previos y posteriores a cada manipulación, se tomó la temperatura rectal de los animales (Fig. 9).

Se valoraron los signos clínicos de los animales con una hoja de control similar a la utilizada en el trabajo anterior (objetivo 2.3), con algunas modificaciones, como fueron la valoración del cuadro septicémico (depresión y anorexia) y la lectura del grado de cojeras de cada una de las patas (Tabla 9). Por ello, las puntuaciones totales fueron superiores.

Tabla 9: Valoración de signos clínicos. Anotación diaria (puntuación de 0 a 12)

Signos clínicos	Puntuación
Septicemia	0 No 1 Si
Cojeras (cada pata)	0 Normal 1 Grado 1, evita movimiento 2 Grado 2, no la apoya
Signos SNC	0 normal 1 Leves, signos de incoordinación. Solo visible al manipular al animal 2 Moderados. signos de incoordinación, Temblor cabeza en reposo 3 Severos, nistagmos, opistotonos, ataxia.
Muerte	4 Muerte

La puntuación de cada animal se obtuvo sumando las puntuaciones de cada bloque. Los animales que presentaban signos clínicos graves (puntuaciones mayores a 4) fueron sacrificados con una inyección de T61® por vía intravenosa (4 – 6 ml/50 kg).

Análisis laboratorial y estudio estadístico.

El recuento de bacterias viables y la valoración de los títulos de anticuerpos frente a la proteína recombinante y a la infección bacteriana se realizaron como se describe previamente. En este trabajo no se realizó el estudio histopatológico, pues los animales fueron sacrificados por razones humanitarias a las 24 horas postinfección, pero sí se realizaron ensayos de opsonofagocitosis para determinar la capacidad opsonizante de los anticuerpos en el suero de los animales, tal y como se describe a continuación.

Ensayo de Opsonofagocitosis.

El ensayo de opsonofagocitosis se realizó según la metodología de trabajo propuesta por el Dr. Christoph Baums, del departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de Hannover, donde se realizó una estancia de investigación, financiada a través del Convenio de colaboración

entre ambos centros, y por el propio Departamento de Sanidad Animal de la UCO.

Para realizar el ensayo, se necesitó sangre entera heparinizada fresca, que fue suministrada por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba. Para la obtención de los neutrófilos, la sangre se diluyó a una proporción 1:2 con solución salina estéril y posteriormente se separaron los elementos sanguíneos con la técnica de Ficoll hypaque, que consiste en la centrifugación por gradiente de densidad.

Para ello se añadieron 12 mL de sangre diluida a 12 mL de Ficoll y se centrifugó a 1500 rpm durante 32 minutos a 21°C. Durante la centrifugación se formaron varias capas, recogiendo el sedimento que contenía los neutrófilos y eritrocitos. Posteriormente, para eliminar los eritrocitos se realizaron varios lavados hasta que el pellet quedó blanco (lisis completa de los eritrocitos) con 8 mL de NaCl al 0,2%, durante 30 segundos y rápidamente se añadieron 8mL de NaCl al 1,6%, centrifugando durante 6 minutos a 1500 rpm y 6 °C. A continuación, el pellet se resuspendió en RPMI 1640 (Gibco) y se ajustó a una concentración de $5 \cdot 10^6$ neutrofilos/mL. Las células se contaron en una cámara de Neubauer en una dilución 1:50.

Posteriormente, la bacteria se hizo crecer en THB hasta una $DO_{600}=0,3$, y se hicieron los recuentos en placa para comprobar las ufc/ μ L presentes. Se añadieron al ensayo $2 \cdot 10^6$ bacterias para que la dosis de infección neutrófilos/bacterias fuera 1:1. En nuestro caso obtuvimos un cultivo de 1,25 ufc/ μ L.

Para la realización de la técnica propiamente dicha, se incubaron a 37 °C durante una hora, en agitación, cantidades constantes de bacterias (16 μ L) y neutrofilos (400 μ L) con 100 μ L del suero problema. Posteriormente se

sembraron 20 μ L de las diluciones 10² y 10³ de estos productos en placas CNA (t=0 y t=60 min). Después de 24h a 37 °C, se realizaron los recuentos de las colonias bacterianas en las placas, y se aplicó la siguiente fórmula matemática:

$$\text{Factor de supervivencia: } N^{\circ} \text{ colonias } t=60 / N^{\circ} \text{ colonias } t=0.$$

Se consideró un resultado positivo cuando este factor era menor a la unidad, y menor al obtenido en los sueros negativos, indicando que los anticuerpos eran protectores. Para la realización de esta prueba, se utilizaron sueros control positivos (suero del animal convaleciente del ensayo anterior) y sueros control negativo (animales sanos libres de *S. suis*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La valoración de la capacidad protectora de las nuevas vacunas en modelos de infección en cerdos, debe ser un paso imprescindible para demostrar realmente la utilidad de estos preparados, y pasar a una última fase, si los resultados son aceptables, que debería ser una prueba de campo. A continuación se exponen los resultados obtenidos tras la aplicación de la vacuna Wellvac-suis.

Signos clínicos y mortalidad de los animales infectados.

Se midió la temperatura rectal de los animales a lo largo de toda la experiencia, en los días previos y posteriores a la administración de la vacuna y de la infección con *S. suis* (Figura 9). El incremento más importante se obtuvo entre las 19 y 24 horas pi con temperaturas medias de 41-42 °C, aunque no hubo diferencias significativas entre grupos.

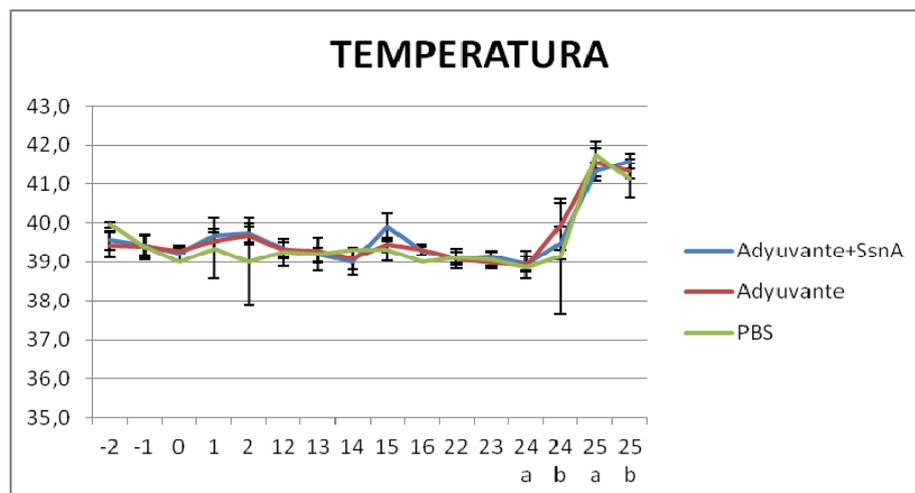


Figura 9: Evolución de las temperaturas medias de cada grupo a lo largo de la experiencia. Las vacunas se realizaron los días 0 y 14 y la infección experimental el día 24 (24 a: infección, 24b: 12 horas pi, 25^a: 19 horas pi, 25b: 24 horas pi).

Las siguientes figuras muestran las puntuaciones clínicas medias totales de la valoración clínica obtenida para cada grupo (Figura 10), así como las medias para el cuadro septicémico (Figura 11) y articular (Figura 12), dos días antes de la infección y tras el *challenge* (12, 19 y 24 h pi). Algunos animales, concretamente dos del grupo vacunado (28,6%), cuatro del grupo tratado solo con adyuvante (57,1%) y los dos del grupo al que se le administró PBS (100%) presentaron a las 12 horas pi falta de apetito y leve depresión, que se agravó a las 19 horas pi, coincidiendo con el aumento de la (Figura 11).

Simultáneamente, a partir de las 12 horas se apreciaron cojeras en todos los animales, debido a la inflamación de una o varias articulaciones, y a las 24 horas p.i. se observó un incremento en la gravedad de estos signos, fundamentalmente en el grupo de animales no tratados (Figura 12). Al aplicar análisis estadísticos, solo se encontraron diferencias significativas entre las puntuaciones medias totales y las de los signos articulares, a las 24 horas pi,

entre los grupos vacunados y los grupos a los que solo se les administró PBS ($p < 0,05$).

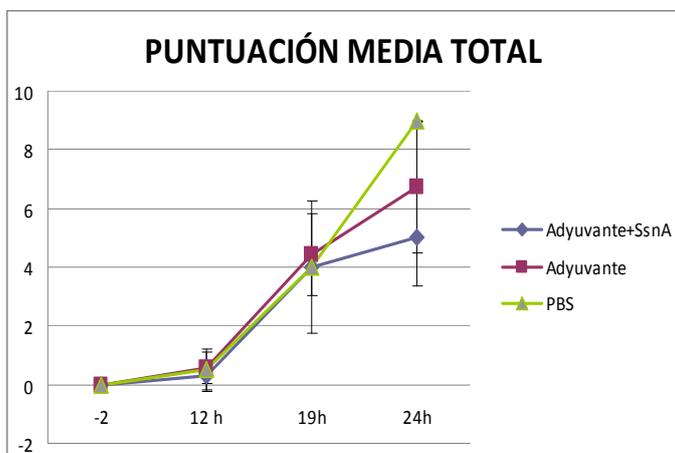


Figura 10: Evolución de las puntuaciones medias totales de signos clínicos de cada grupo tras la infección con la cepa 235/02.

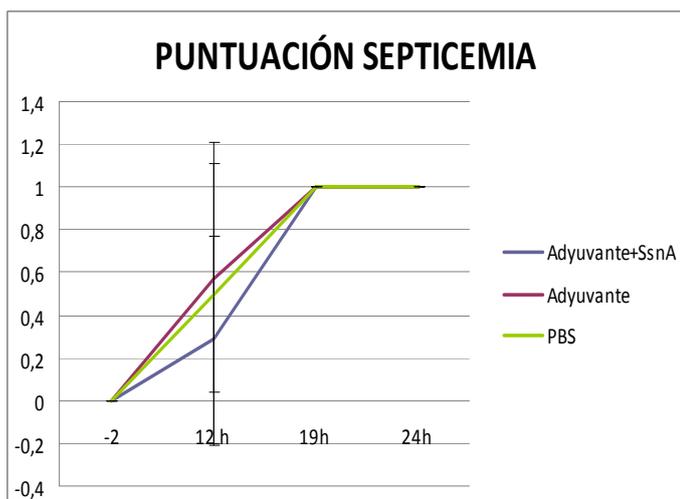


Figura 11: Evolución de las puntuaciones medias del cuadro septicémico de los animales de cada grupo tras la infección con la cepa 235/02.

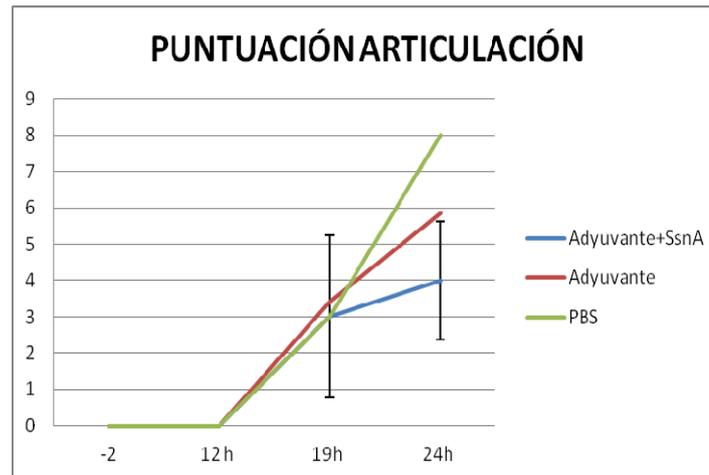


Figura 12: Evolución de las puntuaciones medias del cuadro articular de los animales de cada grupo tras la infección con la cepa 235/02.

Aunque se aprecian diferencias entre los grupos, principalmente en la clínica articular, la gravedad de estas lesiones, que afectaron a varios miembros, unido a los signos derivados del cuadro septicémico (anorexia, depresión) observados en todos los grupos, obligaron al sacrificio temprano de todos los animales. Por lo tanto, no dio tiempo al desarrollo de la clínica nerviosa, que tal y como demostramos en el ensayo anterior debería aparecer a partir del tercer día pi.

Por ello, aunque en este ensayo se redujo la dosis infectante en relación al estudio anterior, consideramos que en futuros ensayos que se realicen con esta cepa, se deben valorar otras dosis o vías de infección, dado el carácter tan virulento de la misma en condiciones experimentales.

Recuento de bacterias viables en órganos.

Como se indicó anteriormente, se realizó el recuento bacteriano en órganos y sangre para comprobar posibles diferencias en la diseminación y concentración de *S. suis* entre los diferentes grupos. Según nuestros resultados,

la diseminación de la bacteria se produjo de forma similar en todos los animales, sin diferencias significativas entre grupos para ninguna localización. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los ensayos anteriores. Se obtuvieron recuentos de aproximadamente 10^2 ufc/0,05 g en pulmón, hígado y cerebro y de 10^2 - 10^3 ufc/0,05 g en bazo y riñón.

Detección de anticuerpos frente a la SsnA en cerdos tras la inmunización con el complejo vacunal Wellvac-suis.

Para valorar la respuesta inmune frente a la vacuna recombinante, se obtuvo el suero de todos los animales los días 0, 14 y 24 del ensayo. Como era de esperar, no se detectaron anticuerpos específicos frente a la SsnA ni frente a *S. suis*, en ningún animal, antes de la primera vacunación. Los animales inmunizados con la vacuna Wellvac-suis mostraron una fuerte respuesta inmunitaria específica (IgG) a los 14 días (primera vacunación) que aumentó de forma significativa tras la segunda dosis (día 24) (Figura 13a y b). Por el contrario, los animales que solo recibieron dos dosis de adyuvante o PBS no mostraron ningún indicio de respuesta específica frente a la proteína SsnA. Las diferencias entre los animales vacunados y el resto de grupos fueron significativas ($p=0,000$). En ensayos previos, ya obtuvimos unos buenos resultados en animales de laboratorio, como conejos o ratones, con este estudio podemos asegurar que esta proteína es fuertemente inmunógena también para el cerdo.

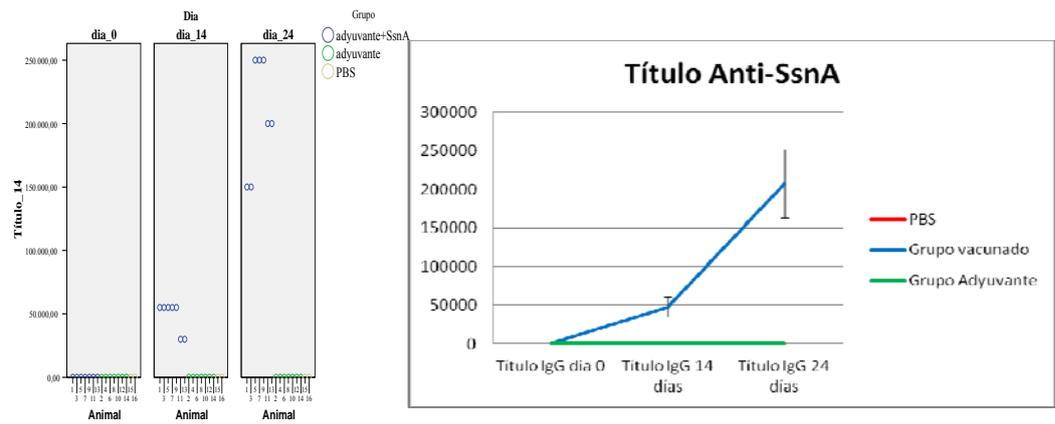


Figura 13 (a y b). Representación gráfica de los títulos de anticuerpos individuales (a) y medias por grupo (b) frente a la SsnA los días 0, 14, 24 de la experiencia.

Ensayo de opsonofagocitosis. Determinación del carácter opsonico de los anticuerpos.

Para determinar la capacidad fagocítica o carácter opsonico de los anticuerpos detectados frente a la SsnA, se realizó el ensayo de opsonofagocitosis descrito por Baums y colaboradores (2009). Como se muestra en la siguiente figura (Figura 14), los resultados no han sido satisfactorios. En esta prueba se utilizó como control positivo el suero del animal convaleciente de la experiencia anterior, que mostró una capacidad opsonizante excelente, al reducir el número de bacterias a unos límites mínimos, cuando se incubaron con el suero en presencia de neutrófilos porcinos.

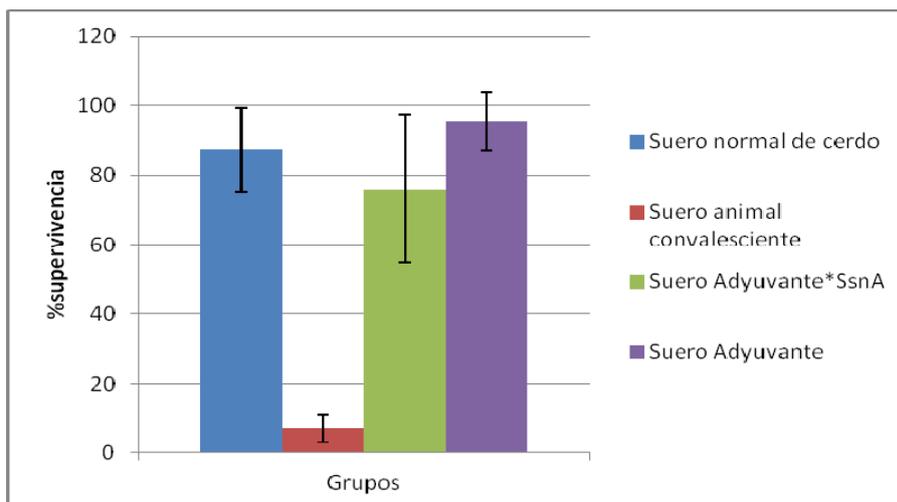


Fig. 14: Resultados del ensayo de opsonofagocitosis en cada grupo.

Por el contrario, el suero pre-inmune de los animales no tuvo efecto sobre el crecimiento de la bacteria (suero normal de cerdo), y estos mismos resultados se obtuvieron con los sueros de los animales pretratados con el adyuvante (suero adyuvante) o con la vacuna Wellvac-suis (suero adyuvante SsnA).

En trabajos previos, se ha sugerido que los fracasos en la vacunación pueden ser debidos a varias razones, o bien a que el antígeno no sea protector o que el adyuvante utilizado no estimule una respuesta inmune adecuada (Li et al., 2006, 2007; Esgleas et al., 2013).

En nuestro estudio, se seleccionó un adyuvante que contenía dos productos, el hidróxido de aluminio y el Quil A, ambos utilizados en vacunas comerciales en medicina veterinaria (Aguilar y Leal, 2000 *Biología Aplicada, Volume 17, July-September 2000, pp. 147-160*). El hidróxido de aluminio se ha seleccionado por varias razones, la primera por los buenos resultados obtenidos en el ensayo realizado con ratones, además, de reunir una serie de requisitos, como son la buena adsorción a los antígenos, que influye

de manera positiva en la presentación de estos al sistema inmune (Zlatkovic et al., 2013) y estimular al sistema del complemento (Güven et al., 2013), a lo que hay que añadir que es barato, fácil de usar y que no produce lesiones en el punto de inoculación, como sucede con otros adyuvantes (Krejci et al., 2012)

En el ensayo con ratones, también indicamos que sería conveniente mezclar el ALOH con otro adyuvante que estimulara una respuesta inmune temprana. Se seleccionó en este trabajo el QUILA, un extracto acuoso de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina, en primer lugar por las buenas referencias en la bibliografía consultada, cuando se ha probado con otros antígenos vacunales, como la Sao (Li et al., 2007). Como se indicó en la revisión bibliográfica, las saponinas de *Q. saponaria* Molina tienen un excelente efecto adyuvante para antígenos dependientes de las células T y estimula respuestas de células T auxiliares de tipo 1 (Th1), y se han utilizado con éxito en combinaciones con hidróxido de aluminio (Kensil, 1996).

CONCLUSIONES

La vacuna Wellvac-suis, elaborada con la proteína rSsnA en combinación con hidróxido de aluminio y Quil-A como adyuvantes, estimula una fuerte respuesta inmune específica, aunque esta respuesta, tal como es evaluada en éste ensayo, no es capaz de proteger a los animales frente a una infección por *S. suis*.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN GENERAL

6. DISCUSIÓN GENERAL

Hoy en día, uno de los grandes retos de la investigación mundial es desarrollar vacunas eficaces frente a *S. suis* (de Greef et al., 2002; Li et al., 2007; Fittipaldi et al., 2008; Baums y Valentin-Weigand, 2009). Merece la pena mencionar que transcurridos más de treinta años de investigación, no haya todavía una vacuna comercial para el control de esta enfermedad. La gran diversidad de serotipos y la variabilidad genética entre aislamientos, obligan a dirigir las investigaciones al descubrimiento de un antígeno común a todos o la mayoría de los aislados de interés clínico para los cerdos e incluso para el hombre, dado el carácter zoonótico de esta enfermedad (Vela et al., 2003; Tarradas et al., 2004; Baums et al., 2009; Marois et al., 2006; Fittipaldi et al., 2009; Zhang et al., 2009).

En los últimos años, se han propuesto diferentes candidatos vacunales, siendo las proteínas de superficie bacteriana las que se estudian con especial atención. Para ello, la proteómica es una herramienta de enorme utilidad para este fin (Rodríguez-Ortega et al., 2008, Wu et al., 2008). En este trabajo, aplicando una técnica novedosa, basada en el pelado de las bacterias vivas con tripsina, hemos definido el pan-surfoma de un conjunto importante de aislamientos de *S. suis*, pertenecientes a los serotipos de mayor importancia clínica para el cerdo, identificando un total de 113 proteínas: 33 lipoproteínas; 17 proteínas de la pared celular; 9 proteínas secretadas, 28 proteínas de membrana con un dominio transmembrana y 26 proteínas multi-transmembrana.

De todas las proteínas identificadas, consideramos que aquellas que se encuentran en la pared celular son las más interesantes, ya que están más expuestas en la superficie de la bacteria, y por tanto, que son las más fácilmente reconocidas por el sistema inmune del hospedador (Navarre et al.,

1999; Rodriguez-Ortega et al., 2006; Olaya-Abril et al., 2012). Hemos identificado siete proteínas en más del setenta por ciento de los serotipos, y de ellas hay tres proteínas de pared celular *cell envelope proteinase* (SSU0757), *5'-nucleotidase* (SSU0860) y *surface-anchored DNA nuclease* o SsnA (SSU1760), que podrían ser buenos candidatos vacunales, como ya ha sido sugerido por otros autores para cepas del serotipo 2 o 9 (Wu et al., 2008; Geng et al., 2008; Qiaoyun Hu et al., 2009; Bonifait et al., 2010, 2011).

En base a los criterios que han de tenerse en cuenta para la selección de un buen candidato vacunal, como son: a) estar expuesta en la superficie de la mayoría de serotipos y expresarse “in vivo”; b) ser accesible a los anticuerpos c) ser muy inmunógena y d) estar conservada, en nuestro estudio, nos centramos en la *Streptococcal DNA nuclease*. Esta proteína ha sido considerada un factor de virulencia para cepas de los serotipos 1 al 9 de *S. suis* por Fontaine y colaboradores (2004), pero hasta ahora no se había analizado su utilidad como candidato vacunal. En este trabajo hemos demostrado que esta proteína está ampliamente distribuida y conservada en los aislamientos clínicos analizados, pertenecientes a 19 serotipos diferentes de *S. suis*, está bien expuesta y accesible a los anticuerpos, siendo además muy inmunógena.

Estos resultados nos permitieron abordar la segunda parte del trabajo, que consistía en demostrar experimentalmente su verdadero potencial como candidato vacunal. Para ello, aplicamos modelos de infección experimental, *in vitro* e *in vivo*, que nos han permitido demostrar la capacidad patógena de una cepa de *S. suis* serotipo 2 en ratones y cerdos, y su utilidad para la valoración de nuevos tratamientos frente a la infección en estas especies animales.

Es un hecho reconocido que las nuevas vacunas de subunidades son menos inmúnogenas, y la selección de un adyuvante adecuado es un punto crítico para la obtención de un compuesto eficaz (Aucoutier et al., 2001; Koffman et al., 2010; Krejci et al., 2012). No obstante, aunque la lista de adyuvantes es cada vez mayor, es difícil encontrar publicaciones que comparen el efecto de estos adyuvantes en modelos experimentales (Wisselink et al., 2001; Krejci et al., 2012). En este trabajo se han comparado tres productos (Hidróxido de aluminio, Aceite en agua y adyuvante incompleto de Freund), en un análisis previo en ratones, para elegir el que mejor respuesta tuviera ante la infección por *S. suis*. No obstante, obtuvimos unos resultados inesperados, y en este modelo experimental, comprobamos que los animales a los que se les aplicó el adyuvante, consiguieron sobrevivir a la infección, por lo que no pudimos valorar su capacidad protectora basándonos sólo en porcentaje de supervivencia/mortalidad y respuesta inmune (Zhang et al., 2009; Chen et al., 2010). Por ello se aplicó un protocolo de valoración clínica e histopatológica, análisis laboratorial basado en recuentos bacterianos durante siete días postinfección, y estudio de la respuesta inmune específica. Nuestros resultados demostraron la existencia de diferencias entre los adyuvantes, considerando que uso del hidróxido de aluminio combinado con otro adyuvante que estimule una respuesta inmune humoral temprana podría ser una buena opción, como el QuilA (Kensil, 1996; Aguilar y Leal, 2000; Li et al., 2007).

Para valorar la eficacia de estos preparados vacunales, y según nuestros resultados, hay que realizar obligatoriamente estudios experimentales en cerdos, pues aunque los modelos murinos pueden darnos alguna información (virulencia, respuesta inmune), los resultados no pueden ser extrapolados al cerdo, como ya apuntaron algunos investigadores (Vecht et al., 1991). En este estudio demostramos que una vacuna elaborada con r-SnnA y dos adyuvantes, el hidróxido de aluminio combinado con Quil A, estimula la producción de

anticuerpos frente a esta proteína, pero no protege frente a la enfermedad causada por *S suis* serotipo 2, en las condiciones experimentales de este trabajo (dosis de 10^8 ufc/mL vía endovenosa), hecho que puede ser explicado porque los anticuerpos producidos no son opsonizantes (Chabot-Roy et al 2006; (Fittipaldi et al., 2006, 2007; Baums et al., 2009).

Por lo tanto, serán necesarios nuevos estudios para valorar otros antígenos como candidatos vacunales, en la que deberían participar distintos grupos de investigación y con una adecuada financiación, para adquirir protocolos comunes que nos permitan desarrollar una vacuna eficaz para todos los países productores de cerdos.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Se demuestra la eficacia de la técnica proteómica de digestión de células vivas (*shaving*) para el análisis del pan-surfoma de la especie *S. suis*, que permite la detección de proteínas superficiales comunes a la mayoría de los serotipos clínicamente relevantes para el cerdo.
2. Se han identificado tres proteínas de pared celular en mas del setenta por ciento de los serotipos estudiados, denominadas *cell envelope proteinase* (SSU0757), *5'-nucleotidase* (SSU0860) y *surface-anchored DNA nuclease* (SSU1760), que podrían ser buenos candidatos vacunales solas o combinadas con otras. Para valorar su capacidad como antígeno vacunal, los estudios deben complementarse con técnicas moleculares para demostrar su carácter conservado y técnicas inmunológicas para valorar su capacidad inmunógena y accesibilidad a los anticuerpos.
3. Se propone el siguiente protocolo basado en la valoración clínica y lesional, estudio microbiológico y respuesta inmune humoral (títulos de anticuerpos y carácter opsónico) para demostrar la capacidad protectora de nuevos antígenos vacunales en modelos *in vivo* (ratones y cerdos) frente a infecciones por *S. suis*.
4. Los adyuvantes hidróxido de aluminio, emulsión de aceite en agua y el incompleto de Freund pueden tener un efecto protector frente a la muerte en las primeras 72 horas postinfección en modelos murinos. El hidróxido de aluminio se presenta como una opción interesante para su uso como adyuvante en vacunas frente a las infecciones por *S. suis*, combinado con otros que estimulen una mejor respuesta inmune humoral.

5. La vacuna Wellvac-suis, elaborada con la proteína rSsnA en combinación con hidróxido de aluminio y Quil-A como adyuvantes, estimula una fuerte respuesta inmune específica, aunque esta respuesta, tal como es evaluada en éste ensayo, no es capaz de proteger a los animales frente a una infección por *S. suis*, probablemente debido a que los anticuerpos que induce no tienen capacidad opsonizante.

CAPÍTULO 8.RESUMEN

RESUMEN

Streptococcus suis es microorganismo de enorme repercusión económica para la industria porcina y una marcada importancia sanitaria, al ser considerado un agente zoonótico emergente. En base al polisacárido capsular, se reconoce la existencia de 35 serotipos, siendo los serotipos del 1 al 10, 14, 15, 16, 1/2 y 1/14 los que se asocian a la mayoría de los brotes clínicos en el cerdo y el hombre. El descubrimiento de una vacuna eficaz, elaborada con antígenos comunes y conservados entre serotipos se ha convertido en un objetivo prioritario mundial. Actualmente, la atención se ha desplazado hacia las proteínas de superficie, especialmente aquellas ancladas a la pared celular, que pueden ser detectadas con técnicas proteómicas.

Hemos analizado mediante proteómica una colección de 39 cepas pertenecientes a 19 serotipos, utilizando la técnica del *shaving*, basada en la digestión de células vivas con proteasas y el posterior análisis de los péptidos generados por LC/MS/MS. Esto nos ha permitido definir el pan-surfoma de este grupo de aislados, identificado un total de 113 proteínas (33 lipoproteínas; 17 proteínas de la pared celular; 9 proteínas secretadas, 28 proteínas de membrana con un dominio transmembrana y 26 proteínas multi-transmembrana). De todas las proteínas identificadas, tres proteínas de pared celular *cell envelope proteinase* (SSU0757), *5'-nucleotidase* (SSU0860) y *surface-anchored DNA nuclease* o SsnA (SSU1760), podrían ser buenos candidatos vacunales, al estar presentes en más del 70 por ciento de los serotipos y estar más expuestas en la superficie. Seleccionamos la proteína "*Surface-anchored DNA nuclease*" (*SsnA*) para valorar su potencial como candidato vacunal, mediante ensayos de protección *in vivo* de la proteína recombinante rSsnA. Realizamos un estudio preliminar para seleccionar un adyuvante eficaz para su uso en formulaciones vacunales frente a las infecciones por *S. suis* en el modelo murino, utilizando un protocolo basado en

el estudio clínico y lesional, estudio microbiológico y respuesta inmune humoral de los animales infectados. Los tres adyuvantes utilizados (Hidróxido de Aluminio, aceite en agua e incompleto de Freund) mostraron un efecto protector frente a la muerte en las primeras 72 tras la infección, aunque el hidróxido de aluminio presentó mejores resultados. Por último, se evaluó la capacidad protectora de una nueva vacuna Wellvac-suis, elaborada con la proteína rSsnA, con una combinación de hidróxido de aluminio y QuilA como adyuvantes, en un ensayo experimental en cerdos. Nuestros resultados demuestran que la aplicación de dos dosis de vacuna a los animales separada 14 días estimula una fuerte respuesta inmune específica, aunque esta respuesta, tal como es evaluada en éste ensayo, no es capaz de proteger a los animales frente a una infección por *S. suis* serotipo 2, probablemente debido a que los anticuerpos inducidos no tuvieron capacidad opsonizante.

CAPÍTULO 9. SUMMARY

SUMMARY

Streptococcus suis is a microorganism of enormous economic impact to the swine industry with a public health concern, considered an emerging zoonotic agent. Based on the capsular polysaccharide, the existence of 35 serotypes are recognized, serotypes 1 through 10, 14, 15, 16, 1/2 and 1/14 are associated with the majority of clinical outbreaks in pigs and human. The discovery of an effective vaccine, made with common and conserved antigens between serotypes has become a global priority. Currently, attention has shifted to the surface proteins, especially those anchored to the cell wall, which can be detected with proteomic techniques.

We analyzed using proteomic techniques a collection of 39 strains belonging to 19 serotypes, using the technique of *shaving*, based on digestion of live cells with protease and subsequent analysis of the generated peptides by LC/MS/MS. We define the pan-surfoma this group of isolates, and identify a total of 113 proteins (33 lipoproteins, 17 cell wall proteins, 9 secreted proteins, membrane proteins, 28 with a transmembrane domain and 26 multi-transmembrane proteins). Of all the identified proteins, three proteins of *cell wall cell envelope proteinase* (SSU0757), *5'-nucleotidase* (SSU0860) and *surface-anchored DNA nuclease* or SsnA (SSU1760) could be good vaccine candidates, because they are present in more than 70 percent of the serotypes and more exposed on the surface. We select the protein *Surface-anchored DNA nuclease* (SsnA) to evaluate their potential as a vaccine candidate using *in vivo* protection assays with the recombinant protein rSsnA.

We conducted a preliminary study to select an effective adjuvant for use in vaccine formulations against infections by *S. suis* in the mouse model,

using a protocol based on the clinical and lesional features, microbiological analysis and humoral immune response of infected animals. The three adjuvants used (aluminum hydroxide, water and oil in incomplete Freund) showed a protective effect against death in the first 72 after infection, although the aluminum hydroxide present better results. Finally, we evaluated the protective capacity of a new vaccine Wellvac-suis, made with rSsnA protein, with a combination of aluminum hydroxide and QuilA as an adjuvant, in an experimental trial in pigs. Our results demonstrate that the application of two doses of vaccine applied with an interval of 14 days stimulates a strong specific immune response, but this response, as assessed in this assay, is not able to protect animals against infection by *S. suis* serotype 2, probably because the induced antibodies were not opsonics.

CAPÍTULO 10. AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Ya que el trabajo en equipo es el combustible para el vehículo del logro y como bien dijo el filósofo y ensayista español, José Ortega y Gasset : *“Sólo se aguanta una civilización si muchos aportan su colaboración al esfuerzo. Si todos prefieren gozar el fruto, la civilización se hunde”*, tengo muchísimo que agradecer a todo los que de alguna manera, bien emocional o profesionalmente me han ayudado y apoyado en el desarrollo de esta tesis.

En primer lugar quiero dirigirme a mis directores, Manuel Rodríguez Ortega e Inmaculada Luque, gracias por haber confiado en mí y aportarme vuestros conocimientos, y no me refiero solo a los científicos.

En segundo lugar y no menos importante, a mis compañeros y técnicos de laboratorio, los cuales me han ayudado mucho en el trabajo y en lo personal y me han hecho este periodo de mi vida mucho más llevadero. Gracias Alfonso, Irene, Lula, M^a Carmen, Fernando, Ángela.

Por otra parte, agradecer a los departamentos de Bioquímica y Biología Molecular, Sanidad Animal, Anatomía Patológico, a la granja experimental de la UCO, al servicio de experimentación animal y al Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI-UCO) por permitirme el uso de sus instalaciones, equipos y material, sin los cuales no habría sido posible desarrollar el trabajo.

Agradecer a la empresa HIPRA S.A. de Barcelona por la ayuda ofrecida y por darnos un poquito de luz frente a las adversidades “inmunoestimulantes”.

También ofrecerle unas palabras de agradecimiento al profesor Dr. Christoph Baums, del departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de Hannover, donde realice una estancia de investigación, y al Dr.

Jens Nielsen de las instalaciones de experimentación animal del Centro Veterinario Nacional DTU-Lindholm (Dinamarca) por el buen trato y las enseñanzas aportadas. Así como al Proyecto NADIR, financiado por la Unión Europea, para llevar a cabo estudios experimentales sobre enfermedades infecciosas de los animales que requieren bio-contención en el nivel 3 (L3).

Y por último a mi familia, que es lo mas grande que tengo, y que sin los que seguro, no habría llegado hasta aquí.

CAPÍTULO 11. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- Aranda, J., Garrido, M. E., Cortés, P., Llagostera, M., & Barbé, J. (2008). Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions. *Infection and immunity*, 76(4), 1590–8. doi:10.1128/IAI.00987-07
- Aranda, J., Garrido, M. E., Fittipaldi, N., Cortés, P., Llagostera, M., Gottschalk, M., & Barbé, J. (2009). Protective capacities of cell surface-associated proteins of *Streptococcus suis* mutants deficient in divalent cation-uptake regulators. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 5), 1580–7. doi:10.1099/mic.0.026278-0
- Aucouturier, J., Dupuis, L., & Ganne, V. (2001). Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, 19(17-19), 2666–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257407>
- Aucouturier, Jerome, Ascarateil, S., & Dupuis, L. (2006). The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. *Vaccine*, 24 Suppl 2, S2–44–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16823921>
- Baums, Christoph G, Kaim, U., Fulde, M., Ramachandran, G., Goethe, R., & Valentin-Weigand, P. (2006). Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. *Infection and immunity*, 74(11), 6154–62. doi:10.1128/IAI.00359-06
- Baums, Christoph G, Verkühlen, G. J., Rehm, T., Silva, L. M. G., Beyerbach, M., Pohlmeier, K., & Valentin-Weigand, P. (2007). Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany. *Applied and environmental microbiology*, 73(3), 711–7. doi:10.1128/AEM.01800-06
- Baums, Christoph Georg, Brüggemann, C., Kock, C., Beineke, A., Waldmann, K.-H., & Valentin-Weigand, P. (2010). Immunogenicity of an autogenous *Streptococcus suis* bacterin in preparturient sows and their piglets in relation to protection after weaning. *Clinical and vaccine immunology*: CVI, 17(10), 1589–97. doi:10.1128/VI.00159-10
- Baums, Christoph Georg, Kock, C., Beineke, A., Bennecke, K., Goethe, R., Schröder, C., Waldmann, K.-H., et al. (2009). *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. *Clinical and vaccine immunology*: CVI, 16(2), 200–8. doi:10.1128/VI.00371-08
- Baums, Christoph Georg, & Valentin-Weigand, P. (2009). Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 10(1), 65–83. doi:10.1017/S146625230999003X
- Beineke, A., Bennecke, K., Neis, C., Schröder, C., Waldmann, K.-H., Baumgärtner, W., Valentin-Weigand, P., et al. (2008). Comparative evaluation of virulence and pathology of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 in experimentally infected growers. *Veterinary microbiology*, 128(3-4), 423–30. doi:10.1016/j.vetmic.2007.10.028
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology*, 340(4), 783–95. doi:10.1016/j.jmb.2004.05.028

- Benga, L., Goethe, R., Rohde, M., & Valentin-Weigand, P. (2004). Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cellular microbiology*, 6(9), 867–81. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00409.x
- Berthelot-Hérault, F., Cariolet, R., Labbé, A., Gottschalk, M., Cardinal, J. Y., & Kobisch, M. (2001). Experimental infection of specific pathogen free piglets with French strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, 65(3), 196–200. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1189675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Berthelot-Hérault, F., Gottschalk, M., Labbé, A., Cariolet, R., & Kobisch, M. (2001). Experimental airborne transmission of *Streptococcus suis* capsular type 2 in pigs. *Veterinary microbiology*, 82(1), 69–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11423197>
- Berthelot-Hérault, Florence, Gottschalk, M., Morvan, H., & Kobisch, M. (2005). Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89-1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, 69(3), 236–40. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1176304&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Blume, V., Luque, I., Vela, A. I., Borge, C., Maldonado, A., Domínguez, L., Tarradas, C., et al. (2009). Genetic and virulence-phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of *Streptococcus suis* swine isolates. *International microbiology*: the official journal of the Spanish Society for Microbiology, 12(3), 161–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19784922>
- Bøhle, L. A., Riaz, T., Egge-Jacobsen, W., Skaugen, M., Busk, Ø. L., Eijsink, V. G. H., & Mathiesen, G. (2011). Identification of surface proteins in *Enterococcus faecalis* V583. *BMC genomics*, 12, 135. doi:10.1186/1471-2164-12-135
- Bonifait, L., & Grenier, D. (2011). The SspA subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* triggers a pro-inflammatory response in macrophages through a non-proteolytic mechanism. *BMC microbiology*, 11, 47. doi:10.1186/1471-2180-11-47
- Brassard, J., Gottschalk, M., & Quessy, S. (2004). Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. *Veterinary microbiology*, 102(1-2), 87–94. doi:10.1016/j.vetmic.2004.05.008
- Brewer, J. M. (2006). (How) do aluminium adjuvants work? *Immunology letters*, 102(1), 10–5. doi:10.1016/j.imlet.2005.08.002
- Busque, P., Higgins, R., Caya, F., & Quessy, S. (1997). Immunization of pigs against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a live avirulent strain. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, 61(4), 275–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1189421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Büttner, N., Beineke, A., De Buhr, N., Lilienthal, S., Merkel, J., Waldmann, K.-H., Valentin-Weigand, P., et al. (2012). Streptococcus suis serotype 9 bacterin immunogenicity and protective efficacy. *Veterinary immunology and immunopathology*, 146(3-4), 191–200. doi:10.1016/j.vetimm.2012.03.012
- Chabot-Roy, G., Willson, P., Segura, M., Lacouture, S., & Gottschalk, M. (2006). Phagocytosis and killing of Streptococcus suis by porcine neutrophils. *Microbial pathogenesis*, 41(1), 21–32. doi:10.1016/j.micpath.2006.04.001
- Charland, N., Harel, J., Kobisch, M., Lacasse, S., & Gottschalk, M. (1998). Streptococcus suis serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology (Reading, England)*, 144 (Pt 2, 325–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9493370>
- Charland, N., Kobisch, M., Martineau-Doizé, B., Jacques, M., & Gottschalk, M. (1996). Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of Streptococcus suis capsular type 2. *FEMS immunology and medical microbiology*, 14(4), 195–203. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8856318>
- Chen, B., Zhang, A., Li, R., Mu, X., He, H., Chen, H., & Jin, M. (2010). Evaluation of the protective efficacy of a newly identified immunogenic protein, HP0272, of Streptococcus suis. *FEMS microbiology letters*, 307(1), 12–8. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01944.x
- Chen, L., Song, Y., Wei, Z., He, H., Zhang, A., & Jin, M. (2013). Antimicrobial susceptibility, tetracycline and erythromycin resistance genes, and multilocus sequence typing of streptococcus suis isolates from diseased pigs in China. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 75(5), 583–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23292102>
- Cloutier, G., D'Allaire, S., Martinez, G., Surprenant, C., Lacouture, S., & Gottschalk, M. (2003). Epidemiology of Streptococcus suis serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Veterinary microbiology*, 97(1-2), 135–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14637045>
- Coffman, R. L., Sher, A., & Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*, 33(4), 492–503. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.002
- Cordwell, S. J. (2006). Technologies for bacterial surface proteomics. *Current opinion in microbiology*, 9(3), 320–9. doi:10.1016/j.mib.2006.04.008
- De Greeff, A., Buys, H., Verhaar, R., Dijkstra, J., Van Alphen, L., & Smith, H. E. (2002). Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of Streptococcus suis serotype 2. *Infection and immunity*, 70(3), 1319–25. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=127759&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- De Greeff, A., Wisselink, H. J., De Bree, F. M., Schultsz, C., Baums, C. G., Thi, H. N., Stockhofe-Zurwieden, N., et al. (2011). Genetic diversity of Streptococcus suis isolates as determined by comparative genome hybridization. *BMC microbiology*, 11, 161. doi:10.1186/1471-2180-11-161

- Dekker, C. N. T., Bouma, A., Daemen, A. J. J. M., Van Leengoed, L. A. M. G., Jonker, F. H., Wagenaar, J. A., & Stegeman, J. A. (2012). Homologous whole bacterin vaccination is not able to reduce *Streptococcus suis* serotype 9 strain 7997 transmission among pigs or colonization. *Vaccine*, 30(7), 1379–87. doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.035
- Delisle, B., Calinescu, C., Mateescu, M. A., Fairbrother, J. M., & Nadeau, É. (2012). Oral immunization with F4 fimbriae and CpG formulated with carboxymethyl starch enhances F4-specific mucosal immune response and modulates Th1 and Th2 cytokines in weaned pigs. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques, 15(5), 642–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23331903>
- Dominguez-Punaro, M C, Koedel, U., Hoegen, T., Demel, C., Klein, M., & Gottschalk, M. (2012). Severe cochlear inflammation and vestibular syndrome in an experimental model of *Streptococcus suis* infection in mice. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*: official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 31(9), 2391–400. doi:10.1007/s10096-012-1581-2
- Dominguez-Punaro, M. de la C., Segura, M., Radzioch, D., Rivest, S., & Gottschalk, M. (2008). Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *Infection and immunity*, 76(9), 3901–10. doi:10.1128/IAI.00350-08
- Dominguez-Punaro, María C, Segura, M., Plante, M.-M., Lacouture, S., Rivest, S., & Gottschalk, M. (2007). *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 179(3), 1842–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641051>
- Doro, F., Liberatori, S., Rodríguez-Ortega, M. J., Rinaudo, C. D., Rosini, R., Mora, M., Scarselli, M., et al. (2009). Surfome analysis as a fast track to vaccine discovery: identification of a novel protective antigen for Group B *Streptococcus* hypervirulent strain COH1. *Molecular & cellular proteomics*: MCP, 8(7), 1728–37. doi:10.1074/mcp.M800486-MCP200
- Dreisbach, A., Hempel, K., Buist, G., Hecker, M., Becher, D., & Van Dijl, J. M. (2010). Profiling the surfacome of *Staphylococcus aureus*. *Proteomics*, 10(17), 3082–96. doi:10.1002/pmic.201000062
- Du, H., Huang, W., Xie, H., Ye, C., Jing, H., Ren, Z., & Xu, J. (2013). The genetically modified suilysin, rSLY(P353L), provides a candidate vaccine that suppresses proinflammatory response and reduces fatality following infection with *Streptococcus suis*. *Vaccine*, 31(38), 4209–15. doi:10.1016/j.vaccine.2013.07.004
- Escudero, J. A., San Millan, A., Gutierrez, B., Hidalgo, L., La Ragione, R. M., AbuOun, M., Galimand, M., et al. (2011). Fluoroquinolone efflux in *Streptococcus suis* is mediated by SatAB and not by SmrA. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(12), 5850–60. doi:10.1128/AAC.00498-11
- Esgleas, M., Dominguez-Punaro, M. de la C., Li, Y., Harel, J., Dubreuil, J. D., & Gottschalk, M. (2009). Immunization with SsEno fails to protect mice against challenge with

- Streptococcus suis* serotype 2. FEMS microbiology letters, 294(1), 82–8. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01551.x
- Esgleas, M., Lacouture, S., & Gottschalk, M. (2005). *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. FEMS microbiology letters, 244(1), 33–40. doi:10.1016/j.femsle.2005.01.017
- Esgleas, M., Li, Y., Hancock, M. A., Harel, J., Dubreuil, J. D., & Gottschalk, M. (2008). Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. Microbiology (Reading, England), 154(Pt 9), 2668–79. doi:10.1099/mic.0.2008/017145-0
- Feng, Y., Cao, M., Shi, J., Zhang, H., Hu, D., Zhu, J., Zhang, X., et al. (2012). Attenuation of *Streptococcus suis* virulence by the alteration of bacterial surface architecture. Scientific reports, 2, 710. doi:10.1038/srep00710
- Feng, Y., Zhang, H., Ma, Y., & Gao, G. F. (2010). Uncovering newly emerging variants of *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent. Trends in microbiology, 18(3), 124–31. doi:10.1016/j.tim.2009.12.003
- Ferrando, M. L., Fuentes, S., De Greeff, A., Smith, H., & Wells, J. M. (2010). ApuA, a multifunctional alpha-glucan-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, mediates adhesion to porcine epithelium and mucus. Microbiology (Reading, England), 156(Pt 9), 2818–28. doi:10.1099/mic.0.037960-0
- Fittipaldi, N., Fuller, T. E., Teel, J. F., Wilson, T. L., Wolfram, T. J., Lowery, D. E., & Gottschalk, M. (2009). Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and sulysin by field strains of *Streptococcus suis* isolated in the United States. Veterinary microbiology, 139(3-4), 310–7. doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.024
- 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, 7(2), 259–79. doi:10.2217/fmb.11.149
- Fittipaldi, N., Sekizaki, T., Takamatsu, D., De la Cruz Domínguez-Punaro, M., Harel, J., Bui, N. K., Vollmer, W., et al. (2008). Significant contribution of the *pgdA* gene to the virulence of *Streptococcus suis*. Molecular microbiology, 70(5), 1120–35. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06463.x
- Fittipaldi, N., Sekizaki, T., Takamatsu, D., Harel, J., Domínguez-Punaro, M. de la C., Von Aulock, S., Draing, C., et al. (2008). D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. Infection and immunity, 76(8), 3587–94. doi:10.1128/IAI.01568-07
- Fittipaldi, N., Xu, J., Lacouture, S., Tharavichitkul, P., Osaki, M., Sekizaki, T., Takamatsu, D., et al. (2011). Lineage and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from North America. Emerging infectious diseases, 17(12), 2239–44. doi:10.3201/eid1712.110609
- Fontaine, M. C., Perez-Casal, J., & Willson, P. J. (2004). Investigation of a novel DNase of *Streptococcus suis* serotype 2. Infection and immunity, 72(2), 774–81. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=321577&tool=pmcentrez&endertype=abstract>

- Fu, F., Lang, Y., Li, X., Chai, Z., Tong, G., Liu, S., Tian, H., et al. (2013). Evaluation of the enhancing ability of three adjuvants for DNA vaccination using the porcine circovirus type 2 ORF2 (capsid) gene in mice. *Virus research*, 171(1), 247–51. doi:10.1016/j.virusres.2012.10.029
- Garibaldi, M., Rodríguez-Ortega, M. J., Mandanici, F., Cardaci, A., Midiri, A., Papasergi, S., Gambadoro, O., et al. (2010). Immunoprotective activities of a *Streptococcus suis* pilus subunit in murine models of infection. *Vaccine*, 28(20), 3609–16. doi:10.1016/j.vaccine.2010.01.009
- Ge, J., Feng, Y., Ji, H., Zhang, H., Zheng, F., Wang, C., Yin, Z., et al. (2009). Inactivation of dipeptidyl peptidase IV attenuates the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 that causes streptococcal toxic shock syndrome. *Current microbiology*, 59(3), 248–55. doi:10.1007/s00284-009-9425-8
- Geng, H., Zhu, L., Yuan, Y., Zhang, W., Li, W., Wang, J., Zheng, Y., et al. (2008). Identification and characterization of novel immunogenic proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *Journal of proteome research*, 7(9), 4132–42. doi:10.1021/pr800196v
- Gianfaldoni, C., Censini, S., Hilleringmann, M., Moschioni, M., Facciotti, C., Pansegrau, W., Masignani, V., et al. (2007). *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge. *Infection and immunity*, 75(2), 1059–62. doi:10.1128/IAI.01400-06
- Gómez-Gascón, L., Luque, I., Olaya-Abril, A., Jiménez-Munguía, I., Orbegozo-Medina, R. A., Peralbo, E., Tarradas, C., et al. (2012). Exploring the pan-surfome of *Streptococcus suis*: looking for common protein antigens. *Journal of proteomics*, 75(18), 5654–66. doi:10.1016/j.jprot.2012.07.025
- Gottschalk, M., & Segura, M. (2000). The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Veterinary microbiology*, 76(3), 259–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973700>
- Gottschalk, Marcelo, Xu, J., Calzas, C., & Segura, M. (2010). *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future microbiology*, 5(3), 371–91. doi:10.2217/fmb.10.2
- Grandi, G. (2001). Antibacterial vaccine design using genomics and proteomics. *Trends in biotechnology*, 19(5), 181–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301131>
- Grandi, Guido. (2006). Genomics and proteomics in reverse vaccines. *Methods of biochemical analysis*, 49, 379–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16929688>
- Graveline, R., Segura, M., Radzioch, D., & Gottschalk, M. (2007). TLR2-dependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness. *International immunology*, 19(4), 375–89. doi:10.1093/intimm/dxm003

- Grenier, D., & Bodet, C. (2008). Streptococcus suis stimulates ICAM-1 shedding from microvascular endothelial cells. *FEMS immunology and medical microbiology*, 54(2), 271–6. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00476.x
- Grenier, D., Grignon, L., & Gottschalk, M. (2009). Characterisation of biofilm formation by a Streptococcus suis meningitis isolate. *Veterinary journal (London, England)*: 1997, 179(2), 292–5. doi:10.1016/j.tvjl.2007.09.005
- Gupta, R. (1998). Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Advanced drug delivery reviews*, 32(3), 155–172. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837642>
- Hendriksen, R. S., Mevius, D. J., Schroeter, A., Teale, C., Jouy, E., Butaye, P., Franco, A., et al. (2008). Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002 - 2004: the ARBAO-II study. *Acta veterinaria Scandinavica*, 50, 19. doi:10.1186/1751-0147-50-19
- 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), 249–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2094457>
- Hill, J. E., Gottschalk, M., Brousseau, R., Harel, J., Hemmingsen, S. M., & Goh, S. H. (2005). Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that Streptococcus suis serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are Streptococcus orisratti. *Veterinary microbiology*, 107(1-2), 63–9. doi:10.1016/j.vetmic.2005.01.003
- Hoa, N. T., Chieu, T. T. B., Nghia, H. D. T., Mai, N. T. H., Anh, P. H., Wolbers, M., Baker, S., et al. (2011). The antimicrobial resistance patterns and associated determinants in Streptococcus suis isolated from humans in southern Vietnam, 1997-2008. *BMC infectious diseases*, 11, 6. doi:10.1186/1471-2334-11-6
- Hogenesch, H. (2012). Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. *Frontiers in immunology*, 3, 406. doi:10.3389/fimmu.2012.00406
- Hogenesch, H., Dunham, A., Hansen, B., Anderson, K., Maisonneuve, J.-F., & Hem, S. L. (2011). Formulation of a killed whole cell pneumococcus vaccine - effect of aluminum adjuvants on the antibody and IL-17 response. *Journal of immune based therapies and vaccines*, 9, 5. doi:10.1186/1476-8518-9-5
- Holt, M. E., Enright, M. R., & Alexander, T. J. (1988). Immunisation of pigs with live cultures of Streptococcus suis type 2. *Research in veterinary science*, 45(3), 349–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3212282>
- Jacobs, A. A., Loeffen, P. L., Van den Berg, A. J., & Storm, P. K. (1994). Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of Streptococcus suis. *Infection and immunity*, 62(5), 1742–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=186398&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jacobs, A. A., Van den Berg, A. J., & Loeffen, P. L. (1996). Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of Streptococcus suis. *The*

- Veterinary record, 139(10), 225–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8883345>
- Jing, H.-B., Yuan, J., Wang, J., Yuan, Y., Zhu, L., Liu, X.-K., Zheng, Y.-L., et al. (2008). Proteome analysis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Proteomics*, 8(2), 333–49. doi:10.1002/pmic.200600930
- Jobin, M.-C., Brassard, J., Quessy, S., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2004). Acquisition of host plasmin activity by the Swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and immunity*, 72(1), 606–10. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=343993&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Jobin, M.-C., Fortin, J., Willson, P. J., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2005). Acquisition of plasmin activity and induction of arachidonic acid release by *Streptococcus suis* in contact with human brain microvascular endothelial cells. *FEMS microbiology letters*, 252(1), 105–11. doi:10.1016/j.femsle.2005.08.044
- Jobin, M.-C., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2006). Upregulation of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase 9 production by human macrophage-like cells: synergistic effect of capsular material and cell wall from *Streptococcus suis*. *Microbial pathogenesis*, 40(1), 29–34. doi:10.1016/j.micpath.2005.10.003
- Juncker, A. S., Willenbrock, H., Von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H., & Krogh, A. (2003). Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein science*: a publication of the Protein Society, 12(8), 1652–62. doi:10.1110/ps.0303703
- Kataoka, Y., Haritani, M., Mori, M., Kishima, M., Sugimoto, C., Nakazawa, M., & Yamamoto, K. (1991). Experimental infections of mice and pigs with *Streptococcus suis* type 2. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 53(6), 1043–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1790214>
- Kim, K. S. (2006). Microbial translocation of the blood-brain barrier. *International journal for parasitology*, 36(5), 607–14. doi:10.1016/j.ijpara.2006.01.013
- King, S. J., Leigh, J. A., Heath, P. J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C. G., & Whatmore, A. M. (2002). Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *Journal of clinical microbiology*, 40(10), 3671–80. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=130843&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Kock, C., Beineke, A., Seitz, M., Ganter, M., Waldmann, K.-H., Valentin-Weigand, P., & Baums, C. G. (2009). Intranasal immunization with a live *Streptococcus suis* isogenic of mutant elicited suilysin-neutralization titers but failed to induce opsonizing antibodies and protection. *Veterinary immunology and immunopathology*, 132(2-4), 135–45. doi:10.1016/j.vetimm.2009.05.009
- Krejci, J., Nechvatalova, K., Kudlackova, H., Leva, L., Bernardy, J., Toman, M., & Faldyna, M. (2013). Effects of adjuvants on the immune response of pigs after intradermal administration of antigen. *Research in veterinary science*, 94(1), 73–6. doi:10.1016/j.rvsc.2012.07.021

- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, 305(3), 567–80. doi:10.1006/jmbi.2000.4315
- Langford, P., Williams, A. E., & Kroll, J. S. (1991). Superoxide dismutases of pathogenic and non-pathogenic *Streptococcus suis* type 2 isolates. *FEMS microbiology letters*, 61(2-3), 347–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2037239>
- Lecours, M.-P., Gottschalk, M., Houde, M., Lemire, P., Fittipaldi, N., & Segura, M. (2011). Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and sullysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *The Journal of infectious diseases*, 204(6), 919–29. doi:10.1093/infdis/jir415
- Lecours, M.-P., Segura, M., Lachance, C., Mussa, T., Surprenant, C., Montoya, M., & Gottschalk, M. (n.d.). Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Veterinary research*, 42(1), 72. doi:10.1186/1297-9716-42-72
- Lee, N.-H., Lee, J.-A., Park, S.-Y., Song, C.-S., Choi, I.-S., & Lee, J.-B. (2012). A review of vaccine development and research for industry animals in Korea. *Clinical and experimental vaccine research*, 1(1), 18–34. doi:10.7774/cevr.2012.1.1.18
- Li, J., Xia, J., Tan, C., Zhou, Y., Wang, Y., Zheng, C., Chen, H., et al. (2011). Evaluation of the immunogenicity and the protective efficacy of a novel identified immunogenic protein, SsPepO, of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine*, 29(38), 6514–9. doi:10.1016/j.vaccine.2011.07.010
- Li, W., Hu, X., Liu, L., Chen, H., & Zhou, R. (2011). Induction of protective immune response against *Streptococcus suis* serotype 2 infection by the surface antigen HP0245. *FEMS microbiology letters*, 316(2), 115–22. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02200.x
- Li, Y., Gottschalk, M., Esgleas, M., Lacouture, S., Dubreuil, J. D., Willson, P., & Harel, J. (2007). Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clinical and vaccine immunology*: CVI, 14(8), 937–43. doi:10.1128/CVI.00046-07
- Li, Y., Martinez, G., Gottschalk, M., Lacouture, S., Willson, P., Dubreuil, J. D., Jacques, M., et al. (2006). Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infection and immunity*, 74(1), 305–12. doi:10.1128/IAI.74.1.305-312.2006
- Lin, H.-T., Chuang, C.-C., Wu, H.-L., Chu, D.-M., & Wang, Y.-C. (2013). Characterization of cross protection of Swine-Origin Influenza Virus (S-OIV) H1N1 and reassortant H5N1 influenza vaccine in BALB/c mice given a single-dose vaccination. *Journal of biomedical science*, 20, 19. doi:10.1186/1423-0127-20-19
- Liu, L., Cheng, G., Wang, C., Pan, X., Cong, Y., Pan, Q., Wang, J., et al. (2009). Identification and experimental verification of protective antigens against *Streptococcus suis* serotype 2 based on genome sequence analysis. *Current microbiology*, 58(1), 11–7. doi:10.1007/s00284-008-9258-x

- Lu, Y.-J., Gross, J., Bogaert, D., Finn, A., Bagrade, L., Zhang, Q., Kolls, J. K., et al. (2008). Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS pathogens*, 4(9), e1000159. doi:10.1371/journal.ppat.1000159
- Lun, Z.-R., Wang, Q.-P., Chen, X.-G., Li, A.-X., & Zhu, X.-Q. (2007). *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *The Lancet infectious diseases*, 7(3), 201–9. doi:10.1016/S1473-3099(07)70001-4
- 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* (London, England): 1997), 186(3), 396–8. doi:10.1016/j.tvjl.2009.09.005
- Madsen, L. W., Bak, H., Nielsen, B., Jensen, H. E., Aalbaek, B., & Riising, H. J. (2002). Bacterial colonization and invasion in pigs experimentally exposed to *Streptococcus suis* serotype 2 in aerosol. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 49(5), 211–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121040>
- Mandanici, F., Gómez-Gascón, L., Garibaldi, M., Olaya-Abril, A., Luque, I., Tarradas, C., Mancuso, G., et al. (2010). A surface protein of *Streptococcus suis* serotype 2 identified by proteomics protects mice against infection. *Journal of proteomics*, 73(12), 2365–9. doi:10.1016/j.jprot.2010.07.009
- Marois, C., Le Devendec, L., Gottschalk, M., & Kobisch, M. (2006). Molecular characterization of *Streptococcus suis* strains by 16S-23S intergenic spacer polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, 70(2), 94–104. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1410728&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Nakayama, T., Takeuchi, D., Akeda, Y., & Oishi, K. (2011). *Streptococcus suis* infection induces [corrected] bacterial accumulation in the kidney. *Microbial pathogenesis*, 50(2), 87–93. doi:10.1016/j.micpath.2010.11.005
- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and molecular biology reviews*: MMBR, 63(1), 174–229. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98962&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Nghia, H. D. T., Ho, D. T. N., Tu, L. T. P., Le, T. P. T., Wolbers, M., Thai, C. Q., Cao, Q. T., et al. (2011). Risk factors of *Streptococcus suis* infection in Vietnam. A case-control study. *PloS one*, 6(3), e17604. doi:10.1371/journal.pone.0017604
- Olaya-Abril, A., Gómez-Gascón, L., Jiménez-Munguía, I., Obando, I., & Rodríguez-Ortega, M. J. (2012). Another turn of the screw in shaving Gram-positive bacteria: Optimization of proteomics surface protein identification in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of proteomics*, 75(12), 3733–46. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.037

- Pallarés, F. J., Schmitt, C. S., Roth, J. A., Evans, R. B., Kinyon, J. M., & Halbur, P. G. (2004). Evaluation of a ceftiofur-washed whole cell *Streptococcus suis* bacterin in pigs. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, 68(3), 236–40. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1142148&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Palmieri, C., Varaldo, P. E., & Facinelli, B. (2011). *Streptococcus suis*, an Emerging Drug-Resistant Animal and Human Pathogen. *Frontiers in microbiology*, 2, 235. doi:10.3389/fmicb.2011.00235
- Pian, Y., Gan, S., Wang, S., Guo, J., Wang, P., Zheng, Y., Cai, X., et al. (2012). Fhb, a novel factor H-binding surface protein, contributes to the antiphagocytic ability and virulence of *Streptococcus suis*. *Infection and immunity*, 80(7), 2402–13. doi:10.1128/IAI.06294-11
- Principalli, M. S., Palmieri, C., Magi, G., Vignaroli, C., Manzin, A., Camporese, A., Barocci, S., et al. (2009). Genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs and humans in Italy (2003-2007). *Euro surveillance*: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin, 14(33). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712640>
- Råberg, L., Sim, D., & Read, A. F. (2007). Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5851), 812–4. doi:10.1126/science.1148526
- Rankin, R., Pontarollo, R., Gomis, S., Karvonen, B., Willson, P., Loehr, B. I., Godson, D. L., et al. (2002). CpG-containing oligodeoxynucleotides augment and switch the immune responses of cattle to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D. *Vaccine*, 20(23-24), 3014–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12126915>
- Rodríguez-Ortega, M. J., Luque, I., Tarradas, C., & Bárcena, J. A. (2008). Overcoming function annotation errors in the Gram-positive pathogen *Streptococcus suis* by a proteomics-driven approach. *BMC genomics*, 9, 588. doi:10.1186/1471-2164-9-588
- Rodríguez-Ortega, M. J., Norais, N., Bensi, G., Liberatori, S., Capo, S., Mora, M., Scarselli, M., et al. (2006). Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. *Nature biotechnology*, 24(2), 191–7. doi:10.1038/nbt1179
- Rubin, L. L., & Staddon, J. M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annual review of neuroscience*, 22, 11–28. doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.11
- Salles, M. W. S., Perez-Casal, J., Willson, P., & Middleton, D. M. (2002). Changes in the leucocyte subpopulations of the palatine tonsillar crypt epithelium of pigs in response to *Streptococcus suis* type 2 infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, 87(1-2), 51–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052342>
- Scheld, W. M., Koedel, U., Nathan, B., & Pfister, H.-W. (2002). Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury. *The Journal of infectious diseases*, 186 Suppl , S225–33. doi:10.1086/344939

- Seele, J., Singpiel, A., Spoerry, C., Von Pawel-Rammingen, U., Valentin-Weigand, P., & Baums, C. G. (2013). Identification of a novel host-specific IgM protease in *Streptococcus suis*. *Journal of bacteriology*, 195(5), 930–40. doi:10.1128/JB.01875-12
- Segura, M, Stankova, J., & Gottschalk, M. (1999). Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infection and immunity*, 67(9), 4646–54. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=96789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Segura, M, Vadeboncoeur, N., & Gottschalk, M. (2002). CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clinical and experimental immunology*, 127(2), 243–54. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1906344&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Segura, Mariela, Gottschalk, M., & Olivier, M. (2004). Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infection and immunity*, 72(9), 5322–30. doi:10.1128/IAI.72.9.5322-5330.2004
- Segura, Mariela, Vanier, G., Al-Numani, D., Lacouture, S., Olivier, M., & Gottschalk, M. (2006). Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. *FEMS immunology and medical microbiology*, 47(1), 92–106. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00067.x
- Seitz, M., Beineke, A., Seele, J., Fulde, M., Valentin-Weigand, P., & Baums, C. G. (2012). A novel intranasal mouse model for mucosal colonization by *Streptococcus suis* serotype 2. *Journal of medical microbiology*, 61(Pt 9), 1311–8. doi:10.1099/jmm.0.043885-0
- Serre, K., Mohr, E., Bénézech, C., Bird, R., Khan, M., Caamaño, J. H., Cunningham, A. F., et al. (2011). Selective effects of NF- κ B1 deficiency in CD4⁺ T cells on Th2 and TFh induction by alum-precipitated protein vaccines. *European Journal of Immunology*, 41(6), 1573–1582. doi:10.1002/eji.201041126
- Shao, Z., Pan, X., Li, X., Liu, W., Han, M., Wang, C., Wang, J., et al. (2011). HtpS, a novel immunogenic cell surface-exposed protein of *Streptococcus suis*, confers protection in mice. *FEMS microbiology letters*, 314(2), 174–82. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02162.x
- Shao, Z.-Q., Zhang, Y.-M., Pan, X.-Z., Wang, B., & Chen, J.-Q. (2013). Insight into the evolution of the histidine triad protein (HTP) family in *Streptococcus*. *PLoS one*, 8(3), e60116. doi:10.1371/journal.pone.0060116
- Si, Y., Yuan, F., Chang, H., Liu, X., Li, H., Cai, K., Xu, Z., et al. (2009). Contribution of glutamine synthetase to the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Veterinary microbiology*, 139(1-2), 80–8. doi:10.1016/j.vetmic.2009.04.024
- Singh, M., & O'Hagan, D. T. (2003). Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International journal for parasitology*, 33(5-6), 469–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12782048>

- Smith, H. E., Damman, M., Van der Velde, J., Wagenaar, F., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N., & Smits, M. A. (1999). Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infection and immunity*, 67(4), 1750–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=96524&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Staats, J. J., Feder, I., Okwumabua, O., & Chengappa, M. M. (1997). *Streptococcus suis*: past and present. *Veterinary research communications*, 21(6), 381–407. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9266659>
- Tan, C., Fu, S., Liu, M., Jin, M., Liu, J., Bei, W., & Chen, H. (2008). Cloning, expression and characterization of a cell wall surface protein, 6-phosphogluconate-dehydrogenase, of *Streptococcus suis* serotype 2. *Veterinary microbiology*, 130(3-4), 363–70. doi:10.1016/j.vetmic.2008.02.025
- Tan, C., Liu, M., Jin, M., Liu, J., Chen, Y., Wu, T., Fu, T., et al. (2008). The key virulence-associated genes of *Streptococcus suis* type 2 are upregulated and differentially expressed in vivo. *FEMS microbiology letters*, 278(1), 108–14. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00980.x
- Tan, C., Liu, M., Liu, J., Yuan, F., Fu, S., Liu, Y., Jin, M., et al. (2009). Vaccination with *Streptococcus suis* serotype 2 recombinant 6PGD protein provides protection against *S. suis* infection in swine. *FEMS microbiology letters*, 296(1), 78–83. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01617.x
- Tanabe, S.-I., Bonifait, L., Fittipaldi, N., Grignon, L., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2010). Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of *Streptococcus suis*. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, 74(1), 65–70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2801315&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tang, J., Wang, C., Feng, Y., Yang, W., Song, H., Chen, Z., Yu, H., et al. (2006). Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS medicine*, 3(5), e151. doi:10.1371/journal.pmed.0030151
- Tarradas, C., Borge, C., Arenas, A., Maldonado, A., Astorga, R., Miranda, A., & Luque, I. (2001). Suilysin production by *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy carrier pigs in Spain. *The Veterinary record*, 148(6), 183–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11258725>
- Tarradas, C., Luque, I., De Andrés, D., Abdel-Aziz Shahein, Y. E., Pons, P., González, F., Borge, C., et al. (2001). Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis* isolates. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 48(5), 347–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11471845>
- Tarradas, C., Perea, A., Vela, A. I., Goyache, J., Dominguez, L., Fernández-Garaizabal, J. F., Borge, C., et al. (2004). Distribution of serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Spain. *The Veterinary record*, 154(21), 665–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15198317>

- Telford, J. L., Barocchi, M. A., Margarit, I., Rappuoli, R., & Grandi, G. (2006). Pili in gram-positive pathogens. *Nature reviews. Microbiology*, 4(7), 509–19. doi:10.1038/nrmicro1443
- Tenenbaum, T., Adam, R., Eggelnpöhler, I., Matalon, D., Seibt, A., K Novotny, G. E., Galla, H.-J., et al. (2005). Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis* in vitro. *FEMS immunology and medical microbiology*, 44(1), 25–34. doi:10.1016/j.femsim.2004.12.006
- Tenenbaum, T., Essmann, F., Adam, R., Seibt, A., Jänicke, R. U., Novotny, G. E. K., Galla, H.-J., et al. (2006). Cell death, caspase activation, and HMGB1 release of porcine choroid plexus epithelial cells during *Streptococcus suis* infection in vitro. *Brain research*, 1100(1), 1–12. doi:10.1016/j.brainres.2006.05.041
- Tenenbaum, T., Papandreou, T., Gellrich, D., Friedrichs, U., Seibt, A., Adam, R., Wewer, C., et al. (2009). Polar bacterial invasion and translocation of *Streptococcus suis* across the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. *Cellular microbiology*, 11(2), 323–36. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01255.x
- Tsiotou, A. G., Sakorafas, G. H., Anagnostopoulos, G., & Bramis, J. (2005). Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Medical science monitor*: international medical journal of experimental and clinical research, 11(3), RA76–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15735579>
- Valentin-Weigand, P. (n.d.). Intracellular invasion and persistence: survival strategies of *Streptococcus suis* and *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 117(11-12), 459–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15584427>
- Van Calsteren, M.-R., Gagnon, F., Lacouture, S., Fittipaldi, N., & Gottschalk, M. (2010). Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 88(3), 513–25. doi:10.1139/o09-170
- Van de Rijn, I., & Kessler, R. E. (1980). Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. *Infection and immunity*, 27(2), 444–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=550785&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Vanier, G., Sekizaki, T., Domínguez-Punaro, M. C., Esgleas, M., Osaki, M., Takamatsu, D., Segura, M., et al. (2008). Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins. *Veterinary microbiology*, 127(3-4), 417–24. doi:10.1016/j.vetmic.2007.08.032
- Vanier, Ghyslaine, Segura, M., Friedl, P., Lacouture, S., & Gottschalk, M. (2004). Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and immunity*, 72(3), 1441–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=356020&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Vanier, Ghyslaine, Segura, M., & Gottschalk, M. (2007). Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Canadian journal of*

- veterinary research = *Revue canadienne de recherche vétérinaire*, 71(2), 81–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1829181&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Vanier, Ghyslaine, Segura, M., Lecours, M.-P., Grenier, D., & Gottschalk, M. (2009). Porcine brain microvascular endothelial cell-derived interleukin-8 is first induced and then degraded by *Streptococcus suis*. *Microbial pathogenesis*, 46(3), 135–43. doi:10.1016/j.micpath.2008.11.004
- Vecht, U., Stockhofe-Zurwieden, N., Tetenburg, B. J., Wisselink, H. J., & Smith, H. E. (1997). Virulence of *Streptococcus suis* type 2 for mice and pigs appeared host-specific. *Veterinary microbiology*, 58(1), 53–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9451461>
- Vecht, U., Wisselink, H. J., Jellema, M. L., & Smith, H. E. (1991). Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infection and immunity*, 59(9), 3156–62. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=258147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Vela, A. I., Goyache, J., Tarradas, C., Luque, I., Mateos, A., Moreno, M. A., Borge, C., et al. (2003). Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of clinical microbiology*, 41(6), 2498–502. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=156542&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ventura, C. L., Malachowa, N., Hammer, C. H., Nardone, G. A., Robinson, M. A., Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2010). Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PloS one*, 5(7), e11634. doi:10.1371/journal.pone.0011634
- Wang, K., & Lu, C. (n.d.). Adhesion activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a Chinese *Streptococcus suis* type 2 strain. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 120(5-6), 207–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17555040>
- Wang, Y.-P., Liu, D., Guo, L.-J., Tang, Q.-H., Wei, Y.-W., Wu, H.-L., Liu, J.-B., et al. (2013). Enhanced protective immune response to PCV2 subunit vaccine by co-administration of recombinant porcine IFN- γ in mice. *Vaccine*, 31(5), 833–8. doi:10.1016/j.vaccine.2012.11.062
- Wang, Yang, Zhang, W., Wu, Z., & Lu, C. (2011). Reduced virulence is an important characteristic of biofilm infection of *Streptococcus suis*. *FEMS microbiology letters*, 316(1), 36–43. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02189.x
- Wang, Yingchao, Dang, Y., Wang, X., Lu, H., Wang, X., Lang, X., Li, X., et al. (2011). Comparative proteomic analyses of *Streptococcus suis* serotype 2 cell wall-associated proteins. *Current microbiology*, 62(2), 578–88. doi:10.1007/s00284-010-9747-6

- Wartha, F., Beiter, K., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2007). Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Current opinion in microbiology*, 10(1), 52–6. doi:10.1016/j.mib.2006.12.005
- Wichgers Schreur, P. J., Rebel, J. M. J., Smits, M. A., Van Putten, J. P. M., & Smith, H. E. (2011). Lgt processing is an essential step in *Streptococcus suis* lipoprotein mediated innate immune activation. *PloS one*, 6(7), e22299. doi:10.1371/journal.pone.0022299
- Williams, A. E., Blakemore, W. F., & Alexander, T. J. (1988). A murine model of *Streptococcus suis* type 2 meningitis in the pig. *Research in veterinary science*, 45(3), 394–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3212289>
- Wilson, S. M., Norton, P., Haverson, K., Leigh, J., & Bailey, M. (2007). Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and cells of the myeloid lineage in the palatine tonsil of the pig. *Veterinary immunology and immunopathology*, 117(1-2), 116–23. doi:10.1016/j.vetimm.2007.02.009
- Wisselink, H J, Smith, H. E., Stockhofe-Zurwieden, N., Peperkamp, K., & Vecht, U. (2000). Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Veterinary microbiology*, 74(3), 237–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10808092>
- Wisselink, H J, Vecht, U., Stockhofe-Zurwieden, N., & Smith, H. E. (2001). Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. *The Veterinary record*, 148(15), 473–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334073>
- Wisselink, Henk J, Veldman, K. T., Van den Eede, C., Salmon, S. A., & Mevius, D. J. (2006). Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licensed in veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, 113(1-2), 73–82. doi:10.1016/j.vetmic.2005.10.035
- Wu, Z., Zhang, W., & Lu, C. (2008a). Immunoproteomic assay of surface proteins of *Streptococcus suis* serotype 9. *FEMS immunology and medical microbiology*, 53(1), 52–9. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00401.x
- Wu, Z., Zhang, W., & Lu, C. (2008b). Comparative proteome analysis of secreted proteins of *Streptococcus suis* serotype 9 isolates from diseased and healthy pigs. *Microbial pathogenesis*, 45(3), 159–66. doi:10.1016/j.micpath.2008.04.009
- Zagursky, R. J., & Anderson, A. S. (2008). Application of genomics in bacterial vaccine discovery: a decade in review. *Current opinion in pharmacology*, 8(5), 632–8. doi:10.1016/j.coph.2008.06.009
- Zhang, A., Chen, B., Li, R., Mu, X., Han, L., Zhou, H., Chen, H., et al. (2009). Identification of a surface protective antigen, HP0197 of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine*, 27(38), 5209–13. doi:10.1016/j.vaccine.2009.06.074
- Zhang, A., Chen, B., Mu, X., Li, R., Zheng, P., Zhao, Y., Chen, H., et al. (2009). Identification and characterization of a novel protective antigen, Enolase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine*, 27(9), 1348–53. doi:10.1016/j.vaccine.2008.12.047

- Zhang, A., Mu, X., Chen, B., Han, L., Chen, H., & Jin, M. (2011). IgA1 protease contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Veterinary microbiology*, 148(2-4), 436–9. doi:10.1016/j.vetmic.2010.09.027
- Zhang, A., Mu, X., Chen, B., Liu, C., Han, L., Chen, H., & Jin, M. (2010). Identification and characterization of IgA1 protease from *Streptococcus suis*. *Veterinary microbiology*, 140(1-2), 171–5. doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.034
- Zhang, A., Xie, C., Chen, H., & Jin, M. (2008). Identification of immunogenic cell wall-associated proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *Proteomics*, 8(17), 3506–15. doi:10.1002/pmic.200800007
- 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, 523. doi:10.1186/1471-2164-12-523
- Zhang, C., Ning, Y., Zhang, Z., Song, L., Qiu, H., & Gao, H. (2008). In vitro antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from clinically healthy sows in China. *Veterinary microbiology*, 131(3-4), 386–92. doi:10.1016/j.vetmic.2008.04.005
- Zhang, H., Ma, Z., Li, Y., Zheng, J., Yi, L., Fan, H., & Lu, C. (2013). Identification of a novel collagen type I-binding protein from *Streptococcus suis* serotype 2. *Veterinary journal* (London, England □: 1997), 197(2), 406–14. doi:10.1016/j.tvjl.2013.01.030
- Zhang, W., & Lu, C. P. (2007). Immunoproteomic assay of membrane-associated proteins of *Streptococcus suis* type 2 China vaccine strain HA9801. *Zoonoses and public health*, 54(6-7), 253–9. doi:10.1111/j.1863-2378.2007.01056.x
- Zhang, Wei, & Lu, C. P. (2007). Immunoproteomics of extracellular proteins of Chinese virulent strains of *Streptococcus suis* type 2. *Proteomics*, 7(24), 4468–76. doi:10.1002/pmic.200700294
- Zheng, J.-X., Li, Y., Zhang, H., Fan, H.-J., & Lu, C.-P. (2013). Identification and Characterization of a Novel Hemolysis-Related Gene in *Streptococcus suis* Serotype 2. *PloS one*, 8(9), e74674. doi:10.1371/journal.pone.0074674
- Zhou, M., Boekhorst, J., Francke, C., & Siezen, R. J. (2008). LocateP: genome-scale subcellular-location predictor for bacterial proteins. *BMC bioinformatics*, 9, 173. doi:10.1186/1471-2105-9-173

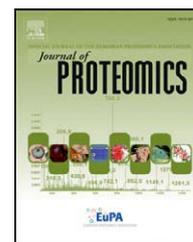
CAPÍTULO 12. ANEXOS



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Exploring the pan-surfome of *Streptococcus suis*: Looking for common protein antigens

Lidia Gómez-Gascón^{a, b}, Inmaculada Luque^b, Alfonso Olaya-Abril^a, Irene Jiménez-Munguía^a, Ricardo A. Orbegozo-Medina^a, Esther Peralbo^c, Carmen Tarradas^b, Manuel J. Rodríguez-Ortega^{a, *}

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba; Campus de Excelencia Internacional CeIA3; and Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Córdoba, Spain

^bDepartamento de Sanidad Animal, Universidad de Córdoba; Campus de Excelencia Internacional CeIA3, Córdoba, Spain

^cUnidad de Microscopía, Citómica e Imagen Científica, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2012

Accepted 16 July 2012

Available online 26 July 2012

Keywords:

Surfome

Vaccine

Surface antigens

Immunogenicity

Streptococcal infection

ABSTRACT

Streptococcus suis is a swine and human pathogen for which no commercial vaccine is still available. Conserved and broadly distributed surface proteins have become the chosen targets for the development of efficacious vaccines that could overcome the problems of non-heterologous protection of bacterins or capsule polysaccharide-based vaccines. In this work, we have analyzed by proteomics a collection of 39 strains obtained from infected pigs. The isolates belonged to 19 of the most prevalent serotypes during the last years. We have applied the “shaving” approach to define the “pan-surfome” or the set of both common and unique surface proteins identified in such strains. This set was constituted by 113 proteins. We have categorized them for their potential for further vaccination studies, based on their distribution among strains and their a priori accessibility to antibodies. According to these criteria, the cell-wall protein SsnA appears to be the best candidate from this list, as it was that with the widest distribution among the analyzed pathogen types, it showed to be highly immunogenic and highly accessible to antibodies, as demonstrated by flow cytometry.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Streptococcus suis is a major Gram-positive swine pathogen which is associated with a wide variety of diseases such as meningitis, arthritis, bronchopneumonia, endocarditis, serositis and septicaemia in pigs [1,2]. In addition to the substantial economical losses in the swine industry, it is also an important zoonotic agent for people in contact with diseased pigs or their products. Cases of *S. suis* infection in humans have been sporadically reported around the world, some of great

importance as two large outbreaks have taken place in China from 1998 to 2005 [1,3].

Based on the capsular polysaccharide, 33 serotypes of *S. suis* have been described. Serotype 2 (SS2) is considered the most prevalent type and is frequently isolated from diseased pigs [2,4,5]. However other serotypes have been associated to different clinical conditions in pigs, being serotypes 1 to 10 (except 6) and 14, 15, 16, ½ and 1/14 the most important [6–10], although their distribution could vary depending on the region and over time [5,6]. Especially important has become

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Edificio “Severo Ochoa” 1ª planta, Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain. Tel.: +34 957 218317; fax: +34 957 218592.

E-mail address: mjrodriguez@uco.es (M.J. Rodríguez-Ortega).

in the European countries the serotype 9. In previous works, we have demonstrated that in an endemically infected closed-cycle porcine farm, different serotypes are present, and they are maintained basically by adult animals, which have been responsible of clinical outbreaks throughout time [11].

Various approaches to developing an effective vaccine have been used. Whole-cell vaccines based on killed or attenuated strains have given unsatisfactory results [12–14]. Currently the focus has shifted toward proteins as vaccine candidates agents, mainly to surface proteins, with special attention to those anchored to the cell wall, as they are expressed in large quantities, are more exposed and thus more accessible to antibodies, compared to the other categories of surface-exposed proteins. Therefore, they have the best chances to raise a high and effective immune response [6,15,16].

Recently, several surface-exposed proteins of SS2 have been tested as vaccines, including Sao [17,18], a divalent cation lipoprotein [19,20], Sat [21], and an ancillary pilus protein [22]. These vaccines have shown to protect animals against homologous and heterologous serotype 2 strains but not against other pathogenic serotypes of *S. suis*. Actually, some researchers have focused on evaluating the protective efficacy of these vaccines against other serotypes of clinical importance. Baums et al., tried to evaluate the murein-associated proteins (MAP) cross-protection against serotypes 2 and 9, with partial success [23]. Therefore, it is necessary to identify novel vaccine antigens common to all or the majority of serotypes of *S. suis* for the development of a vaccine with broad coverage. Proteomics can contribute to this aim as numerous platforms and approaches are able to identify and characterize a large number of proteins per sample. In the field of vaccines against bacterial pathogens, the “shaving” approach consisting of protease treatment of live cells followed by LC/MS/MS analysis of the generated peptides has become a valuable technique to identify potentially immunoprotective surface proteins in a faster and more reliable way than other strategies [24–26].

The aim of this study was to identify a set of surface proteins common to the most prevalent serotypes of *S. suis* in Europe by applying the “shaving” approach, and to propose some new antigen(s) that can be used in further studies as a vaccine candidate. We have then defined the “pan-surfome”, i.e. the set of all the tryptically-digested surface proteins in a collection of clinical strains isolated from infected animals, and have categorized them according to their potential for further vaccination studies. We have also found a cell wall protein, SsnA, present in most of the serotypes and clinical isolates analyzed, which is highly immunogenic and accessible to antibodies. The work shows the utility of “pan-surfomics” in the lab-based screening of widely distributed protein vaccine candidates.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

Thirty-nine *S. suis* strains isolated of diseased pigs from Córdoba (Spain) and the Netherlands were used in this study

(Table S1). All strains, maintained at -80°C , were plated on Columbia agar blood base containing 6% (v/v) sheep blood and grown in chemically-defined medium (CDM) [27] at 37°C and 5% CO_2 until OD_{600} of 0.25 (mid-exponential phase) was reached.

2.2. Surface digestion of live cells

100 ml of bacteria from mid-exponential growth phase (corresponding approximately to 10^{10} cells at $\text{OD}_{600}=0.25$) was harvested by centrifugation at $3500\times g$ for 10 min at 4°C , and washed three times with PBS. Cells were resuspended in 0.8 ml of PBS/30% sucrose. Proteolytic reactions were carried out with trypsin (Promega) at $10\ \mu\text{g/ml}$, for 30 min at 37°C . The digestion mixtures were centrifuged at $3500\times g$ for 10 min at 4°C , and the supernatants (the “surfomes” containing the peptides) were filtered using $0.22\text{-}\mu\text{m}$ pore-size filters (Millipore). Surfomes were re-digested with $2\ \mu\text{g}$ trypsin overnight at 37°C with top-down agitation. Protease reactions were stopped by adding 0.1% formic acid. Salts were removed using Oasis HLB extraction cartridges (Waters). Peptides were eluted with increasing concentrations of acetonitrile/0.1% formic acid, according to manufacturer’s instructions. Peptide fractions were concentrated with a vacuum concentrator (Eppendorf), and kept at -20°C until further analysis.

2.3. LC/MS/MS analysis

All analyses were performed with a Surveyor HPLC System in tandem with an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) equipped with nanoelectrospray ionization interface (nESI). The separation column was $150\ \text{mm}\times 0.150\ \text{mm}$ ProteoPep2 C18 (New Objective, USA) at a postsplit flow rate of $1\ \mu\text{l/min}$. For trapping of the digest a $5\ \text{mm}\times 0.3\ \text{mm}$ precolumn Zorbax 300 SB-C18 (Agilent Technologies, Germany) was used. One fourth of the total sample volume, corresponding to $5\ \mu\text{l}$, was trapped at a flow rate of $10\ \mu\text{l/min}$ for 10 min and 5% acetonitrile/0.1% formic acid. After that, the trapping column was switched on-line with the separation column and the gradient was started. Peptides were eluted with a 60-min gradient of 5–40% of acetonitrile/0.1% formic acid solution at a $250\ \text{nl/min}$ flow rate. All separations were performed using a gradient of 5–40% solvent B for 60 min. MS data (Full Scan) were acquired in the positive ion mode over the 400–1500 m/z range. MS/MS data were acquired in dependent scan mode, selecting automatically the five most intense ions for fragmentation, with dynamic exclusion set to on. In all cases, a nESI spray voltage of 1.9 kV was used.

2.4. Database searching and protein identification

Search and identification of peptides were performed using in batch mode the raw MS/MS data with a licensed version of MASCOT v 2.1, in a non-redundant local database containing the 1825 proteins derived from the complete genome sequence of *S. suis* strain P1/7 (RefSeq NC_012925.1 downloaded from ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria/Streptococcus_suis_P1_7, NCBIInr version 20090707). The MASCOT search parameters were: (i) species, *S. suis* strain P1/7; (ii) allowed number

of missed cleavages, 3; (iii) variable post-translational modifications, methionine oxidation, and deamidation of asparagine and glutamine residues; (iv) peptide mass tolerance, ± 1 Da.; (v) fragment mass tolerance, ± 0.6 Da and (vi) peptide charge, from +1 to +4. All spectra corresponding to positive identifications or near the thresholds were manually inspected.

2.5. Bioinformatic analysis of protein sequences

Computational predictions of subcellular localization were carried out as described in [28]. Briefly, we used the web-based algorithm LocateP [29]. Feature-based algorithms were also used to contrast LocateP predictions: TMHMM 2.0 [30] for searching transmembrane helices; SignalP 3.0 [31] for type-I signal peptides: those proteins containing only a cleavable type-I signal peptide as featured sequence were classed as secreted; LipoP [32] for identifying type-II signal peptides, which are characteristic of lipoproteins. Topological representations of membrane proteins were performed with the web-based TOPO2 software (<http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/>).

2.6. Expression of recombinant proteins SsnA and OppA

We expressed a fragment of SsnA protein, encoded by ORF *ssu1760* in the sequenced strain P1/7, encompassing amino acids G36-L352, and a fragment of OppA protein, encoded by ORF *ssu1664*, encompassing amino acids S281-E596. The corresponding DNA fragments were amplified by PCR from genomic DNA of *S. suis* strain P1/7. The recombinant protein fragments were produced as polypeptides fused Glutathione S-transferase (GST) in *E. coli* DH5 α using the pRGSTENT vector (Biomedal) according to manufacturer's instructions. The recombinant fragments were expressed after induction with IPTG in *E. coli* BL21, and purified by affinity chromatography with a GSH column. They were eluted in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM GSH, and were pure in more than 95%. The identities were confirmed by MALDI-TOF MS analysis.

2.7. PCR detection

Genomic DNA was extracted from each isolate. Samples were kept in tubes at -20 °C until used. The primers designed for *ssnA* gene detection were: forward, 5' TATCGGATTGATTGAAGTGC AG 3'; reverse, 5' TGTTGGCTTGTATTGTTGGTC 3'. The primers designed for *oppA* gene detection were: forward, 5' CTTTCAG CATCTGTTCTTGCAG 3'; reverse, 5' TCTTACCAGCTGCTTCGTC ATA 3'. PCR was performed for 5 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C, 90 s at 56 °C and 1 min at 72 °C. The amplicons were analyzed in a 1% agarose gel. PCR products were 913 bp for *ssnA* and 955 bp for *oppA*.

2.8. Production of rabbit antisera

Two New Zealand rabbits were used to obtain antisera against the recombinant proteins. A protocol based on 6 immunizations was used. The first immunization of rabbits consisted of a subcutaneous injection of each recombinant protein (250 μ g) in complete Freund's adjuvant on day 0. On

days 14, 28, 35, 57 and 64 the immunizations were carried out by intramuscular injection (125 μ g) in complete and incomplete Freund's adjuvant alternatively. Preimmune rabbit sera were collected before the first injection, and were used as negative controls.

2.9. Mice infection

Six 4 week-old female CD1 mice were randomly assigned to two groups of three each. Mice of group 1 were challenged intraperitoneally with a sublethal dose of 2×10^6 CFU of log-phase 235/02 strain in 1 ml PBS and mice of group 2 were inoculated with PBS alone as blank controls. On the 30th day after the challenge, sera were obtained from each group by tail vein bleeding. The infections were conducted according to the European Union guidelines for the handling of laboratory animals and were approved by the Ethics Committee of the University of Córdoba (Authorization no. 5177).

2.10. Western blot of whole cell extracts

S. suis cells were treated with mutanolysin overnight at 37 °C, then sonicated (6 cycles of 20 s) and centrifuged. 30 μ l of *S. suis* supernatant was separated by 12% SDS-PAGE. Proteins transferred to a nitrocellulose membrane for 20 min at 15 V were detected by incubation for 1 h at 37 °C with a 1/5000 dilution of sera from rabbits immunized with recombinant OppA. OppA-specific antibodies were detected with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1/2500) and developed with ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) according to manufacturer's instructions.

2.11. Flow cytometry immunofluorescence analysis

Cells from *S. suis* strains, grown to the mid-log phase, were harvested by centrifugation, diluted to 10^7 cells/ml, washed twice with PBS and blocked for 30 min at 20 °C with 100 μ l of PBS containing 10% fetal calf serum (PBS-FCS). The cells were washed twice with washing buffer (PBS-1% BSA). Rabbit antisera were diluted 1:200 in PBS-1% BSA and incubated with bacterial cells for 30 min at 4 °C. Phycoerythrin-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen), diluted 1:50 was then added to the cells and incubated at 4 °C in the dark for 30 min. Cells were harvested by centrifugation and resuspended in PBS containing 4% paraformaldehyde. Bacteria were then analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star, Inc., USA).

2.12. Measurement of antibody titers

The titers of specific antibodies in rabbit sera were measured using an indirect ELISA assay. Microtiter plates were coated with 100 μ g/ml of total protein extract of *S. suis* or with 0.5 μ g/ml of both recombinant proteins in coating buffer (0.05 M NaHCO₃; pH 9.6) at 4 °C overnight. After washing three times in PBS containing 0.05% Tween-20, the plates were saturated with 100 μ l of 2% BSA for 1 h at 37 °C, and washed again three times. Serially diluted rabbit or mouse

sera were added and incubated for 40 min at 37 °C. Detection of bound IgG was achieved by incubation with either antirabbit or antimouse IgG–horseradish peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich) diluted 1:5000 in washing buffer for 40 min at 37 °C. The plates were washed three times and the reaction was developed by adding 100 µl of the activated substrate solution (TMB substrate, Sigma-Aldrich) and incubated in the dark for 20 min. The reaction was stopped by adding 100 µl of stop solution (Sigma-Aldrich). Absorbance was measured at 450 nm in an ELISA microtiter reader.

3. Results and discussion

3.1. Definition of the pan-surfome in a collection of clinical isolates

Bacterial surface proteins are key molecules in the interaction of cells with their environment [15,16]. Regarding pathogenic microorganisms, they can be responsible for virulence and pathogenesis, but are also potential targets for drugs or vaccine development, as they have the highest chances to interact with the immune system [33,34]. Proteomics provides excellent technological platforms and strategies to identify antigenic surface proteins in bacteria. In *S. suis*, most proteomic studies have employed first-generation approaches (i.e. 2-DE/MALDI-TOF MS) for the identification of these proteins, normally via reaction with sera from immunized animals or diseased humans [35–41]. In the last years, the “surfome” analysis through the “shaving” strategy has demonstrated its power to identify in a fast and reliable way tens of surface proteins in a sample [24–26,28,42]. This approach has also been used in *S. suis*, allowing to discover new immunoprotective proteins [21,22]. However, the proteomic works in this microorganism have only studied a limited number of isolates and serotypes, mainly serotypes 2 and 9. In this work, we report for the first time a proteomic comparison of many different serotypes and clinical isolates, aiming at identifying common proteins with a vaccine potential. For that, we “shaved” a collection of 39 *S. suis* clinical isolates obtained from diseased pigs in farms of Spain and the Netherlands during the last 12 years, and corresponding to 19 different serotypes representing the most prevalent ones in the area. Thus, we defined the “surfome” of each strain by its individual analysis, i.e. the catalog of the predicted surface proteins that are identified experimentally. The global “pan-surfome”, i.e., the set of all the proteins found in the whole collection, corresponded to 113 proteins (Table 1), of which 33 corresponded to the lipoproteins category (out of 42 predicted in the P1/7 genome, representing 78.6% of total). Cell wall proteins identified represented 85% of those predicted in the genome (17 out of 20). Nine proteins were theoretically secreted (50% of total predicted from the genome), 28 with one TMD (26.2% of total predicted) and 26 with more than one TMD (7.5% of total predicted). A complete list of identified proteins and peptides, including those predicted as cytoplasmic, can be found in Tables S2 and S3.

The list of all the identified proteins predicted as surface-localized is shown in Table 2. The table also shows the

Table 1 – Summary of identified surface proteins in *Streptococcus suis* clinical isolates by “shaving” cells and LC/MS/MS analysis.

Protein category ^a	# of identified proteins	# of predicted proteins in <i>S. suis</i> P1/7 genome	Identified/predicted (%)
Lipoprotein	33	42	78.6
Cell wall	17	20	85.0
Secretory	9	18	50.0
Membrane (1 TMD)	28	107	26.2
Membrane (>1 TMD)	26	347	7.5
Total	113	534	21.2

^a Protein categories were established according to LocateP subcellular predictions: lipoproteins were those predicted as lipid-anchored proteins; cell wall proteins, as those having an LPXTG motif; secretory proteins, as those possessing an SP1-type signal peptide; membrane proteins with one transmembrane domain (TMD), as those possessing either a C- or an N-terminally anchored transmembrane region; membrane proteins with more than one transmembrane domain, those predicted as multi-transmembrane proteins; “surface proteins” means the sum of the five previous categories; and cytoplasmic proteins, those without any exporting or sorting signal, and predicted as intracellular proteins.

frequency of identification for each protein among serotypes and strains analyzed. Of them, the cell-wall protein category was that exhibiting the highest expression frequencies: 7 proteins were found in more than half (≥ 10) of the serotypes; and three of them (SSU0757, SSU0860 and SSU1760) were identified in more than 50% (i.e., 20 or more) of the analyzed clinical isolates. In the category of lipoproteins, 6 were found in 10 or more serotypes, and only two of them were identified in 20 or more isolates (SSU1390 and SSU0656). Two secreted proteins were identified in $\geq 50\%$ of the serotypes: SSU0465, which was found in 14 different serotypes and 25 isolates, and SSU1127, found in 10 different serotypes and 16 strains. Four transmembrane proteins with only 1 TMD were identified in ≥ 10 serotypes (SSU0020, SSU0309, SSU0496 and SSU1103), but no one was present in at least half of the analyzed isolates, although SSU0309, annotated as “streptococcal histidine triad-family protein”, was present in a highly representative number of different serotypes (14) and almost half of the isolates (19). Among the multitransmembrane proteins, no one passed these thresholds. If we compare the identification frequencies of the different categories protein-to-protein, the cell wall category was that most prevalent in relative terms, as it showed the highest number of proteins identified in a high proportion of serotypes and/or strains (7 out of 20 proteins in $\geq 50\%$ of the serotypes, i.e. 35%; 6 out of 42, i.e. 14% for lipoproteins; 2 out of 18, i.e. 11% of secreted proteins; and less than 1% for membrane proteins). This indicates that proteins with the LPXTG-anchoring motif are normally those most expressed on the surface of Gram-positive bacteria, as already reported [16]. Very similar results have also been obtained by proteomic analysis in other Gram-positive species [24,25,28,42].

Table 2 – Identified surface proteins by “shaving” *Streptococcus suis* cells followed by LC/MS/MS analysis.

Protein annotation	Cell wall proteins ^a														# of serotypes ^c	% ^d	# of isolates ^e	% ^f											
	Locus	ST1 ^b	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST14	ST15	ST16					ST20	ST24	ST25	ST28	ST14	ST14					
Cell envelope Proteinase	SSU0757	1/1	4/5	1/1	2/3	1/1	0/1	0/2	2/3	3/6	1/1	1/2	0/3	1/3	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/2	15	78.95	22	56.41	
5'-nucleotidase	SSU0860	0/1	3/5	1/1	2/3	1/1	1/1	0/2	0/3	1/6	0/1	2/2	2/3	3/3	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/2	15	78.95	22	56.41	
Surface-anchored DNA nuclease	SSU1760	0/1	5/5	1/1	3/3	1/1	1/1	1/2	2/3	4/6	1/1	2/2	0/3	2/3	0/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/2	16	84.21	28	71.80	
Surface-anchored 2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase	SSU1879	0/1	3/5	1/1	2/3	1/1	0/1	1/2	0/3	2/6	0/1	1/2	0/3	1/3	0/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/2	1/1	0/2	1/1	0/2	11	57.89	15	38.46	
Surface-anchored protein	SSU0253	0/1	2/5	0/1	1/3	0/1	1/1	0/2	1/3	1/6	1/1	1/2	2/3	1/3	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	2/2	0/1	0/1	0/2	1/1	11	57.89	14	35.90	
Surface-anchored protein	SSU1128	0/1	0/5	1/1	2/3	1/1	1/1	1/2	1/3	1/6	0/1	1/2	1/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/2	1/1	0/2	1/1	0/2	10	52.63	11	28.21	
Surface-anchored 5'-nucleotidase	SSU1355	0/1	3/5	1/1	3/3	1/1	1/1	0/2	1/3	1/6	0/1	1/2	2/3	2/3	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/2	1/1	0/2	1/1	0/2	11	57.89	17	43.59	
Surface-anchored serine protease	SSU1773	0/1	4/5	0/1	2/3	1/1	0/1	1/2	1/3	2/6	1/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/2	1/1	0/2	1/1	0/2	9	47.37	13	33.33	
Surface-anchored protein	SSU0186	0/1	3/5	0/1	2/3	0/1	0/1	1/2	1/3	1/6	0/1	1/2	0/3	1/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	0/2	1/1	0/2	8	42.11	11	28.21	
Muramidase-released protein precursor (136 kDa surface protein)	SSU0706	0/1	4/5	1/1	2/3	1/1	0/1	0/2	0/3	3/6	1/1	1/2	2/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	0/2	0/1	0/2	8	42.11	15	38.46	
Surface-anchored zinc carboxypeptidase	SSU1143	0/1	3/5	1/1	2/3	0/1	1/1	0/2	0/3	1/6	0/1	0/2	1/3	1/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	0/2	0/1	0/2	7	36.84	10	25.64	
Surface-anchored protein	SSU1201	0/1	3/5	1/1	2/3	0/1	0/1	0/2	1/3	4/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	1/2	7	36.84	13	33.33	
Surface-anchored amylopullanase	SSU1849	1/1	2/5	0/1	1/3	1/1	0/1	0/2	1/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	1/2	0/1	1/2	7	36.84	8	20.51	
Surface-anchored protein	SSU1476	0/1	0/5	1/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	2/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	1/2	0/1	1/2	4	21.05	5	12.82	
Surface-anchored protein	SSU0201	0/1	1/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	0/2	0/1	0/2	2	10.53	2	5.13	
Surface-anchored protein	SSU0427	0/1	1/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	0/2	0/1	0/2	2	10.53	2	5.13	
Surface-anchored dipeptidase	SSU1215	0/1	1/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	1/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	0/2	0/1	0/2	2	10.53	2	5.13	
Lipoproteins																													
Protein annotation	Locus	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST14	ST15	ST16	ST20	ST24	ST25	ST28	ST14	ST14									
Streptococcal histidine triad-family protein	SSU1390	0/1	2/5	1/1	3/3	0/1	1/1	1/2	1/3	1/6	0/1	2/2	2/3	3/3	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	15	78.95	23	58.97
Zinc-binding protein Adca precursor	SSU0115	0/1	2/5	1/1	1/3	1/1	1/1	0/2	0/3	1/6	0/1	2/2	1/3	1/3	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	14	73.68	16	41.03	
Lipoprotein	SSU0656	0/1	4/5	1/1	3/3	1/1	1/1	1/2	1/3	1/6	0/1	2/2	1/3	2/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	2/2	1/1	1/1	2/2	1/1	13	68.42	21	53.85	
Foldase protein PrsA precursor	SSU1078	0/1	4/5	1/1	3/3	1/1	1/1	1/2	1/3	2/6	0/1	1/2	0/3	1/3	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	2/2	1/1	13	68.42	18	46.15	
Oligopeptide-binding protein OppA precursor	SSU1664	0/1	3/5	1/1	3/3	1/1	0/1	1/2	2/3	0/6	0/1	1/2	0/3	2/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/1	2/2	1/1	10	63.16	19	48.72	
Fumarate reductase flavoprotein subunit	SSU1933	0/1	3/5	1/1	1/3	0/1	1/1	0/2	1/3	2/6	0/1	1/2	0/3	1/3	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/1	1/2	0/1	10	52.63	13	33.33	
Lipoprotein	SSU1560	0/1	2/5	1/1	2/3	1/1	0/1	0/2	2/3	0/6	0/1	1/2	2/3	3/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/1	1/2	0/1	9	47.37	15	38.46	
Lipoprotein	SSU1093	0/1	2/5	0/1	2/3	1/1	1/1	0/2	1/3	1/6	0/1	1/2	1/3	1/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	8	42.11	9	23.08	
Maltose/maltodextrin-binding protein precursor	SSU1915	0/1	4/5	0/1	2/3	0/1	0/1	0/2	1/3	0/6	0/1	1/2	1/3	1/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	7	36.84	11	28.21	
Extracellular metal cation-binding protein	SSU1869	0/1	1/5	0/1	2/3	0/1	0/1	0/2	1/3	1/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/1	1/2	0/1	6	31.58	6	15.38	
Laminin binding protein	SSU0308	0/1	1/5	0/1	2/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/1	1/2	0/1	5	26.32	6	15.38	
Lipoprotein	SSU0798	0/1	2/5	0/1	0/3	0/1	0/1	1/2	1/3	1/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	5	26.32	6	15.38	
Amino-acid ABC transporter extracellular-binding protein	SSU0934	0/1	2/5	0/1	2/3	0/1	0/1	0/2	1/3	1/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	5	26.32	7	17.95	
Penicillin-binding protein 1A	SSU1853	0/1	2/5	0/1	1/3	0/1	0/1	1/2	1/3	1/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	5	26.32	6	15.38	
Amino acid ABC transporter: extracellular amino acid-binding protein	SSU0370	0/1	0/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	1/3	1/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	4	21.05	4	10.26	
Extracellular amino acid-binding protein	SSU0503	0/1	2/5	1/1	0/3	1/1	0/1	0/2	1/3	0/6	0/1	0/2	1/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	5	26.32	6	15.38	
Extracellular amino acid-binding protein	SSU0875	1/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	1/6	0/1	0/2	1/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	3	15.79	3	7.69	
Extracellular amino acid-binding protein	SSU0876	1/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56	
Branched-chain amino acid ABC transporter: amino acid-binding protein	SSU1364	0/1	0/5	0/1	0/3	1/1	0/1	0/2	0/3	1/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	4	21.05	4	10.26	
Lipoprotein	SSU1577	0/1	1/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	3	15.79	3	7.69	
Cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	SSU1177	0/1	1/5	0/1	2/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	3	15.79	4	10.26	
Lipoprotein	SSU1207	0/1	2/5	0/1	1/3	0/1	1/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	3	15.79	4	10.26	
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	SSU0284	0/1	1/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	2	10.53	2	5.13	
Extracellular solute-binding protein	SSU0698	0/1	0/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	2	10.53	2	5.13	
Extracellular solute-binding protein	SSU1170	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	1/2	0/1	0/2	2	10.53	2	5.13	

Cell wall proteins ^a																										
Protein annotation	Locus	ST1 ^b	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST14	ST15	ST16	ST20	ST24	ST25	ST28	ST1/ 2	ST1/ 14	# of serotypes ^c	% ^d	# of isolates ^e	% ^f		
Ferrichrome-binding protein precursor	SSU0606	0/1	1/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Lipoprotein	SSU0943	0/1	0/5	1/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Lipoprotein	SSU1092	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	1/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Multiple sugar-binding protein precursor	SSU1372	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Lipoprotein	SSU1640	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Membrane protein OxaA 2 precursor	SSU1525	0/1	0/5	0/1	0/3	1/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	2	10.53	2	5.13	
Secreted proteins																										
Protein annotation	Locus	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST14	ST15	ST16	ST20	ST24	ST25	ST28	ST1/ 2	ST1/ 14	# of serotypes	%	# of isolates	%		
Exported protein	SSU0465	0/1	4/5	1/1	3/3	1/1	0/1	1/2	2/3	3/6	0/1	2/2	2/3	2/3	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2	14	73.68	25	64.10	
N-acetylglucosyl-1-alanine amidase	SSU1127	1/1	3/5	1/1	2/3	0/1	1/1	0/2	2/3	0/6	1/1	2/2	1/3	2/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	10	52.63	16	41.03	
Serine protease	SSU1968	0/1	3/5	1/1	1/3	1/1	0/1	0/2	1/3	1/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	6	31.58	8	20.51	
Exported protein	SSU0215	0/1	1/5	0/1	1/1	1/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	4	21.05	4	10.26	
Exported protein	SSU1416	0/1	0/5	0/1	1/3	0/1	1/1	0/2	0/3	1/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	3	15.79	3	7.69	
LysR family regulatory protein	SSU1653	0/1	0/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	1/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	3	15.79	3	7.69	
Exported protein	SSU1616	0/1	1/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	1/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	2	10.53	2	5.13	
UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	SSU1828	0/1	0/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	2	10.53	2	5.13	
Exported protein	SSU1934	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	1/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Membrane proteins (1 TMD)																										
Protein annotation	Locus	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST14	ST15	ST16	ST20	ST24	ST25	ST28	ST1/ 2	ST1/ 14	# of serotypes	%	# of isolates	%		
Streptococcal histidine triad-family protein	SSU0309	0/1	3/5	1/1	2/3	1/1	1/1	0/2	1/3	0/6	0/1	2/2	2/3	1/3	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2	14	73.68	19	48.72	
Mac family protein	SSU0496	0/1	3/5	1/1	1/3	0/1	1/1	1/2	1/3	1/6	1/1	1/2	2/3	3/3	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/2	0/2	13	68.42	18	46.15	
Amidase	SSU0020	0/1	3/5	0/1	1/3	0/1	1/1	0/2	1/3	2/6	1/1	1/2	1/3	2/3	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/2	0/2	12	63.16	16	41.03	
Streptococcal histidine triad-family protein	SSU1103	1/1	2/5	1/1	2/3	1/1	0/1	1/2	2/3	0/6	0/1	2/2	2/3	0/3	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/2	0/2	12	63.16	17	43.59	
Exported protein	SSU0141	0/1	3/5	0/1	1/3	0/1	1/1	1/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	9	47.37	11	28.21	
Exported protein	SSU1950	0/1	3/5	0/1	1/3	0/1	1/1	0/2	1/3	1/6	0/1	1/2	1/3	1/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	8	42.11	10	25.64	
Lipoprotein	SSU1493	0/1	2/5	1/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	1/3	1/3	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	5	26.32	6	15.38	
Penicillin binding protein 2x	SSU1548	0/1	2/5	0/1	2/3	0/1	1/1	0/2	0/3	1/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	5	26.32	7	17.95	
penicillin-binding protein 2b	SSU1186	0/1	1/5	0/1	1/3	0/1	1/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	3	15.79	3	7.69	
Glutamine-binding protein precursor	SSU1193	0/1	2/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	1/3	0/6	0/1	0/2	1/3	1/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	4	21.05	5	12.82	
Neutral zinc metalloproteinase	SSU1468	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	4	21.05	4	10.26	
Penicillin-binding protein 1B	SSU0121	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	1/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	3	15.79	3	7.69	
Exported protein	SSU0243	0/1	1/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	2	10.53	2	5.13	
Polysaccharide deacetylase	SSU0746	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	3	15.79	3	7.69	
Membrane protein	SSU1108	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Sulfolysin (hemolysin)	SSU1231	0/1	1/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	3	15.79	3	7.69	
Exported protein	SSU1490	0/1	0/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	3	15.79	3	7.69	
Spermidine/putrescine extracellular binding protein	SSU0754	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	2	10.53	2	5.13	
Sortase Sra	SSU0925	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	1/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Peptidoglycan GicNAc deacetylase	SSU1448	0/1	1/5	1/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	2	10.53	2	5.13	
Penicillin-binding protein 2a	SSU1777	0/1	0/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	2	10.53	2	5.13	
Signal peptidase 1 4	SSU0212	0/1	0/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Lipase	SSU0305	0/1	1/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Membrane protein	SSU0787	0/1	1/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Competence associated endonuclease	SSU1009	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Septation ring formation regulator	SSU1326	0/1	1/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Cell division protein	SSU1549	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	
Membrane protein	SSU1684	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	1	5.26	1	2.56	

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Protein annotation	Locus	Membrane proteins (>1 TMD)														# of serotypes	% of isolates	% of								
		ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST14	ST15	ST16	ST20				ST24	ST25	ST28	ST1/2	ST1/14			
IgA-specific zinc metalloproteinase	SSU0879	0/1	2/5	0/1	1/3	1/1	0/1	0/2	1/3	0/6	1/1	1/2	0/3	1/3	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	9	47.37	10	25.64
Cell division protease FtsH	SSU0015	0/1	2/5	1/1	1/3	0/1	0/1	1/2	1/3	3/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	7	36.84	10	25.64
ABC transporter permease protein	SSU1210	0/1	3/5	1/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	1/6	0/1	1/2	1/3	1/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	7	36.84	9	23.08
Oligopeptide transport system permease protein OppB	SSU1661	0/1	1/5	1/1	1/3	1/1	0/1	0/2	1/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	7	36.84	7	17.95
Fructose-specific phosphotransferase system (PTS) _I ABC component	SSU0768	0/1	1/5	0/1	0/3	1/1	0/1	1/2	1/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	5	26.32	5	12.82
Permease	SSU0467	0/1	0/5	0/1	2/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	2	5.13
Membrane protein	SSU0628	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	1/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	3	15.79	3	7.69
Membrane protein	SSU1118	0/1	2/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	3	15.79	4	10.26
Membrane protein	SSU0242	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/2	2	10.53	2	5.13
ABC transporter ATP-binding membrane protein	SSU1234	0/1	1/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	1/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	2	10.53	2	5.13
Glutamine ABC transporter, glutamine-binding protein/permease protein	SSU1675	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	1/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	2	10.53	2	5.13
ABC transporter ATP-binding membrane protein	SSU0264	0/1	0/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
ABC transporter, ATP-binding/permease protein	SSU0274	0/1	0/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
Cation-transporting ATPase	SSU0288	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	1/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
Sulphatase	SSU1125	0/1	1/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
Cation-transporting ATPase	SSU1180	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
Cation-transporting ATPase	SSU1246	0/1	1/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
Membrane protein	SSU1392	0/1	1/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
ABC transporter, permease protein	SSU1406	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
Mannose-specific phosphotransferase system (PTS) _I ABC component	SSU1585	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	1/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
Sucrose-specific phosphotransferase system (PTS) _I ABC component	SSU1618	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	1/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
Membrane protein	SSU1627	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	1/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
Membrane protein	SSU1817	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
ABC transporter ATP-binding membrane protein	SSU1824	1/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
Sortase SrtB	SSU1883	0/1	0/5	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	1/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56
Membrane protein	SSU1922	0/1	0/5	0/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/6	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1	5.26	1	2.56

a Protein categories were established according to LocateP subcellular predictions: lipoproteins were those predicted as lipid-anchored proteins; cell wall proteins, as those having an LPXTG motif, secretory proteins, as those possessing an SP1-type signal peptide; membrane proteins with one transmembrane domain (TMD), as those possessing either a C- or an N-terminally anchored transmembrane region; membrane proteins with more than one transmembrane domain, those predicted as multi-transmembrane proteins; “surface proteins” means the sum of the five previous categories; and cytoplasmic proteins, those without any exporting or sorting signal, and predicted as intracellular proteins.

b ST: serotype.

c Number of different serotypes out of 19 analyzed in which protein of that row was identified.

d % of different serotypes out of 19 analyzed in which protein of that row was identified.

e Number of different clinical isolates out of 39 analyzed in which protein of that row was identified.

f % of different clinical isolates out of 39 analyzed in which protein of that row was identified.

3.2. Potential of identified surface proteins for further vaccine studies

Protein vaccine candidates must be molecules fulfilling the following features: to be surface-exposed, highly expressed and widely distributed, in order to increase the chances to raise an effective immune response to induce protection [43]. Taking into account the high number of isolates analyzed in this work, it would not be expected to find a lot of proteins in common to all or most of them when analyzing the “pan-surfome”, as intra-species genetic variability can make that the protein expression pattern be different among strains [44,45]. Actually, in *Staphylococcus aureus*, Dreisbach et al. reported an overlapping in the surfomes of less than 10% from only four strains studied [46], and we have recently reported in pneumococcus that 10.5% of identified surface proteins were common to 5 analyzed strains [28]. Due to such a great number of isolates studied in the present work compared to those previously cited and carried out with a limited number of strains, we have not identified any protein present in 100% of the strains by the “shaving” approach. Nevertheless, in spite of it, we have identified a considerable number of proteins showing a wide distribution among most serotypes.

The main aim of this work is to describe the “pan-surfome” of a wide collection of relevant clinical isolates of this bacterium in order to propose which proteins could be used for further vaccination studies, fulfilling the requirements previously cited: surface exposure, expression and wide distribution. According to the last one, we ranked the identified surface proteins based on the frequency of serotypes in which such proteins were found after trypsin “shaving”. We defined three groups (from best to worst) of a priori potentiality for further immunization and/or vaccination studies: a (>70% serotypes), consisting of 7 proteins; B (50–70% serotypes), with 12 proteins; and C (30–50% serotypes), consisting of 15 proteins (Table 3). We assumed that proteins belonging to the categories of cell-wall anchored, secreted and lipoproteins are in principle surface-exposed if expressed, except for the region that can be embedded within the peptidoglycan layer, of ca. 70 amino acids [16], or unless they may have undergone a very compact folding or be hidden under the capsule (if this is present and is very thick). Therefore, we included 3, 4 and 6 cell-wall proteins in groups A, B and C respectively. The figures for the lipoprotein category were 2, 4 and 4, and for the predicted secreted proteins, 1 for each group A, B or C.

Membrane proteins, however, are in principle more embedded and therefore less surface-exposed and accessible, unless they have large enough domains to reach the surface through the peptidoglycan layer. This makes that the proportion of membrane proteins identified by the “shaving” approach compared to the overall predicted sequences is much lower than for the rest of surface protein categories, as extensively reported [24,25,47]. Proteins with only 1 TMD, as they usually have domains at the extracellular side of hundreds of amino acid residues, are more likely to be identified by the “shaving” strategy than multitransmembrane proteins, for which is less probable to have loops large enough to reach the surface. Based on the topology representation of experimentally identified

regions of membrane proteins (Fig. 1) and according to the criterium of frequency in serotypes, we have also included in category A (Table 3) one protein with one TMD (SSU0309), 3 in category B and 1 in category C. Notice that neither protein SSU0020 (group B) nor protein SSU0141 was included in Fig. 1, as we used LocateP for assigning subcellular location, but none of the other prediction algorithms (TMHMM, PSORT, LipoP, SignalP) found transmembrane regions for these proteins. Instead, these algorithms predicted both of them as secreted, type-I signal peptide proteins. We did not include in the category C the protein SSU1950 (found in 42% of serotypes), as its predicted exposed domain is very short and would not be accessible to antibodies. Regarding multitransmembrane proteins, 3 were included in category C, as they have theoretically large domains at the extracellular side, for which we identified some peptide(s). However, as for the case of SSU1950, we did not include the protein SSU1661, as the domain for which one peptide was identified is too short.

Taking into account both the frequencies of identification, and the regions identified in the different peptides (which can be visualized through topology representation), selection of candidates for future vaccine testing should be facilitated. A complete representation of identified peptides for each membrane protein, strain by strain, can be seen in Fig. S1, which may be used for selecting specific regions of extracellular domains, based on the experimentally identified peptides and their frequencies among the different strains.

3.3. Immunogenicity and in vivo accessibility of antibodies to SsnA and OppA

To evaluate the utility of the “pan-surfome” analysis in selecting potential new vaccine candidates, we tested the immunogenicity and in vivo accessibility to antibodies of two proteins: i) a candidate from category A (Table 3), the cell-wall protein SSU1760, annotated as surface-anchored DNA-nuclease (SsnA), as it was that one present in more serotypes (16 out of 19, i.e. 84%) and clinical isolates (28 out of 39, i.e. 72%) than the rest of surface proteins identified. Especially notorious was the fact that this was the protein most frequently identified within the 11 clinical isolates analyzed belonging to the two most prevalent serotypes, i.e. serotypes 2 and 9 (Table 4). Streptococcal DNA nucleases are major exoenzymes and possible virulence factors in *S. pyogenes* [48]. In addition, they can assist pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response [49]. Fontaine et al. [50] have reported that in *S. suis* the protein is also secreted in a truncated version to the culture supernatants, in serotypes 1–9. ii) A candidate from category B, the lipoprotein SSU1664, annotated as oligopeptide-binding protein OppA precursor (OppA), found in 12 serotypes (63%) and 19 clinical isolates (49%). This protein has been proposed previously as a potential vaccine candidate, as it has shown immunogenic activity [35]. In order to understand whether the absence of the identification of both proteins by proteomics in some serotypes (Table 4) could be because whether they lack the coding gene(s) or not, we amplified by PCR from all the bacterial genome fragments of both genes which are conserved among all the available

Table 3 – Grouping of proteins according to their potentiality for further immunization and/or vaccination studies.

Ranking	Proteins
A (7) ^a	Cell wall: SSU1760, SSU0757, SSU0860 Lipoproteins: SSU1390, SSU0115 Secreted proteins: SSU0465 Membrane proteins (1 TMD): SSU0309
B (12)	Cell wall: SSU1879, SSU0253, SSU1355, SSU1128 Lipoproteins: SSU0656, SSU1078, SSU1664, SSU1933 Secreted proteins: SSU1127 Membrane proteins (1 TMD): SSU0496, SSU0020, SSU1103
C (15)	Cell wall: SSU1773, SSU0186, SSU0706, SSU1143, SSU1201, SSU1849 Lipoproteins: SSU1560, SSU1093, SSU1915, SSU1869 Secreted proteins: SSU1968 Membrane proteins (1 TMD): SSU0141 Membrane proteins (>1 TMD): SSU0879, SSU0015, SSU1210

^a A: >70% analyzed serotypes; B: 50–70% analyzed serotypes; C: 30–50% analyzed serotypes.

sequenced strains of *S. suis*. As shown in Fig. S2, a positive amplification of the two genes was found in all the serotypes and strains analyzed in this work.

To test the immunogenic capacity of the proteins, we determined the titers of antibodies in sera from mice infected experimentally, carrying out an ELISA assay with the purified recombinant fragments as antigens. The IgG titers against SsnA were >1/100,000, thus indicating that SsnA appears to be a strongly immunogenic protein. However, the IgG titers against OppA were 1>200, thus indicating that, although showing immunogenicity, this was much lower than that of SsnA.

Then, we studied by flow cytometry the capacity of antibodies present in sera raised against the recombinant proteins to bind either SsnA or OppA when these are expressed and localized on the bacterial surface, in order to affirm that these proteins have a potential as vaccine candidates. Regarding SsnA, after measuring the 39 clinical isolates, the responses were not homogeneous either among strains or within serotypes (Table 4 and Fig. S3). The main group, of 20 strains, was constituted by those isolates in which a positive reaction was observed in strains in which also the protein was identified by proteomics. This group comprised 4 out of the 5 serotype-2 strains, of which in all of them the protein SsnA was identified by proteomics, and 3 out of the 4 serotype-9 strains in which we found the protein. However, in 7 isolates, a positive reaction, even very strong, was measured in isolates for which proteomics did not provide identification of SsnA (e.g. strain 6221, serotype 28). Vice versa, i.e. negative cytometry response was obtained in 8 isolates for which SsnA was identified by proteomics, even when a high number of peptides were found (e.g. the two isolates of serotype 14). In 4 isolates, each one belonging to different serotypes (204/03 from serotype 7, 3144 from serotype 9, 5225 from serotype 15 and 574/02 from serotype 20), neither the protein was identified by proteomics nor were

the antibodies bound to the bacterial surface. Nevertheless, it can be considered SsnA to have a potential for further vaccination studies to assay protection either in vivo or in vitro, as it is a widely distributed protein, identified by proteomics in 16 out of the 19 serotypes analyzed, and accessible to the antibodies in 13 out of the 19 serotypes (and 27 out of the 39 isolates) studied in this work. Concerning OppA, results indicated that its potential for further vaccination studies is less than that of SsnA: it was identified in less serotypes and clinical isolates, and flow cytometry showed that it was accessible to antibodies of the immune serum only in 5 strains. We confirmed by Western blotting in total protein extracts that the protein was expressed in the 39 strains (Fig. S4). The absence of positive reaction by flow cytometry in the vast majority of the isolates, linked to its relatively poor immunogenicity and lesser identification by the “shaving” strategy makes this protein an a priori less interesting candidate than SsnA. Further research will be done to test SsnA as a vaccine in protection models.

4. Conclusions

The “pan-surfome” analysis demonstrates its utility for a fast screening of widely distributed proteins in a collection of clinically relevant strains, which must be complemented by immunochemical techniques such as flow cytometry to reveal immunogenicity and therefore vaccine potential. SsnA is a surface-located protein in most of the serotypes of the zoonotic pathogen *S. suis*. This protein has an attractive potential for a vaccine, as it is well exposed and accessible to antibodies, being in addition very immunogenic. This must be evaluated by testing its immunoprotective activity. The strategy may also be used to select a combination of proteins, according to their frequency, exposure and/or abundance, for the design of “antigen cocktails” in future vaccine formulations.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.07.025>.

Acknowledgments

Mass spectrometry was performed at the Proteomics Facility, SCAI, University of Córdoba, which is Node 6 of the ProteoRed Consortium financed by the ISCIII. This research was funded by the Project Grants SAF2008-00733 (Spanish Ministry of Science and Innovation), P09-CTS-4616 from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía) and PI-0207-2010 from the Consejería de Salud (Junta de Andalucía) to M.J.R.-O., by the UCO research groups AGR-256 and BIO-216, and by FEDER funds from the EU. L. G.-G. and A. O.-A. are both recipients of a Ph.D. fellow of the FPU Program (Spanish Ministry of Education) at Dpt. de Sanidad Animal and Dpt. de Bioquímica y Biología Molecular, University of

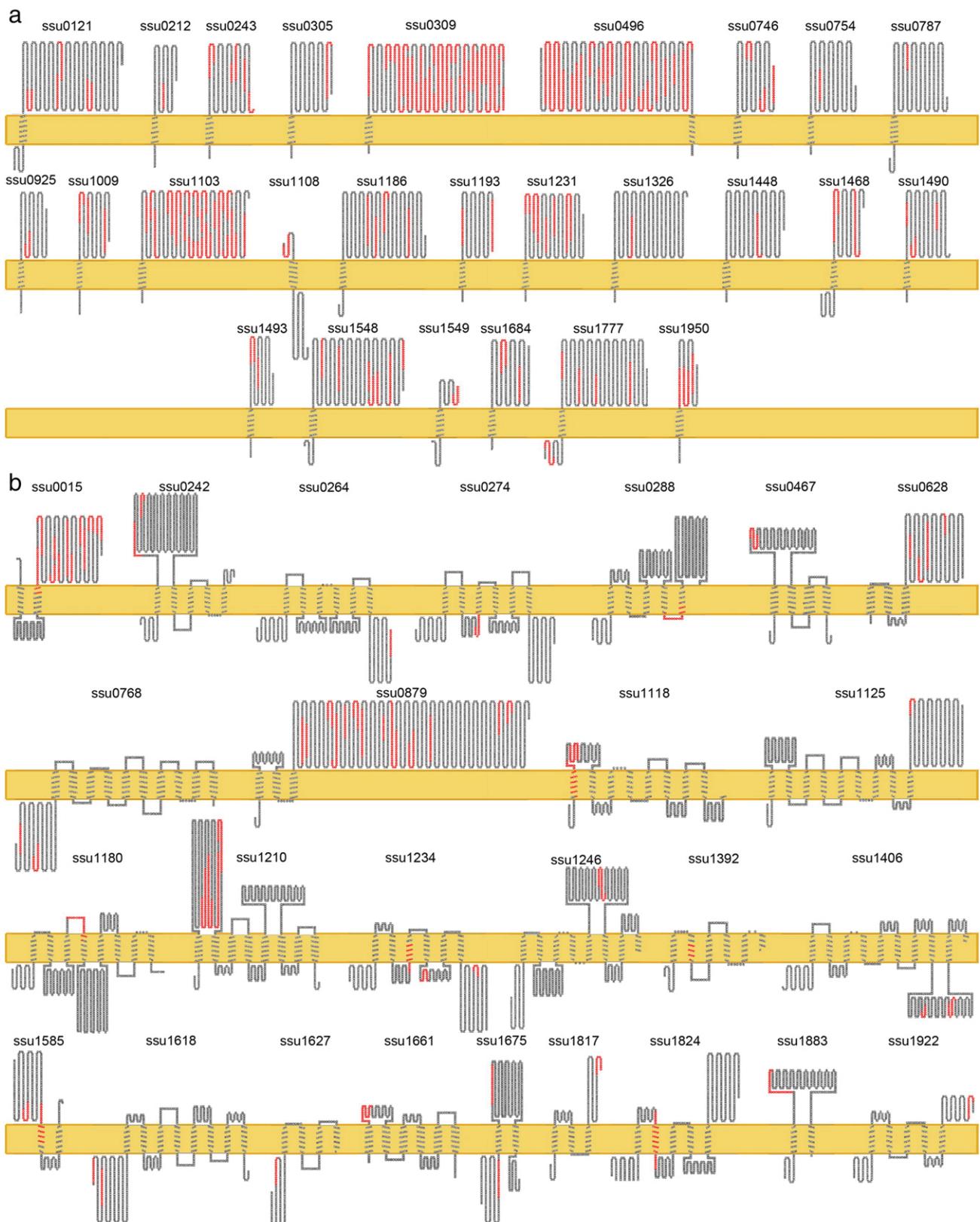


Fig. 1 – Topological representation of the identified membrane proteins in the “pan-surforme” analysis of the 39 *S. suis* clinical isolates. The TMHMM algorithm was used to predict transmembrane domains (TMD) and signal peptides after prediction of subcellular localization by LocateP. In red are shown the peptides experimentally identified by LC/MS/MS. a) Proteins with only one predicted TMD. b) Proteins with more than one TMD. For those two proteins predicted by LocateP to have one TMD and not represented in this figure, see explanation in the text.

Table 4 – Summary of SsnA and OppA identification in the different clinical isolates by proteomics “shaving” approach, and flow cytometry responses after incubation whole live cells with immune sera against the recombinant proteins.

Serotype	Clinical isolate	“Shaving” id. of SsnA	SsnA flow cytometry response ^a	“Shaving” id. of OppA	OppA flow cytometry response ^a
1	638/03	–	3.0	–	Negative
1/2	635	+	Negative	+	Negative
1/14	658/02	+	2.2	+	Negative
	699/02	–	2.1	+	Negative
2	P1/7	+	2.7	+	Negative
	365/02	+	2.4	+	Negative
	123	+	Negative	–	Negative
	682/06	+	11.6	+	Negative
	235/02	+	3.5	–	Negative
3	225/00	+	14.2	+	Negative
4	196/05	+	28.3	+	Negative
	636/03	+	49.0	+	Negative
	14/03	+	49.8	+	Negative
5	633/99	+	Negative	+	Negative
6	5215	+	4.0	–	Negative
7	22/02	+	Negative	–	Negative
	204/03	–	Negative	+	Negative
8	160/03	+	4.5	+	Negative
	40/03	+	3.1	–	7.7
	553/05	–	3.1	–	Negative
9	10/06	+	3.2	–	2.2
	8010	+	70.0	–	Negative
	233/01	+	2.2	–	Negative
	3144	+	Negative	–	Negative
	34/11	–	Negative	–	Negative
	228/06	–	3.6	–	3.6
10	340/05	+	2.0	–	Negative
14	546/05	+	Negative	+	2.7
	232/06	+	Negative	–	Negative
15	668/02	+	3.7	–	Negative
	609/02	–	5.3	–	Negative
	5225	–	Negative	–	Negative
16	592/06	+	2.9	+	Negative
	724/02	+	7.3	–	Negative
	226/03	–	4.7	+	Negative
20	574/02	–	Negative	–	Negative
24	6217	+	Negative	–	Negative
25	6218	+	9.0	+	2.0
28	6221	–	12.5	+	Negative

^a Mouse sera against the recombinant protein were incubated with whole bacterial cells and antibody binding was followed by flow cytometry. Fluorescence is given in –fold difference between cells stained with immune sera versus pre-immune sera. Fold differences <2 were not considered significant (negative).

Córdoba, respectively. Clinical isolates 5215, 5225, 6217, 6218, 6221 and 8010 were kindly provided by Dr. Henk Wisselink (Central Veterinary Institute of Wageningen, Lelystad, the Netherlands). We especially thank Prof. J. Antonio Bárcena, Head of research group BIO-216 from University of Córdoba, to which A. O-A., I. J-M. and M.J.R-O belong.

REFERENCES

- [1] Lun ZR, Wang QP, Chen XG, Li AX, Zhu XQ. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis* 2007;7:201-9.
- [2] Tarradas C, Perea A, Vela AI, Goyache J, Domínguez L, Fernández-Garaizábal JF, et al. Distribution of serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Spain. *Vet Rec* 2004;154:665-6.
- [3] Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol* 2010;5:371-91.
- [4] Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol* 2005;107:63-9.
- [5] Wisselink HJ, Smith HE, Stockhofe-Zurwieden N, Peperkamp K, Vecht U. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet Microbiol* 2000;74:237-48.
- [6] Baums CG, Valentin-Weigand P. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology,

- pathogenesis and vaccine development. *Anim Health Res Rev* 2009;10:65-83.
- [7] Fittipaldi N, Fuller TE, Teel JF, Wilson TL, Wolfram TJ, Lowery DE, et al. Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and suilysin by field strains of *Streptococcus suis* isolated in the United States. *Vet Microbiol* 2009;139:310-7.
- [8] Marois C, Le Devendec L, Gottschalk M, Kobisch M. Molecular characterization of *Streptococcus suis* strains by 16S-23S intergenic spacer polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Can J Vet Res* 2006;70:94-104.
- [9] Tarradas C, Borge C, Arenas A, Maldonado A, Astorga R, Miranda A, et al. Suilysin production by *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy carrier pigs in Spain. *Vet Rec* 2001;148:183-4.
- [10] Vela AI, Goyache J, Tarradas C, Luque I, Mateos A, Moreno MA, et al. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2003;41:2498-502.
- [11] Luque I, Blume V, Borge C, Vela AI, Perea JA, Márquez JM, et al. Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates recovered from diseased and healthy carrier pigs at different stages of production on a pig farm. *Vet J* 2010;186:396-8.
- [12] Busque P, Higgins R, Caya F, Quessy S. Immunization of pigs against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a live avirulent strain. *Can J Vet Res* 1997;61:275-9.
- [13] Holt ME, Enright MR, Alexander TJ. Immunisation of pigs with live cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res Vet Sci* 1988;45:349-52.
- [14] Pallares FJ, Schmitt CS, Roth JA, Evans RB, Kinyon JM, Halbur PG. Evaluation of a ceftiofur-washed whole cell *Streptococcus suis* bacterin in pigs. *Can J Vet Res* 2004;68:236-40.
- [15] Cordwell SJ. Technologies for bacterial surface proteomics. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:320-9.
- [16] Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999;63:174-229.
- [17] Li Y, Gottschalk M, Esgleas M, Lacouture S, Dubreuil JD, Willson P, et al. Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:937-43.
- [18] Li Y, Martinez G, Gottschalk M, Lacouture S, Willson P, Dubreuil JD, et al. Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infect Immun* 2006;74:305-12.
- [19] Aranda J, Garrido ME, Cortes P, Llagostera M, Barbe J. Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions. *Infect Immun* 2008;76:1590-8.
- [20] Aranda J, Garrido ME, Fittipaldi N, Cortés P, Llagostera M, Gottschalk M, et al. Protective capacities of cell surface-associated proteins of *Streptococcus suis* mutants deficient in divalent cation-uptake regulators. *Microbiology* 2009;155:1580-7.
- [21] Mandanici F, Gómez-Gascón L, Garibaldi M, Olaya-Abril A, Luque I, Tarradas C, et al. A surface protein of *Streptococcus suis* serotype 2 identified by proteomics protects mice against infection. *J Proteomics* 2010;73:2365-9.
- [22] Garibaldi M, Rodríguez-Ortega MJ, Mandanici F, Cardaci A, Midiri A, Papasergi S, et al. Immunoprotective activities of a *Streptococcus suis* pilus subunit in murine models of infection. *Vaccine* 2010;28:3609-16.
- [23] Baums CG, Kock C, Beineke A, Bennecke K, Goethe R, Schroder C, et al. *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:200-8.
- [24] Doro F, Liberatori S, Rodríguez-Ortega MJ, Rinaudo CD, Rosini R, Mora M, et al. Surfome analysis as a fast track to vaccine discovery: identification of a novel protective antigen for Group B *Streptococcus* hypervirulent strain COH1. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:1728-37.
- [25] Rodríguez-Ortega MJ, Norais N, Bensi G, Liberatori S, Capo S, Mora M, et al. Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. *Nat Biotechnol* 2006;24:191-7.
- [26] Rodríguez-Ortega MJ, Luque I, Tarradas C, Bárcena JA. Overcoming function annotation errors in the Gram-positive pathogen *Streptococcus suis* by a proteomics-driven approach. *BMC Genomics* 2008;9:588.
- [27] van de Rijn I, Kessler RE. Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. *Infect Immun* 1980;27:444-8.
- [28] Olaya-Abril A, Gómez-Gascón L, Jiménez-Munguía I, Obando I, Rodríguez-Ortega MJ. Another turn of the screw in shaving Gram-positive bacteria: optimization of proteomics surface protein identification in *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteomics* 2012;75:3733-46.
- [29] Zhou M, Boekhorst J, Francke C, Siezen RJ. LocateP: genome-scale subcellular-location predictor for bacterial proteins. *BMC Bioinforma* 2008;9:173.
- [30] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 2001;305:567-80.
- [31] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 2004;340:783-95.
- [32] Juncker AS, Willenbrock H, Von Heijne G, Brunak S, Nielsen H, Krogh A. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci* 2003;12:1652-62.
- [33] Grandi G. Genomics and proteomics in reverse vaccines. *Methods Biochem Anal* 2006;49:379-93.
- [34] Zagursky RJ, Anderson AS. Application of genomics in bacterial vaccine discovery: a decade in review. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:632-8.
- [35] Geng H, Zhu L, Yuan Y, Zhang W, Li W, Wang J, et al. Identification and characterization of novel immunogenic proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *J Proteome Res* 2008;7:4132-42.
- [36] Jing HB, Yuan J, Wang J, Yuan Y, Zhu L, Liu XK, et al. Proteome analysis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Proteomics* 2008;8:333-49.
- [37] Wu Z, Zhang W, Lu C. Comparative proteome analysis of secreted proteins of *Streptococcus suis* serotype 9 isolates from diseased and healthy pigs. *Microb Pathog* 2008;45:159-66.
- [38] Wu Z, Zhang W, Lu C. Immunoproteomic assay of surface proteins of *Streptococcus suis* serotype 9. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53:52-9.
- [39] Zhang A, Xie C, Chen H, Jin M. Identification of immunogenic cell wall-associated proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *Proteomics* 2008;8:3506-15.
- [40] Zhang W, Lu CP. Immunoproteomics of extracellular proteins of Chinese virulent strains of *Streptococcus suis* type 2. *Proteomics* 2007;7:4468-76.
- [41] Zhang W, Lu CP. Immunoproteomic assay of membrane-associated proteins of *Streptococcus suis* type 2 China vaccine strain HA9801. *Zoonoses Public Health* 2007;54:253-9.
- [42] Bøhle LA, Riaz T, Egge-Jacobsen W, Skaugen M, Busk OL, Eijsink VG, et al. Identification of surface proteins in *Enterococcus faecalis* V583. *BMC Genomics* 2011;12:135.
- [43] Grandi G. Antibacterial vaccine design using genomics and proteomics. *Trends Biotechnol* 2001;19:181-8.
- [44] de Greeff A, Wisselink HJ, de Bree FM, Schultsz C, Baums CG, Thi HN, et al. Genetic diversity of *Streptococcus suis* isolates as

- determined by comparative genome hybridization. *BMC Microbiol* 2011;11:161.
- [45] Zhang A, Yang M, Hu P, Wu J, Chen B, Hua Y, et al. Comparative genomic analysis of *Streptococcus suis* reveals significant genomic diversity among different serotypes. *BMC Genomics* 2011;12:523.
- [46] Dreisbach A, Hempel K, Buist G, Hecker M, Becher D, van Dijk JM. Profiling the surfaceome of *Staphylococcus aureus*. *Proteomics* 2010;10:3082-96.
- [47] Ventura CL, Malachowa N, Hammer CH, Nardone GA, Robinson MA, Kobayashi SD, et al. Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PLoS One* 2010;5:e11634.
- [48] Hasegawa T, Minami M, Okamoto A, Tatsuno I, Isaka M, Ohta M. Characterization of a virulence-associated and cell-wall-located DNase of *Streptococcus pyogenes*. *Microbiology* 2010;156:184-90.
- [49] Sumby P, Barbian KD, Gardner DJ, Whitney AR, Welty DM, Long RD, et al. Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1679-84.
- [50] Fontaine MC, Perez-Casal J, Willson PJ. Investigation of a novel DNase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 2004;72:774-81.