

# LA CARATTERIZZAZIONE DI *STREPTOCOCCUS SUIIS* ISOLATI DA FOCOLAI DI MALATTIA NEGLI ALLEVAMENTI ITALIANI RIVELA LA DIFFUSIONE DI NUOVI CLONI CON POTENZIALITA' ZONOSICA E RESISTENTI AGLI ANTIBIOTIVI

## ***STREPTOCOCCUS SUIIS FROM DISEASED PIGS: EMERGENCE OF NEW SEQUENCE TYPES AND ANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS IN ITALY***

CUCCO L.<sup>1</sup>, PANICCIA' M.<sup>1</sup>, MASSACCI F.R.<sup>1</sup>, MORELLI A.<sup>1</sup>, ANCORA M.<sup>2</sup>, MANGONE I.<sup>2</sup>, DI PASQUALE A.<sup>2</sup>, LUPPI A.<sup>3</sup>, VIO D.<sup>4</sup>, ROLLA U.<sup>5</sup>, CAMMA' C.<sup>2</sup>, MAGISTRALI C.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati";

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "Giuseppe caporale";

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini";

<sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

<sup>5</sup> Gruppo Martini s.p.a.

**Parole chiave:** *Streptococcus suis*, sierotipo, Sequence Type

**Key words:** *Streptococcus suis*, serotype, Sequence Type

### **RIASSUNTO**

*Streptococcus suis* è un importante patogeno, associato a una grave malattia nei suini e nell'uomo. Le infezioni umane hanno origine zoonotica dai suini. In questo studio abbiamo caratterizzato i sierotipi (SS), i *Sequence Type* (ST) e la suscettibilità agli antibiotici di 78 isolati di *S. suis* da focolai di infezione verificatisi negli allevamenti di suini italiani nel periodo 2017-2019. SS2 e SS9 sono responsabili di quasi il 70% delle infezioni. Tutti gli isolati SS2, tranne uno, sono confinati in un singolo cluster, mentre gli isolati SS9 sono distribuiti lungo l'albero filogenetico. Il cluster SS2 è composto da ST1 e ST7, che è associato a gravi infezioni umane in Cina e che non è mai stato rilevato nei suini europei. Un'ampia percentuale di isolati SS9, assegnati a ST123, è risultata resistente alla penicillina. Questo clone emergente minaccia il successo del trattamento dell'infezione da *S. suis*. Il nostro studio evidenzia l'importanza della caratterizzazione degli isolati di *S. suis* dai suini per una diagnosi precoce di cloni emergenti.

### **ABSTRACT**

*Streptococcus suis* is a major pathogen, associated with severe disease in pigs and in man. Human infections have a zoonotic origin from pigs. We characterized the serotypes (SS), sequence types (STs) and antibiotic susceptibility of 78 *S. suis* isolates from outbreaks of infection occurred on Italian pig farms during 2017-2019. SS2 and SS9 caused almost 70% of infections. All SS2 isolates, except one, were confined in a single cluster, while SS9 isolates were distributed along the phylogenetic tree. SS2 cluster was composed by ST1 and ST7, which is associated with severe human infections in China and which was never detected in European pigs. A large proportion of SS9 isolates, assigned to ST123, was resistant to penicillin. The emergence of this clone threatens the successful treatment of *S. suis* infection. Our study highlights the importance of the characterization of *S. suis* isolates from pigs for the early detection of emerging clones.

## INTRODUZIONE

*Streptococcus suis* è considerato uno dei patogeni più importanti nel settore suinicolo e un agente zoonotico emergente (Principalli et al., 2009). Nel suino *S. suis* è considerato un commensale delle vie aeree superiori, delle tonsille, del tratto enterico e genitale di animali sani che quindi possono fungere da *carrier* e trasmettere l'infezione ai soggetti sensibili, con la comparsa di manifestazioni cliniche, soprattutto in suini al di sotto delle 12 settimane di vita (Segura et al., 2017). Nel post-svezzamento, *S. suis* è associato a casi di setticemia, meningiti, polisierositi, endocarditi, artriti e polmoniti. Nell'uomo, negli ultimi anni è stato registrato un aumento dei casi di infezioni, condizioni setticemiche e meningiti causate da *S. suis*, soprattutto nei paesi asiatici dove la malattia è endemica. Diversamente, nei paesi occidentali la malattia è sporadica e di origine occupazionale (Goyette-Desjardins et al., 2014). *S. suis* è una specie eterogenea. Fino al 2005 i sierotipi capsulari di *S. suis* erano 35 (SS1-34 e 1/2), classificati sulla base delle caratteristiche antigeniche dei lipopolisaccardi capsulari. Recenti studi hanno tuttavia dimostrato che sei di questi sierotipi (20, 22, 26, 32, 33 e 34) sono stati riclassificati come appartenenti ad altre specie del genere *Streptococcus*. Pertanto i sierotipi attualmente riconosciuti sono 29 (Louise Prüfer et al., 2019). La maggior parte delle infezioni nell'uomo e nel suino sono causate dal SS2 ma i sierotipi predominanti che causano malattie nei suini variano a seconda del periodo e dell'area geografica. In alcuni paesi Europei, inclusi Germania, Belgio, Spagna e Olanda, SS9 è diventato la principale causa di malattia nei suini (Zheng et al., 2018). Un aumento di *S. suis* SS9 è stato registrato recentemente anche in Cina. Il potenziale patogeno di ceppi di *S. suis* varia all'interno dello stesso sierotipo. Per discriminare gli isolati virulenti è stato proposto uno schema di tipizzazione molecolare basato sull'identificazione di 3 fattori di virulenza: *muraminidase-released protein* (MRP), *extracellular factor* (EF) e *sulfolysin* (SLY) (Goyette-Desjardins et al., 2014). A partire dal 2002 è stato introdotto uno schema di *multilocus sequence typing* (MLST) che ha permesso di migliorare la descrizione dell'epidemiologia delle infezioni causate da *S. suis*. I *Sequence Type* (ST) permettono di predire la patogenicità di un particolare isolato più del sierotipo (Estrada et al., 2019). Tra gli isolati di SS2 dei suini, ST1, un clone associato alla maggior parte dei casi umani a livello globale, è prevalente in Europa, mentre ST25 e ST28, che sono meno virulenti, predominano negli Stati Uniti e in Canada (Goyette-Desjardins et al., 2014). È interessante notare che un altro ST di SS2, ST7, è stato il responsabile delle principali epidemie da *S. suis* nell'uomo, verificatesi nel 1998 e nel 2005 in Cina (Ye et al., 2008). I sierotipi diversi da SS2 sono meno frequentemente associati a casi umani. Da notare che, nonostante le infezioni nel suino siano spesso causate da SS9, il primo caso umano di infezione da SS9 è stato documentato solo nel 2015, in Thailandia (Kerdsin et al., 2020). Questo ceppo SS9 è stato assegnato a ST16, un ST emergente noto per il suo maggiore potenziale di virulenza e predominanza nelle infezioni da *S. suis* nei suini nei Paesi Bassi (Willemse et al., 2019). La protezione conferita dai vaccini ad oggi disponibili non è eterologa, ma ristretta al sierotipo (O'Dea et al., 2018). Pertanto, in molti paesi europei, compresa l'Italia, il controllo delle infezioni da *S. suis* nei suini si basa principalmente sul trattamento antibiotico. *S. suis* è generalmente suscettibile ai beta-lattamici, la principale classe di antibiotici somministrati per controllare l'infezione negli allevamenti di suini. Al contrario, *S. suis* è quasi sempre resistente alla tetraciclina; macrolide-lincosamide-streptogramina B (MLSB); e, meno frequentemente, aminoglicosidi, cloramfenicolo, vancomicina e linezolid (Du et al., 2019). In *S. suis*, i geni che codificano la resistenza agli antibiotici sono spesso trasportati su elementi genetici mobili che possono essere trasferiti ad altri membri del genere, compresi i patogeni umani (Palmieri et al., 2011). Pertanto *S. suis* può essere considerato un problema di salute pubblica sia per il suo potenziale zoonotico che come riserva di geni di resistenza agli antibiotici. Le informazioni sui ceppi circolanti sono

essenziali. Tali informazioni sono lacunose in molti paesi, compresa l'Italia, che è uno dei più importanti paesi produttori di suini in Europa. Lo scopo di questo studio è stato quello di determinare i sierotipi, i ST e la suscettibilità agli antibiotici di ceppi di *S. suis* isolati da focolai negli allevamenti di suini italiani dal 2017 al 2019.

## MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 78 isolati di *S. suis* derivanti dall'attività diagnostica degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali Umbria-Marche, Lombardia-Emilia Romagna e delle Venezie nel periodo 2017-2019. Un isolato per allevamento è stato incluso nel presente lavoro. Gli isolati provenivano da 10 differenti regioni del Nord e Centro Italia e sono stati isolati da meningiti (49), pericarditi (1), artriti (3), setticemia (17) e polmoniti (8). Le colonie con morfologia riconducibile a *S. suis*, cresciute in Agar Sangue (5% globuli rossi di montone) a 37°C in CO<sub>2</sub>, sono state isolate e l'attribuzione di specie confermata mediante MALDI-TOF (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics). Le colonie sono state sottoposte a tipizzazioni molecolari per la determinazione del sierotipo capsulare (Okura et al., 2014) e dei geni codificanti i principali fattori di virulenza *mrp*, *sly* ed *epf* (Wisselink et al., 1999; (Silva et al., 2006); King et al., 2001). I DNA di ceppi appartenenti ai sierotipi 3 e 14, gentilmente forniti dal Prof. M. Gottschalk (Università di Montreal, Quebec, Canada), sono stati usati come controlli.

Successivamente gli isolati sono stati testati per la determinazione della sensibilità agli antimicrobici mediante metodo della diluizione in brodo, usando un pannello commerciale 96-wellmicrotitre MIC (BOP06F, Sensititre; Trek Diagnostic Systems Inc., England) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 è stato usato come controllo di qualità.

Gli antibiotici testati e i relativi intervalli di concentrazione sono stati i seguenti: ampicillina (Amp) 0,25-16 µg/ml, ceftiofur (Cef) 0,25-8 µg/ml, enrofloxacin (Enr) 0,12-2 µg/ml, florfenicolo (Ffc) 0,25-8 µg/ml, penicillina (P) 0,12-8 µg/ml, tetraciclina (Te) 0,5-8 µg/ml e sulfametossazolo+trimetoprim (Sxt) 2/38 µg/ml. I valori di MIC sono stati interpretati usando i breakpoint del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI VET08 5th Edition, 2019) per *S. suis* (patologie respiratorie del suino) tranne Sxt per il quale sono stati utilizzati i breakpoint per *S. pneumoniae* per l'uomo.

Il DNA genomico di colture pure dei 78 isolati di *S. suis* è stato estratto utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) per poi essere sottoposto a sequenziamento utilizzando una piattaforma Illumina NextSeq 500. Le sequenze ottenute sono state utilizzate per la determinazione del *Sequence Type* (ST) utilizzando *S. suis* MLST database (<https://pubmlst.org/ssuis/>). I nuovi profili allelici e le nuove combinazioni di profili sono stati ottenuti caricando le sequenze *S. suis* MLST database (<https://pubmlst.org/ssuis/>).

I genomi sono stati poi annotati usando Prokka (Seemann, 2014) e analizzati per la costruzione di un albero filogenetico *maximum likelihood* (ML) con FastTree 2.1 (Price et al., 2010) e iTOL v.5.7 per le annotazioni manuali, utilizzando l'allineamento del *core genome* prodotto da Roary (Page et al., 2015).

## RISULTATI

Undici diversi sierotipi (SS) sono stati individuati in questo studio: 1-14, 2-1/2 (SS2), 4, 5, 7, 8, 9, 10, 15, 19, e 23. I SS2 e 9 sono stati rilevati più frequentemente, rispettivamente nel 34.6% (27) e 32.1% (25) degli isolati, seguiti dai SS10 (7, 9%) e SS7 (7.7%). L'analisi di MLST ha rilevato che 59 isolati (74.7%) appartengono a 9 ST (ST1, ST7, ST11, ST16, ST28, ST29, ST94, ST108, e ST123) già presenti nel *S. suis* MLST database, mentre i restanti 19 isolati (24.4%) appartengono a 10 nuovi ST (ST1540-ST1549). I dati relativi ai ST, i sierotipi

capsulari e i genotipi di virulenza dei 78 isolati inclusi in questo studio sono mostrati in Tabella 1. ST1 e ST123 sono i 2 ST predominanti con 17 isolati ognuno e rappresentano il 43% di tutti i ceppi analizzati. Tutti gli isolati appartenenti al ST29 sono SS7 e tutti gli isolati ST11 sono SS1-14. Gli isolati SS2 sono risultati piuttosto omogenei in quanto appartenenti al ST1 (63%) e in misura minore a ST7 (33%) e solo 1 isolato ST28. Grande omogeneità è stata riscontrata tra gli isolati appartenenti al SS7, tutti ST29, al SS10, tutti ST1547 e tra quelli appartenenti al SS1-14, tutti ST11. I più eterogenei sono risultati gli isolati SS9 risultati appartenere per la maggior parte (68%) a ST123 e ai ST: ST94 (4%), ST16 (12%), ST1540 (12%) e ST1541 (4%).

**Tabella 1.** Distribuzione dei geni di virulenza tra i ST. E' riportato il numero di isolati sul totale degli isolati per ogni ST (%)

**Table 1.** Combination of putative virulence genes among STs. The number of isolates out of the total of isolates for each ST are reported (%)

<i>Sequence types</i>	<b>Sierotipi</b>	<b>Profilo di virulenza</b>	<b>Numero di isolati/Totale numero di isolati per ogni ST (%)</b>
ST1	2	<i>mrp/sly/epf</i>	17/17 (100)
ST7	2	<i>mrp/sly/epf</i>	9/9 (100)
ST11	1	<i>mrp/sly/epf</i>	2/2 (100)
ST16	9	<i>mrp/sly</i>	3/3 (100)
ST28	2	<i>mrp/sly</i>	1/1 (100)
ST29	7	<i>mrp</i>	3/6 (50)
		<i>mrp</i>	3/6 (50)
ST94	4	<i>mrp/sly</i>	2/3 (66.7)
	9	<i>mrp/sly</i>	1/3 (33.3)
ST108	23	<i>mrp/sly</i>	1/1 (100)
ST123	9	<i>mrp/sly</i>	17/17 (100)
ST1540	9	-	3/3 (100)
ST1541	9	-	1/1 (100)
ST1542	3	-	1/1 (100)
ST1543	4	<i>mrp/sly</i>	1/1 (100)
ST1544	4	<i>mrp/sly</i>	1/2 (50)
	5	<i>mrp/sly</i>	1/2 (50)
ST1545	8	<i>mrp</i>	1/1 (100)
ST1546	8	<i>mrp/sly</i>	1/1 (100)
ST1547	10	-	7/7 (100)
ST1548	15	<i>sly</i>	1/1 (100)
ST1549	19	-	1/1 (100)

La Tabella 2 mostra la distribuzione degli isolati di *S. suis* tra i differenti valori di MIC degli antibiotici testati. Sette isolati (9%) sono resistenti ad un unico antibiotico, solitamente la tetraciclina (6/7). La maggior parte degli isolati (48/78, 61.5%) è resistente a 2 antibiotici, (45/48) clindamicina e tetraciclina e infine 23/78 (29.5%) isolati sono risultati resistenti ad almeno 3 antibiotici e quindi classificati come multi-resistenti.

**Tabella 2.** Distribuzione dei valori di MIC tra i 78 isolati di *S. suis*. Tra parentesi sono indicate le percentuali. L'area colorata rappresenta il range di concentrazioni testate per ciascun antibiotico. Le linee verticali indicano la soglia per la resistenza secondo quanto indicato dal CLSI

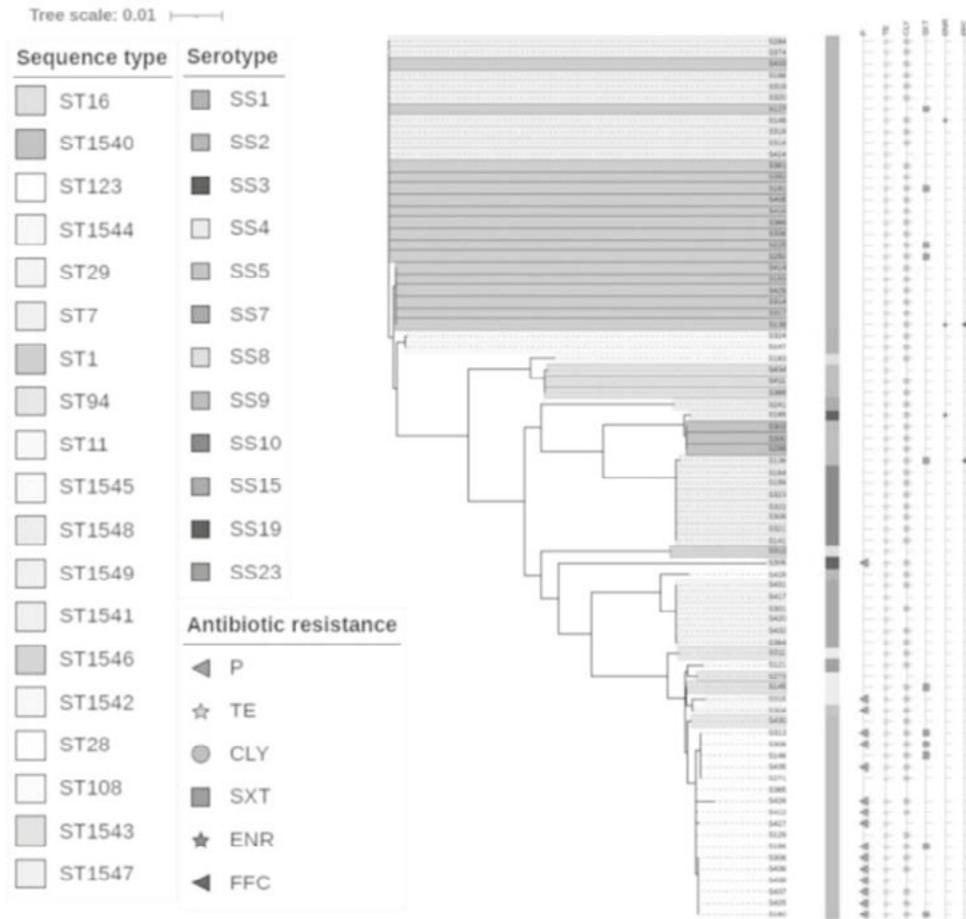
**Table 2.** Distribution of MIC values among the 78 *S. suis* isolates. Percentages are shown in brackets. Shaded areas show the range of values actually tested for each antibiotic. Vertical bars indicate the threshold values for clinical resistance, according to CLSI

Molecola antibiotica	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Penicillina	49 (63)	7 (9)	5 (6)	14 (18)	3 (4)								
Ampicillina		73 (94)	2 (3)	3 (4)									
Enrofloxacin		1 (1)	17 (22)	57 (73)	2 (3)	1 (1)							
Tetraciclina				1 (1)	3 (4)	1 (1)		73 (94)					
Florfenicolo		1 (1)	3 (4)	40 (51)	32(41)		2 (3)						
Trimethoprim/ sulfamethoxazole					67 (86)	11 (14)							
Clyndamicina		8 (10)				4 (5)	4 (5)	10 (13)	50 (64)				
Tylosina			15 (19)							61 (78)			
Neomicina						22 (28)	27 (35)	15 (19)	7 (9)	5 (6)			
Gentamicina				12 (15)	39 (50)	17 (22)	6 (8)		2 (3)				
SDM											19 (24)		57 (73)

L'albero filogenetico dei 78 isolati inclusi in questo studio è mostrato in Figura 1.

**Figura 1.** Albero filogenetico prodotto utilizzando iTOL (<https://itol.embl.de/>). L'albero contiene i 78 isolati di *Streptococcus suis* sequenziati nel presente studio. I *sequence type* (ST) ed i sierotipi (SS) di ciascun isolato sono rappresentati nell'albero. Le molecole resistenti agli antibiotici sono annotate da forme che indicano la presenza di penicillina (P, triangoli rossi), tetraciclina (TE, asterischi azzurri), clindamicina (CLY, cerchi rosa), trimethoprim / sulfametossazolo (SXT, quadrati blu), enrofloxacin (ENR, asterischi verdi) e florfenicolo (FFC, triangoli marroni).

**Figure 1.** Phylogenetic tree inferred using iTOL's interactive user interface (<https://itol.embl.de/>). The tree contains all 78 *Streptococcus suis* isolates sequenced in this study. Shading over tip labels indicates the sequence types (STs). The serotypes of each isolate are also shown. The antibiotic-resistant molecules are annotated by shapes indicating the presence of penicillin (P, red triangles), tetracycline (TE, light blue asterisks), clindamycin (CLY, pink circles), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT, blue squares), enrofloxacin (ENR, green asterisks), and florfenicol (FFC, brown triangles).



L'analisi filogenetica mostra che gli isolati si raggruppano in 4 grandi *cluster*. Il primo *cluster* è composto dai SS1 e SS2 ed è caratterizzato da bassa eterogeneità nonostante questi isolati provenivano da differenti regioni e differenti organi. Il secondo *cluster* è composto dai 4 isolati SS8 e 9, mentre il terzo *cluster* è composto da 2 gruppi: il primo composto dai SS9, 15 e 23 e il secondo dai SS10 isolati da 7 casi di meningite, 6 dei quali in Piemonte (2018). Il quarto *cluster* comprende il maggior numero di isolati inclusi in questo studio, appartenenti a 6 differenti sierotipi. Non sono state osservate correlazioni con la localizzazione geografica, l'anno o l'origine degli isolati all'interno di quest'ultimo cluster ma tutti gli isolati SS9 resistenti alla penicillina sono raggruppati in questo *cluster*.

## DISCUSSIONE

Questo lavoro descrive i sierotipi, i ST e la suscettibilità agli antimicrobici di 78 isolati di *S. suis* provenienti da altrettanti focolai di streptococcosi in 78 allevamenti suini in Italia, dove una analisi della distribuzione dei ST non era stata intrapresa negli ultimi 20 anni. Oltre ad essere di aiuto in sanità animale, la caratterizzazione di *S. suis* dai suini è utile per tracciare le infezioni umane che originano dai suini. Nello popolazione oggetto di questo studio i 2 maggiori sierotipi di *S. suis* identificati sono stati SS2 e SS9, responsabili di circa il 70% dei casi. Precedenti studi condotti in Italia avevano mostrato che il numero di infezioni sostenute da SS9 erano di gran lunga inferiori a quelle causate da SS2 (Wisselink et al., 2000). Successivamente, SS9 è stato segnalato come sierotipo prevalente in una filiera integrata italiana (Sandri et al., 2015). Il numero di infezioni causate da SS2 e SS9 descritto in questo studio è circa equivalente, confermando un incremento delle infezioni sostenute da SS9 negli allevamenti suini. SS7 è il terzo sierotipo che è stato osservato, confermando il trend osservato anche in Germania (Louise Prüfer et al., 2019). I nostri dati indicano anche la presenza di SS10 e SS15 mai identificati in Italia ma già descritti in Spagna e UK (Wisselink et al., 2000). Tutti gli isolati SS2 eccetto uno, sono confinati all'interno di un unico cluster nell'albero filogenetico. Questo cluster è composto da isolati appartenenti al ST1, ST predominante e associato ad infezioni nei suini in Europa, e inaspettatamente da ST7. ST7 non è stato mai descritto nei suini in Europa (Goyette-Desjardins et al., 2014) ma è il ST prevalentemente associato a streptococcosi nei suini in Cina e responsabile di 2 epidemie di *S. suis* nell'uomo nel 1998 e nel 2005 (Guo et al., 2020). Per quanto riguarda il SS7, tutti gli isolati SS7 appartengono al ST29 e sono raggruppati all'interno di un unico cluster. SS7 appartenenti al ST29 sono stati descritti recentemente come causa di gravi infezioni nei suinetti in Germania e Austria. Per questo motivo ST29 è stato proposto come ST emergente in Europa (Rieckmann et al., 2018). Differentemente da quanto descritto per SS2, gli isolati SS9 sono distribuiti all'interno di differenti cluster nell'albero filogenetico e si raggruppano con isolati appartenenti ad altri sierotipi. Questa grande eterogeneità è stata già descritta per SS9. Tra gli isolati SS9, 3 risultano ST16, un clone dominante nei casi *S. suis* nei suini in Olanda. Sebbene la maggior parte dei casi di *S. suis* nell'uomo sono associati al ST1, recentemente in Thailandia alcuni casi umani sono stati attribuiti al ST16 (Willemsse et al., 2019). Una larga porzione di SS9 sono stati assegnati al ST123, già descritto in Spagna nel 2009 e raggruppati all'interno di un unico cluster. Gli isolati ST123, molti di quali resistenti alla penicillina, sono risultati prevalenti tra i nostri isolati.

Per quanto riguarda la sensibilità agli antimicrobici, in questo studio abbiamo confermato la resistenza alla tetraciclina e alla clindamicina. La sensibilità al sulfametossazolo/trimetoprim e ai fluorochinoloni è generalmente più bassa nel nostro studio rispetto a studi condotti in altri paesi Europei (van Hout et al., 2016). Infine abbiamo osservato un elevato livello di resistenza alla penicillina con circa un isolato su cinque con una ridotta suscettibilità nei confronti di questa molecola.

Non è stata riscontrata resistenza nei confronti di ampicillina, confermando l'ipotesi di una incompleta cross-resistenza tra questi due antimicrobici.

## CONCLUSIONI

Questo studio conferma l'importanza di programmi di sorveglianza passiva della infezione da *S.suis* nella specie suina. Tale sorveglianza permetterebbe l'identificazione precoce di cloni con potenzialità zoonotiche o resistenti agli antibiotici. Per la prima volta, si è osservata la presenza di un clone resistente alla penicillina, non ristretta in termini geografici o di filiera produttiva. Tale riscontro è preoccupante sia in termini di sanità animale che di salute pubblica, e suggerisce fortemente l'adozione di misure preventive volte a limitarne la diffusione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Du, F., Lv, X., Duan, D., Wang, L., & Huang, J. (2019). Characterization of a Linezolid- and Vancomycin-Resistant *Streptococcus suis* Isolates That Harbors *optrA* and *vanG* Operons. *Frontiers in Microbiology*, *10*(September), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02026>
2. Estrada, A. A., Gottschalk, M., Rossow, S., Rendahl, A., Gebhart, C., & Marthaler, D. G. (2019). Serotype and genotype (multilocus sequence type) of *Streptococcus suis* isolates from the United States serve as predictors of pathotype. *Journal of Clinical Microbiology*, *57*(9), 1–16. <https://doi.org/10.1128/JCM.00377-19>
3. Goyette-Desjardins, G., Auger, J.-P., Xu, J., Segura, M., & Gottschalk, M. (2014). *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerging Microbes & Infections*, *3*(6), e45. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.45>
4. Guo, G., Du, D., Yu, Y., Zhang, Y., Qian, Y., & Zhang, W. (2020). Pan-genome analysis of *Streptococcus suis* serotype 2 revealed genomic diversity among strains of different virulence. *Transboundary and Emerging Diseases*, *July*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/tbed.13725>
5. Kerdsin, A., Takeuchi, D., Nuangmek, A., Akeda, Y., Gottschalk, M., & Oishi, K. (2020). Genotypic comparison between *Streptococcus suis* isolated from pigs and humans in Thailand. *Pathogens*, *9*(1), 4–11. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010050>
6. King, S. J., Heath, P. J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C. G., & Whatmore, A. M. (2001). Distribution and genetic diversity of *suilysin* in *Streptococcus suis* isolated from different diseases of pigs and characterization of the genetic basis of *suilysin* absence. *Infection and Immunity*, *69*(12), 7572–7582. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7572-7582.2001>
7. Louise Prüfer, T., Rohde, J., Verspohl, J., Rohde, M., De Greeff, A., Willenborg, J., & Valentin-Weigand, P. (2019). Molecular typing of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy pigs between 1996-2016. *PLoS ONE*, *14*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210801>
8. O'Dea, M. A., Laird, T., Abraham, R., Jordan, D., Lugsomya, K., Fitt, L., Gottschalk, M., Truswell, A., & Abraham, S. (2018). Examination of Australian *Streptococcus suis* isolates from clinically affected pigs in a global context and the genomic characterisation of ST1 as a predictor of virulence. *Veterinary Microbiology*, *226*(October), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.10.010>
9. Okura, M., Lachance, C., Osaki, M., Sekizaki, T., Maruyama, F., Nozawa, T., Nakagawa, I., Hamada, S., Rossignol, C., Gottschalk, M., & Takamatsu, D. (2014). Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(5), 1714–1719. <https://doi.org/10.1128/JCM.03411-13>
10. Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, *31*(22), 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>

11. Palmieri, C., Princivalli, M. S., Brenciani, A., Varaldo, P. E., & Facinelli, B. (2011). Different genetic elements carrying the tet(W) gene in two human clinical isolates of *Streptococcus suis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(2), 631–636. <https://doi.org/10.1128/AAC.00965-10>
12. Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE*, *5*(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
13. Princivalli, M. S., Palmieri, C., Magi, G., Vignaroli, C., Manzin, A., Camporese, A., Barocci, S., Magistrali, C., & Facinelli, B. (2009). *Genetic diversity of Streptococcus suis clinical isolates from pigs and humans in Italy (2003-2007)*. *M*, 1–7.
14. Rieckmann, K., Seydel, A., Szewczyk, K., Klimke, K., Rungelrath, V., & Baums, C. G. (2018). *Streptococcus suis cps7*: An emerging virulent sequence type (ST29) shows a distinct, IgM-determined pattern of bacterial survival in blood of piglets during the early adaptive immune response after weaning. *Veterinary Research*, *49*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0544-8>
15. Sandri G., Giovanardi D., Pesente P., Rossi G. Studio dell'epidemiologia di *Streptococcus suis* (mediante utilizzo di sierotipizzazione e determinazione della presenza di fattori di virulenza) e della resistenza antimicrobica (AMR) in una filiera produttiva italiana. Atti della Società Italiana di Patologia e Allevamento del Suino, 2015, pag. 193-197.
16. Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, *30*(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
17. Segura, M., Fittipaldi, N., Calzas, C., & Gottschalk, M. (2017). Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical? *Trends in Microbiology*, *25*(7), 585–599. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.005>
18. Silva, L. M. G., Baums, C. G., Rehm, T., Wisselink, H. J., Goethe, R., & Valentin-Weigand, P. (2006). Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Veterinary Microbiology*, *115*(1–3), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.12.013>
19. Willemse, N., van der Ark, K. C. H., Stockhofe-Zurwieden, N., Smith, H., Picavet, D. I., van Solt-Smits, C., Wisselink, H. J., Schultsz, C., & de Greeff, A. (2019). Clonal expansion of a virulent *Streptococcus suis* serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51576-0>
20. Wisselink, H. J., Reek, F. H., Vecht, U., Stockhofe-Zurwieden, N., Smits, M. A., & Smith, H. E. (1999). Detection of virulent strains of *Streptococcus suis* type 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* type 1 in tonsillar specimens of pigs by PCR. *Veterinary Microbiology*, *67*(2), 143–157. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00036-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00036-X)
21. Ye, C., Bai, X., Zhang, J., Jing, H., Zheng, H., Du, H., Cui, Z., Zhang, S., Jin, D., Xu, Y., Xiong, Y., Zhao, A., Luo, X., Sun, Q., Gottschalk, M., & Xu, J. (2008). Spread of *Streptococcus suis* sequence type 7, China. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(5), 787–791. <https://doi.org/10.3201/eid1405.070437>
22. Zheng, H., Du, P., Qiu, X., Kerdsin, A., Roy, D., Bai, X., Xu, J., Vela, A. I., & Gottschalk, M. (2018). Genomic comparisons of *Streptococcus suis* serotype 9 strains recovered from diseased pigs in Spain and Canada. *Veterinary Research*, *49*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0498-2>