

УДК 639:616.982.17

DOI: 10.31073/vet_biotech39-11

ТАРАСОВ О.А., канд. вет. наук, e-mail: ast97@ukr.net,

ЗАХАРОВА О.М., канд. біол. наук, e-mail: olga_zm@ukr.net,

ГУДЗЬ Н.В., канд. вет. наук, e-mail: gudznataly@gmail.com

Інститут ветеринарної медицини НААН

САВЧЕНІЮК М.О., e-mail: m.o.savcheniuk@gmail.com

Білоцерківський національний аграрний університет

ПОШИРЕННЯ СЕРОТИПІВ *STREPTOCOCCUS SUIIS* НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

У статті наведені результати досліджень щодо серотипізації 32 ізолятів *Streptococcus suis*, виділених із патологічного матеріалу від свиней із чотирьох областей на території України (Київська, Черкаська, Чернігівська та Запорізька).

В результаті проведених досліджень 32 ізолятів встановлено, що застосування методу мультиплексної ПЛР дозволяє виявити збудник *S. suis* із одночасним встановленням його серотипу. Аналіз результатів досліджень ураження стрептококозом свиней різних вікових груп показав, що переважна кількість виявлених випадків припадає на поросят-сисунів (28,2%) та групу на відлученні (53,1%), серед яких циркулюють високовірулентні серотипи 2, 1/2, 1, 14, 5, 7. У тварин на дорощуванні виявлено присутність серотипів 7 та 10.

Ключові слова: *Streptococcus suis*, серотип, ПЛР, ізолят, патогенність.

Вступ. *Streptococcus suis* є одним патогенів свиней, які поширені в усьому світі та спричиняє економічні збитки через зниження продуктивності в свинарстві. Стрептококоз свиней реєструють у вигляді гострих та субклінічних проявів захворювання, а саме: менінгіти, артрити, ураження дихальної системи ендокардити та дерматити [1–4].

Більшість випадків захворювання спостерігається у тварин віком до трьох місяців, але найбільших збитків хвороба завдає поросят-відлученцям [5].

За літературними даними, більшість патогенних штамів збудника стрептококозу, які виділяли від свиней із різними проявами захворювання, належали до серотипів 1/2, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 і 14 [6–7]. Серотипи *S. suis* 2, 9 та 1 були найчастіше виділені у більшості Європейських країн, при цьому *S. suis* серотипу 2 був найбільш поширеним у Франції, Італії та Іспанії [8].

Чисельні літературні повідомлення доводять, що високий відсоток вірулентних штамів *S. suis* серотипу 2 продукує MRP та EF антигени, які вважаються головними факторами вірулентності цього мікроорганізму [9].

Хоча спостерігається пряма кореляція між продукуванням протеїнів MRP та EF та вірулентністю, мутантні штами, лізогенні за цими генами зберігали вірулентність у відношенні до свиней. Деякі ізоляти від хворих на стрептококоз свиней, виділені в Канаді, не продукували цих протеїнів і при цьому характеризувались дуже високою вірулентністю. У той самий час, в більшості Європейських країн, США та Австралії ізоляти фенотипу MRP+EF+ переважали при типуванні ізолятів, виділених із патологічного матеріалу від загиблих свиней [7, 9]. Таким чином, цей фенотип вважається класичним вірулентним фенотипом.

В сучасних умовах для диференціювання серотипів збудника стрептококозу свиней використовують складні методи – вестерн імуноблот та ІФА, які мають досить високу похибку (до 30%) в зв'язку із перехресними реакціями сироваток із іншими видами стрептококів [10–11].

Застосування нових молекулярно-біологічних методів діагностики, зокрема ПЛР, дозволяє визначати серотип збудника у біологічних матеріалах з високим ступенем достовірності та за короткий проміжок часу. Це важливо для оптимізації застосування засобів специфічної профілактики.

Метою роботи було встановлення найбільш розповсюджених серотипів *Streptococcus suis* на території України.

Матеріали та методи досліджень. В роботі були використані ізоляти *S. suis*, що зберігаються та підтримуються в музеї Інституту ветеринарної медицини НААН. Для досліджень використовували 32 ізоляти *S. suis*, виділені із патологічного матеріалу від свиней різного віку (від 3 днів до 9 місяців) та різними проявами хвороби. Зразки було отримано із чотирьох областей України: Київська, Черкаська, Чернігівська та Запорізька. В якості негативного контролю використовували *Streptococcus fecalis* та *Micrococcus luteus*. Тестову культуру *S. suis* NCTC 10234 використовували в якості позитивного контролю.

Виділення та видову ідентифікацію досліджених ізолятів стрептококів проводили за бактеріоскопічними (визначення морфології за допомогою мікроскопії забарвлених за Грамом мазків), культуральними (особливості росту на поживних середовищах) методами. Вивчення культуральних особливостей росту проводили із використанням загальноприйнятих бактеріологічних методів на середовищах серцево-мозковому бульйоні (ВНІ) (Bio-Rad, Франція), та серцево-мозковому агарі з додаванням 5% овечої крові (Bio-Rad, Франція).

Для проведення біохімічних досліджень з метою ідентифікації збудника використовували тест-набір API 20 STREP (Biomérieux, Франція), який застосовували згідно рекомендацій виробника. Крім того, для диференціації *S. suis* від основних видів стрептококів, виділених із патологічного матеріалу

від свиней, проводили визначення типу гемолізу (висів на серцево-мозковий агар з додаванням 5% овечої крові (Bio-Rad, Франція).

ДНК екстрагували за допомогою лізуючого буфера, що містить 20 мл 1 М TrisHCl (pH 8,5), 100 мкл Твін 20, 48 мг протеїнази К і 32 мл води для молекулярно-генетичних досліджень. Матеріал – колонії мікроорганізму після 24 годинної інкубації в термостаті за температури $35,8 \pm 0,2^\circ\text{C}$ був змитий фізіологічним розчином з чашок Петрі та інактивований за температури $95,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Після центрифугування за 15 тис. об/хв протягом 5 хв, супернатант використовували для подальших досліджень. Усі реакції ПЛР проводили, використовуючи ДНК в концентрації 20–30 нг/мкл, визначаючи концентрацію за допомогою флюориметра Qubit 3.0 (Fisher Thermo Scientific).

Серотип ізолятів визначали методом ПЛР (класичний метод із електрофоретичним визначенням результатів) із застосуванням трьох наборів праймерів, рекомендованих Kerdsin et al. (2012) [12], а також додаткової пари праймерів для підтвердження видової належності *S. suis*, представлених в таблиці 1.

Таблиця 1

Праймери для серотипизації *S. suis* в мультиплексній ПЛР

| Набір праймерів | Сіквенс праймера (5' - 3') | Фрагмент гена, на який розраховано праймери | Розмір продукту | Серотип |
|-----------------|---|---|-----------------|----------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | F: AATCATGGAATAAAGCGGAGTACAG R: ACAATTGATACGTCAAAATCCTCACC | cps1J, cps14J | 550 | 1 та 14 |
| | F: GATTTGTCTGGGAGGGTTACTTG R: TAAATAATATGCCACTGTAGCGTCTC | cps2J, cps1/2J | 450 | 2 та 1/2 |
| | F: TGGGAGAAGGCAGAAAGTACGAGA R: ACCCCCAGAAGAGCCGAAGGA | cps3J–cps3K | 1273 | 3 |
| | F: GATGATTTATGGCACCCGAGTAAGC R: AGTCACAATTGCTGGTCTCTGACACC | cps7H | 150 | 7 |
| | F: GGGATGATTGCTCGACAGAT R: CCGAAGTATCTGGGCTACTG | cps9H | 300 | 9 |
| | F: TACAGTGCTTGCAGCCCTAC R: CGACTTGTCTGTCGCCCTGAT | cps11N | 896 | 11 |
| | F: TGGAGGAGCATCTACAGCTCGGAAT R: TTTGTTTGCTGGAATCTCAGGCACC | Cps16K | 202 | 16 |
| 2 | F: ACTTGGAGTTGTCTGGAGTAGTGCT R: ACCGCGATGGATAGGCCGAC | cps4M–cps4N | 783 | 4 |
| | F: TGATGGCGGAGTTTGGGTTCGC R: CGTAACAACCGCCCCAGCCG | cps5N | 166 | 5 |

Продовження таблиці 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|--------|------|---|
| 2 | F: ATGGGCGTTGGCGGGAGTTT R: TTACGGCCCCCATCACGCTG | cps8H | 320 | 8 |
| | F: TGTGGCGATAGGACAACAGG R: ACCAAGAAGTTTCCGCCTGA | cps12J | 209 | 12 |
| | F: CGGGGCAGTCTTACTCATGG R: ATGACAGCGAAACGGACAGA | cps18N | 432 | 18 |
| | F: AGCAGGGTTGCGTATGGCGG R: ACAAGCACCAGCAAAGACCGCA | cps19L | 1024 | 19 |
| | F: ACCCGGAAAAACCAGGAGTT R: ACCAATCAATGCCAAGCGAC | cps24L | 500 | 24 |
| | F: GGAGGAGCTGCGGGCTCATA R: TGGCCACAACCTGGATGCGTT | cps25M | 1211 | 25 |
| 3 | F: TACGGTCTCCCTTGCCTGTA R: AACTCAGCTAGTGCTCCACG | cps6I | 325 | 6 |
| | F: TTACGAGGGGATTCTGGGGT R: CGGGACAACAGATGGAACCT | cps10M | 153 | 10 |
| | F: CTGGTGCTGCAATTTTCGCTT R: GCAGACTAGCTGCAGTTCCA | cps13L | 1135 | 13 |
| | F: GCAAGAAAGCTTCCGGATGGA R: CAAGAGAGTGTGCAACCCCA | cps15K | 274 | 15 |
| | F: ACTTGGGTTGGAATGGCGAA R: ACCACCGAAAGTCAGGTCAC | cps17O | 906 | 17 |
| 4 | F: TTCTGCAGCGTATTCTGTCAAACG R: TGTTCATGGACAGATAAAGATGG | gdh | 695 | Ідентифікація <i>Streptococcus suis</i> до виду |

Для проведення ПЛР, використовували температурний режим ампліфікації, представлений в таблиці 2.

Таблиця 2

Програма температурного режиму ампліфікатора для проведення ПЛР

| Етап | Режим | Кількість циклів |
|------|-------------|-----------------------|
| 1 | 95°C – 10хв | 1 |
| 2 | 62°C – 90с | 5 |
| | 95°C – 20 с | |
| | 62°C – 90с | |
| 3 | 62°C – 90с | 30 |
| | 95°C – 20 с | |
| | 62°C – 90с | |
| 4 | 72°C – 5 хв | 1 |
| 5 | 10°C | Зберігання ампліконів |

Аналіз продуктів ампліфікації проводили стандартним методом шляхом розділення фрагментів ампліфікованих фрагментів ДНК у 1,5% гелі агарози (Bio-Rad).

Результати експериментальних досліджень оброблені загальноприйнятими методами статистики з використанням програмного пакету «R studio».

Результати досліджень та їх обговорення. За результатами досліджень морфологічних та культуральних властивостей всі досліджені ізоляти було віднесено до виду *S. suis* із наявністю α -гемолізу.

Хоча в літературі [6, 7] зустрічаються повідомлення про відмінності щодо ферментативних властивостей, які можуть виявлятися у різних серотипів збудника стрептококозу свиней, ми отримали ідентичні характеристики для всіх досліджених ізолятів. Так, всі ізоляти ферментували рафінозу із утворенням кислоти без газу, D-глюкозу, лактозу, галактозу, мальтозу, саліцин, трегалозу, інулін, що підтверджувало ознаки виду *S. suis*. Всі штами мали позитивну реакцію на β -галактозидазу та продукували гіалуронідазу (рис. 1).



В

**Рис. 1. Типові біохімічні властивості *S. suis*, встановлені за допомогою тест-набору API 20 STREP (Biomérieux, France)
(А – негативний тест, В – позитивний тест).**

У проведеному дослідженні використана нами мультиплексна ПЛР дозволила виявити *S. suis* із одночасним ідентифікуванням 8 його серотипів. Оскільки особливості таргетного гену не дозволяють відрізнити серотипи 2 та 1/2, а також 14 та 1. Однак застосований підхід може виступати альтернативою ІФА тесту та не потребує якісно отриманої сироватки крові. На електрофореграмі (рис. 2 та 3) показані характерні смужки ампліконів, отриманих в результаті проведених досліджень.

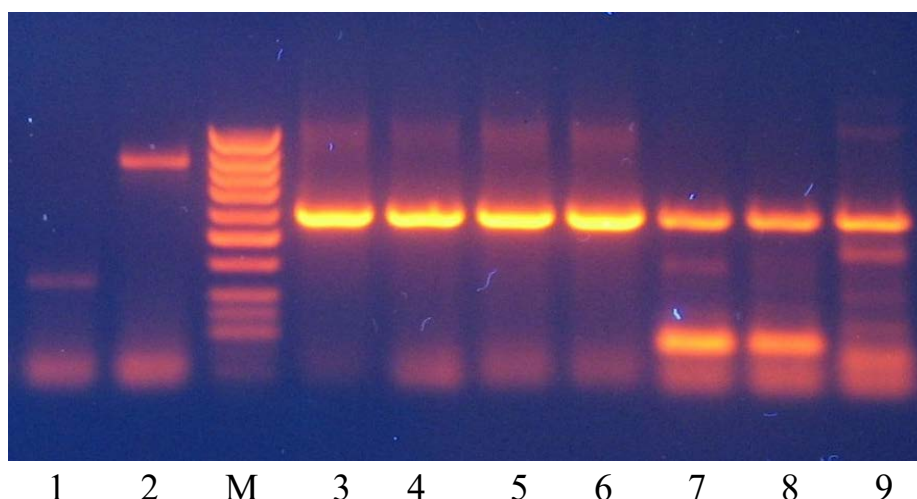


Рис. 2. Електрофореграма результатів серотипування ізолятів збудника стрептококозу свиней 1–*Micrococcus luteus* (негативний контроль); 2– *S. faecalis* (негативний контроль), 3–6 – *S. suis* серотип 7; 7–8 – *S. suis* серотип 1 та 14; 9 – серотип 5; М – маркер молекулярної ваги.

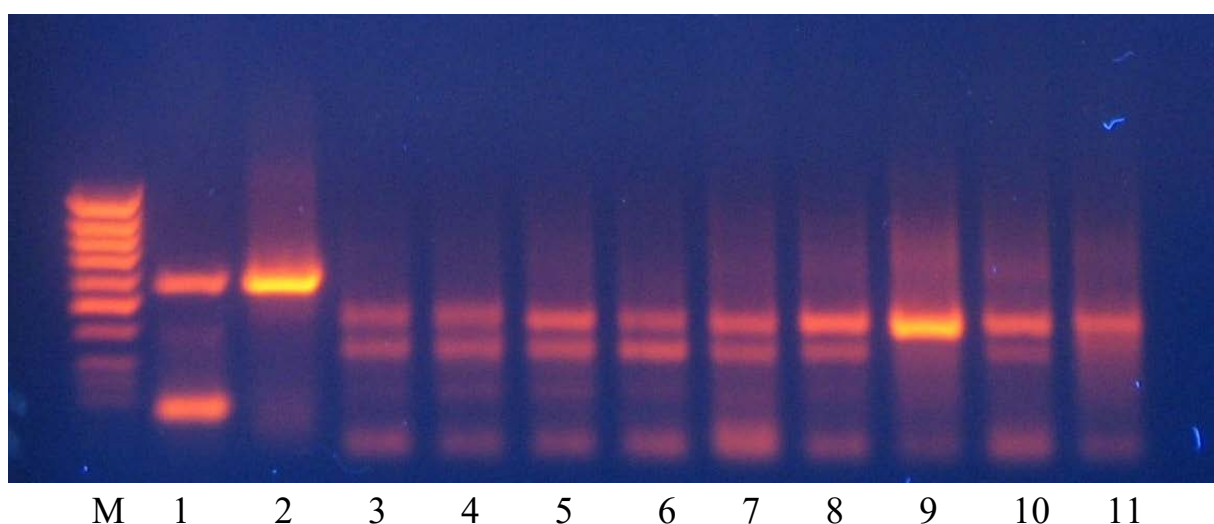


Рис. 3. Електрофореграма результатів серотипування ізолятів збудника стрептококозу свиней (1,2 – *S. suis* серотип 7; 3–8, 10 – *S. suis* серотип 2 та ½; 9, 11 – *S. suis* серотип 10; М– маркер молекулярної ваги.

Результати серотипування ізолятів із різного патологічного матеріалу представлені в таблиці (табл. 3).

Таблиця 3

Результати серотипування *Streptococcus suis*, виділеного із зразків патологічного і біологічного матеріалу, відібраних із трупів свиней, n=32

| Вид патологічного матеріалу | Кількість виділених ізолятів | Серотип |
|--------------------------------------|------------------------------|---------------------|
| Головний мозок | 4 | 2, 1/2 |
| Легені | 6 | 2, 7, 10 |
| Селезінка | 4 | 2, 1/2 |
| Синовіальна рідина уражених суглобів | 7 | 1, 2, 1/2, 14, 5, 7 |
| Середостінні лімфатичні вузли | 2 | 2 |
| Печінка | 2 | 2, 1/2 |
| Кров | 7 | 1, 2, 1/2, 7, 14 |

Як видно з таблиці 3, найчастіше *S. suis* ізолювали із синовіальної рідини суглобів за артритів – виявлено серотипи 1, 2, 1/2, 14, 5, 7 та крові – 1, 2, 1/2, 7, 14. З легень виділяли серотипи 2, 7 та 10, з головного мозку та селезінки – 2 та 1/2. Таким чином, переважними серотипами, які викликали тяжкі ураження у свиней, були 1, 2, 1/2, 5, 7, 10, 14.

Згідно даних, представлених в таблиці 4, найбільша кількість ізолятів збудника стрептококозу свиней припадає на вікові групи поросят-сисунів (28,2%) та відлученців (53,1%), тобто від народження до 4 місяців. В цих вікових групах виявлено циркулювання серотипів 2, 1/2, 1, 14, 5, 7. У зразках від новонароджених поросят виявлено серотип 2 та 1/2, а для тварин на відгодівлі характерно циркулювання серотипів 7 та 10, які згідно літературних даних та наших спостережень, можуть ускладнювати перебіг інших інфекційних захворювань.

Таблиця 4

Результати серотипування *S. suis* з біологічного матеріалу, отриманого від свиней різних вікових груп

| Група тварин | Кількість виділених ізолятів | % від всіх досліджених ізолятів | Серотип |
|-------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Поросята новонароджені | 1 | 3,1 | 2, 1/2 |
| Поросята сисуні (до двох місяців) | 9 | 28,2 | 2, 1/2 |
| Поросята відлученці (3-4 місяці) | 17 | 53,1 | 2, 1/2, 1, 14, 5, 7 |
| Тварини на відгодівлі (3-9 місяців) | 4 | 12,5 | 7, 10 |
| Дорослі тварини (старше 9 місяців) | 1 | 3,1 | 7 |
| Всього | 32 | 100 | |

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. В результаті проведених досліджень встановлено, що застосування методу мультиплексної ПЛР дозволяє виявити не лише видову приналежність *Streptococcus suis*, але й встановити серотип.

2. Аналіз результатів досліджень ураження стрептококозом свиней різних вікових груп показав, що переважна кількість виявлених випадків припадає на поросят-сисунів (28,2%) та групу на відлученні (53,1%), серед яких циркулюють переважно серотипи 1, 2, 1/2, 5, 7, 10, 14.. Для тварин на дорощуванні характерно циркулювання серотипів 7 та 10.

Застосування ПЛР для серотипування *S. suis* в Україні є важливим для визначення переважаючих серотипів з метою підбору оптимального складу вакцини для специфічної профілактики стрептококозу свиней.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs / F.A. Clifton-Hadley, T.J. Alexander, I. Upton [et al.] // Vet Rec. – 1984. – № 114. – P. 513–518. <https://doi.org/10.1136/vr.114.21.513>.
2. Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method / L.A. Devriese, K. Ceysens, J. Hommez [et al.] // Veterinary Microbiol. – 1991. – № 26. – P. 141–150. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90050-p](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90050-p).
3. Higgins R. An update on *Streptococcus suis* identification / R. Higgins, M. Gottschalk // J. Vet. Diagn. Invest. – 1990. – № 2. – P. 249–252. <https://doi.org/10.1177/104063879000200324>.
4. *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms / R.Y. Reams, L.T. Glickman, D.D. Harrington [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 1994 – № 6. – P. 326–334. <https://doi.org/10.1177/104063879400600308>.
5. Lamont M.H. Streptococcal meningitis in pigs: Results of a five-year survey / M.H. Lamont, P.T. Edwards, R.S. Windsor // Vet. Rec. – 1980. – № 107. – P. 467–469. <https://doi.org/10.1136/vr.107.20.467>.
6. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muraminidase-released protein and extracellular factor / L. Galina, U. Vecht, H.J. Wisselink [et al.] // Can. J. Vet. Res. – 1996. – № 60. – P. 72–74.
7. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis* / M. Gottschalk, R. Higgins, M. Jacques [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1991. – № 29, – P. 2590–2594. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.11.2590-2594.1991>.
8. Mwaniki C.G. The prevalence of *Streptococcus suis* type 2 in Western Australian piggeries / C.G. Mwaniki, I.D. Robertson, D.J. Hampson // Australian Vet. J. – 1994. – № 71. – P. 385–386. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1994.tb00938.x>.
9. Salasia S.I. Distribution of serotype, virulence markers and further characteristics of *Streptococcus suis* isolates from pigs / S.I. Salasia, C. Lammler // Zentralbl. Veterinarmed. – 1995. – № 42. – P. 78–83. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1995.tb00685.x>.
10. Comparative studies on the pathogenicity of different *Streptococcus suis* type 1 strains / N. Stockhofe-Zurwieden [et al.] // Proceedings of the 14th IPVS Congress, Bologna, 1996. – P. 299.

11. Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* are absent in pathogenic strains / H.E. Smith, F.H. Reek, U. Vecht [et al.] // Infect. Immun. – 1993. – № 61. – P. 3318–3326. <https://doi.org/10.1128/iai.61.8.3318-3326.1993>.

12. Fifteen *Streptococcus suis* serotypes identified by multiplex PCR / A. Kerdsin, S. Dejsirilert, Y. Akeda [et al.] // J Med Microbiol. – 2012. – 61. – P. 1669–1672.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ СЕРОТИПОВ STREPTOCOCCUS SUIS НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ / Тарасов А.А., Захарова А.Н., Гудзь Н.В., Савченко Н.А.

В статье приведены результаты исследований по серотипизации 32 изолятов Streptococcus suis, выделенных из патологического материала на территории Украины.

В результате проведенных исследований установлено, что применение метода мультиплексной ПЦР позволяет выявить серотипы Streptococcus suis, которые являются преобладающими в популяции свиней в Украине. Анализ результатов исследований поражения стрептококкозом свиней различных возрастных групп показал, что подавляющее количество выявленных случаев приходится на поросят-сосунков (28,2%) и группу на отъёме (53,1%), среди которых циркулируют высоковирулентные серотипы 2, 1/2, 1, 14, 5, 7. Для животных на доращивании выявлено циркулирование серотипов 7 и 10.

Ключевые слова: *Streptococcus suis*, серотип, ПЦР, изолят, патогенность.

DISSEMINATION OF STREPTOCOCCUS SUIS SEROTYPES IN UKRAINE / Tarasov O.A., Zakharova O.M., Hudz N.V., Savchenyuk M.O.

Introduction. *Streptococcus suis* is widely disseminated pathogen of pig industry in the world. Today are known more than 35 different capsular serotypes of *S. suis*. In the last years it was registered the significant growth of streptococcal infections prevalence. Considering these, the issue of prevention and treatment of streptococcosis is important for pig industry sustainability.

The goal of the work was to detect of the predominant serotypes of *Streptococcus suis* strains isolated in Ukraine using PCR test.

Materials and methods. It was used 32 isolates and reference strain NCTC 10234 of *Streptococcus suis* from museum of the Institute of veterinary medicine NAAS. Studies of morphological and cultural properties were performed using conventional bacteriological methods.

The serotype of isolates was determined by multiplex PCR test (classical conventional method with electrophoretic reading of results) using three sets of primers recommended by Kerdsin et al. (2012), as well as an additional pair of primers to determine the species. The assay parameters were optimized by us.

The results of experimental studies are processed by conventional methods of statistics.

Results of research and discussion. Isolates from different regions of Ukraine were confirmed as *S. suis* by cultural, morphological, enzymatic and biological properties. In our study, the multiplex PCR used by us revealed 8 serotypes of *S. suis*. At the same time, the type of microorganism was identified. *Streptococcus suis* predominantly was isolated from the synovial fluid of the joints affected by arthritis – serotypes 1, 2, 1/2, 14, 5, 7 and from blood – serotypes 1, 2, 1/2, 7, 14 were detected. Serotypes 2, 7 and 10 were isolated from the lungs, and from brain and spleen – serotypes 2 and 1/2. Thus, the predominant serotypes that caused severe lesions in pigs were 1, 2, 1/2, 5, 7, 10, 14.

The largest number of isolates of the causative agent of swine streptococcus occurs in the age groups of suckling piglets (28.2%) and weaners (53.1%), i.e. from birth to 4 months. Circulation of serotypes 2, 1/2, 1, 14, 5, 7 was detected in these age groups. Serotypes 2 and 1/2 were detected in samples from newborn piglets, and serotypes 1, 14 and 7, which are less pathogenic and act as opportunistic, were isolated from biomaterial of fattening pigs in which a subclinical form of streptococcus was registered in most cases.

Conclusions and prospects for further research:

1. As a result of the conducted researches it was established that the method of multiplex PCR allows to detect serotypes of *Streptococcus suis* which are prevalent in population of pigs in Ukraine.

2. Analysis of the results of streptococcal seroprevalence in pigs of different age groups showed the majority of detected cases are suckling piglets (28.2%) and weaning group (53.1%), among which circulate mainly highly virulent serotypes 2, 1/2, 1, 14, 5, 7. Circulation of serotypes 7 and 10 is typical for adult animals and group of fattening pigs.

The using of PCR for *S.suis* serotyping in Ukraine is important to determining the predominant serotypes in order to select the optimal composition of the vaccine for the specific prevention of swine streptococcosis

Keywords: *Streptococcus suis*, serotype, PCR, isolate, pathogenicity.

REFERENCES

1. Clifton-Hadley, F.A., Alexander, T.J.L., Upton, I., & Duffus, W.P.H. (1984). Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. *Vet Rec.*, 114, 513-518. <https://doi.org/10.1136/vr.114.21.513>.
2. Devriese, L.A., Ceysens, K., Hommez, J., Kilpper-Bälz, R., & Schleifer, K.H. (1991). Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method. *Veterinary Microbiol.*, 26, 141-150. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90050-p](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90050-p).
3. Higgins, R., & Gottschalk, M. (1990). An update on *Streptococcus suis* identification. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2, 249-252. <https://doi.org/10.1177/104063879000200324>.
4. Reams, R.Y., Glickman, L.T., Harrington, D.D., Thacker, H.L., & Bowersock, T.L. (1994). *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6, 326-334. <https://doi.org/10.1177/104063879400600308>.
5. Lamont, M.H., Edwards, P.T., & Windsor, R.S. (1980). Streptococcal meningitis in pigs: Results of a five-year survey. *Vet. Rec.*, 107, 467-469. <https://doi.org/10.1136/vr.107.20.467>.
6. Galina, L., Vecht, U., Wisselink, H.J., & Pijoan, C. (1996). Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muraminidase-released protein and extracellular factor. *Can. J. Vet. Res.*, 60, 72-74.
7. Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M., Beaudoin, M., & Henrichson, J. (1991). Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 2590-2594. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.11.2590-2594.1991>.
8. Mwaniki, C.G., Robertson, I.D., & Hampson, D.J. (1994). The prevalence of *Streptococcus suis* type 2 in Western Australian. *Australian Vet. J.*, 71, 385-386. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1994.tb00938.x>.
9. Salasia, S.I., & Lammler, C. (1995). Distribution of serotype, virulence markers and further characteristics of *Streptococcus suis* isolates from pigs. *Zentralbl. Veterinarmed.*, 42, 78-83.

10. Stockhofe-Zurwieden, N., Vecht, U., Wisselink, H.J., Van Lieshout, H., & Smith, H.E. (1996). Comparative studies on the pathogenicity of different *Streptococcus suis* type 1 strains. Proceedings of the 14th IPVS Congress. (p. 299). Bologna.
11. Smith, H.E., Reek, F.H., Vecht, U., Gielkens, A.L.J., & Smits, M.A. (1993). Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* are absent in pathogenic strains. *Infect. Immun.*, 61, 3318-3326. <https://doi.org/10.1128/iai.61.8.3318-3326.1993>.
12. Kerdsin, A., Dejsirilert, S., Akeda, Y., Sekizaki, T., Hamada, S., Gottschalk, M., & Oishi, K. (2012). Fifteen *Streptococcus suis* serotypes identified by multiplex PCR. *J Med Microbiol.*, 61, 1669-1672. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.048587-0>.