

STUDIO INTRA-FARM DELLA DINAMICA DELLE POPOLAZIONI DI *STREPTOCOCCUS SUIIS* IN SUINI COMMERCIALI

POPULATION DYNAMICS OF *STREPTOCOCCUS SUIIS* IN AN INTRA-FARM STUDY IN COMMERCIAL PIGS

CORDIOLI B.¹, BACCHIN C.¹, DRIGO I.¹, ALBORALI G.L.², TONNI M.², GUARNERI F.², VIO D.³, USTULIN M.³, ZOPPI S.⁴, TONON F.⁵, BANO L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Diagnostica di Treviso

²Istituto Zooprofilattico e Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Sezione Diagnostica di Brescia

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Diagnostica di Pordenone

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Diagnostica Generale di Torino

⁵Medico Veterinario Libero Professionista - SUIVET

Parole chiave: *Streptococcus suis*; caratterizzazione molecolare

Keywords: *Streptococcus suis*; molecular characterization

RIASSUNTO

Streptococcus (S.) suis è uno dei principali patogeni batterici della suinicoltura moderna. Il contenimento e la prevenzione della streptococcosi suina sono affidati a trattamenti antimicrobici e alla vaccinazione, ma l'efficacia di quest'ultima potrebbe risentire delle variazioni antigeniche dei ceppi circolanti in azienda.

Con il presente studio si è indagata l'evoluzione delle popolazioni di *S. suis* isolate da cervello di suini rispetto al sierotipo, ad alcuni fattori di virulenza e alle correlazioni genetiche tra i ceppi nel tempo, nella stessa azienda (PFGE, MLST).

Sono stati analizzati 43 ceppi clinici isolati in 4 allevamenti della provincia di Treviso. Trentadue ceppi sono risultati appartenere al sierotipo "9", 3 al "2", 4 al "7" e il profilo di virulenza più frequente (33 isolati) è risultato *mrp+* *efp-* *sly+*.

La PFGE ha evidenziato 8 cluster, di cui uno ampio gruppo (cluster I) di 28 ceppi isolati da tutti i 4 allevamenti con una similarità del 100% (cloni). Sulla base dei risultati della PFGE, sono stati selezionati 16 ceppi per MLST che sono risultati appartenere ai seguenti *sequence type* (ST): ST1, ST16, ST29, ST123 e a due nuovi ST ancora non segnalati. Tutti i ceppi dell'ampio cluster I sono risultati ST123. Negli allevamenti si è assistito a dinamiche di popolazione diverse nel tempo con la comparsa e/o scomparsa di diversi sierotipi, profili di virulenza, pulsotipi e ST, suggerendo strategie vaccinali mirate e supportate da un approccio diagnostico approfondito.

ABSTRACT

Streptococcus (S.) suis is one of the most important bacterial pathogens in modern pig farming. Antimicrobial treatments and vaccination are the main strategies to prevent and contain swine streptococcosis, but the effectiveness of the vaccines could be affected by the antigenic variations (serotype) that might occur over time in the farm.

This study investigated the evolution of *S. suis* populations isolated from pig brains as far as the serotype, the virulence factors and the genetic correlations (PFGE, MLST) are concerned. Forty-three clinical strains isolated in 4 farms in the province of Treviso were included in the study. Most of them (32) were found to belong to serotype "9", 3 to "2", 4 to "7"

and the most frequent virulence profile (33 isolates) was *mrp* + *epf*- *sly* +. The PFGE revealed 8 clusters, including a large group of 28 strains (cluster I) with 100% similarity (clones) isolated from all the farms. Based on the results of the PFGE, 16 strains were selected for MLST and the following sequence types (ST) were detected: ST1 (1), ST16 (2), ST29 (1), ST123 (10) and two new STs not yet described. All strains in cluster I were ST123. In each farm the appearance and/or disappearance of different *S. suis* strains with different genetic characteristics were observed over time, suggesting targeted vaccination strategies supported by an in-depth diagnostic approach.

INTRODUZIONE

Streptococcus suis (*S. suis*) è un microrganismo Gram positivo, anaerobio facoltativo a diffusione mondiale compreso nella famiglia *Streptococcaceae*, ordine *Lactobacillales*, phylum *Firmicutes* (Okura *et al.*, 2016).

La specie batterica presenta caratteristiche eterogenee dal punto di vista fenotipico, genotipico e nella varietà di manifestazioni cliniche ad esso associate. Infatti, *S. suis* può colonizzare i primi tratti dell'apparato respiratorio di soggetti portatori (*carrier*), provocare gravi forme cliniche spesso letali (meningo-encefaliti, endocarditi, setticemia, artriti e morte improvvisa) e agire come batterio opportunisto in associazione ad altri patogeni (Barrow, 2021).

Si tratta di una delle problematiche più attuali che affliggono la suinicoltura moderna, in quanto determina pesanti perdite economiche date dalla morte dei soggetti colpiti, dalla gestione degli scarti e dal costo del trattamento degli animali con il conseguente rischio di selezionare popolazioni microbiche antibioticoresistenti (Segura *et al.*, 2020). Inoltre, assume considerevole importanza dal punto di vista zoonosico, in quanto vi sono delle segnalazioni di episodi di malattia nell'uomo (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014).

Per l'identificazione del patogeno è possibile valutare la presenza della sequenza genetica altamente conservata codificante la glutammato deidrogenasi (*gdh*) e l'appartenenza a uno degli oltre 30 sierotipi noti (Okwumabua *et al.*, 2002). Gli isolati di *S. suis*, infatti, rientrano in una complessa popolazione di ceppi classificabili sulla base dell'espressione di specifici polisaccaridi capsulari (*cps*), antigeni di superficie che agiscono come barriera fisica in grado di proteggere il batterio dalla fagocitosi e renderne più difficoltosa la *clearance* (Zheng *et al.*, 2017; Fittipaldi *et al.*, 2012).

I marker genetici di patogenicità più indagati sono 3: la suilisina (*sly*), la sostanza polimerica extracellulare (*epf*) e la proteina rilasciata dalla muramidasi mistica (*mrp*) (Tonni *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2009). Questi geni codificano rispettivamente per un'emolisina, una sostanza escreta in grado di aumentare l'invasività del batterio e una proteina ancorata alla parete cellulare che partecipa all'attivazione del fibrinogeno con conseguente degradazione della fibrina e danno tissutale (Fittipaldi *et al.*, 2012; Segura *et al.*, 2016). L'espressione dei fattori associati a patogenicità non è discriminante sull'effettivo risvolto clinico dell'isolato batterico in campo, poiché ceppi risultati *epf*- *mrp*- *sly*- sono comunque in grado di dare setticemia nel suino (Segura *et al.*, 2020).

Data l'estrema eterogenicità genetica anche all'interno di una singola unità epidemiologica è utile associare più tecniche di tipizzazione molecolare per un studio completo dei pattern di *S. suis* circolanti in allevamento. La PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) utilizza la restrizione enzimatica dell'intero genoma batterico e permette di suddividere gli isolati batterici in cluster a seconda dei coefficienti di similarità tra i pulsotipi ottenuti (Vela *et al.*, 2003). La *multilocus sequence typing* (MLST), invece, è una metodica basata sul sequenziamento del DNA dei geni "housekeeping" e permette di comparare il sequence type (ST) ottenuto con quelli presenti in un database globale ottenendo infor-

mazioni epidemiologiche d'interesse (Maiden, 2006).

Lo studio dei ceppi di *S. suis* circolanti nei singoli allevamenti può fornire informazioni utili ad indirizzare l'immunoprofilassi, sia attraverso l'impiego di vaccini commerciali o stabulogeni e per verificarne l'efficacia sulla base dell'evoluzione dei ceppi isolati successivamente alla vaccinazione.

MATERIALI E METODI

Isolati batterici

Lo studio ha riguardato 4 aziende (A, G, R, S) della provincia di Treviso che dal 2017 al 2021 hanno effettuato 29 conferimenti di soggetti da ingrasso deceduti spontaneamente, da cui sono stati isolati 43 ceppi (6 da A, 16 da G, 8 da R, 13 da S). In occasione di 10 conferimenti sono stati tipizzati più ceppi isolati da soggetti diversi conviventi.

L'isolamento è avvenuto da campioni di cervello, seminati su piastre di agar sangue incubate per 24-48 ore a 37° in condizioni di microaerofilia e l'identificazione è avvenuta impiegando lo strumento MALDI Biotyper Microflex LT (Bruker Daltonics, Germany).

Fattori genetici di virulenza e sierotipizzazione

Gli isolati batterici sono stati sottoposti a shock termico (lisi-bollitura) per poter estrarre il DNA totale e amplificare con una PCR multiplex le seguenti aree genomiche: *gdh*, *sly*, *mrp*, *epf*, *cps9h*, *cps2j* e *cps7h* (Silva *et al.*, 2006). In questo modo è stato possibile attribuire il sierotipo e valutare l'espressione di fattori associati a patogenicità.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire da colture pure di 18-24 ore in agar sangue di *S. suis* seguendo il protocollo proposto da Vela *et al.* (2003). Il pulsotipo ottenuto è stato elaborato attraverso il software BioNumerics ver. 7.6 utilizzando il Coefficiente di similitudine di Dice e come algoritmo di clustering l'UPGMA con valori di tolleranza e ottimizzazione dell'1,5%. Sono stati considerati appartenenti allo stesso Cluster e quindi epidemiologicamente correlati tutti i ceppi con Coefficiente di Dice pari o superiore all'80%.

Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Sulla base del dendrogramma (Figura 1) sono stati selezionati 16 ceppi batterici da sottoporre a MLST. L'analisi è stata eseguita secondo il protocollo descritto da King *et al.* (2002), che prevede l'amplificazione dei seguenti geni: *aroA*, *cpn60*, *dpr*, *gki*, *mutS*, *recA* e *thrA*. Le sequenze ottenute sono state analizzate ed inserite nel *S. suis* sequence/profile database (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-suis>).

L'elaborazione grafica è stata ottenuta impiegando il software Bionumerics, versione 7.6 (Applied Maths).

RISULTATI

In figura 1 sono riportati i risultati relativi a PFGE, MLST, sierotipizzazione e profilo di virulenza dei ceppi testati.

Trentadue ceppi (83%) sono risultati appartenere al sierotipo "9", 3 al "2", 4 al "7" mentre 4 isolati degli allevamenti R (1), G (2) ed S (1) non appartenevano ad alcuno dei sierotipi ricercati. Due ceppi (allevamento S) non hanno presentato il gene *gdh* e il profilo di virulenza più frequente (33 isolati) è risultato *mrp+* *epf-* *sly+*. I geni di virulenza maggiormente presenti, infatti, sono stati *mrp* (41 ceppi) e *sly* (36 ceppi), mentre il gene *epf* è stato evidenziato solo in 3 ceppi dello stesso episodio morboso.

Nel dendrogramma originato dalla PFGE (Fig. 1) è possibile distinguere otto diversi cluster (I-VIII) di numerosità variabile da 1 a 30 isolati. Il cluster I comprende 30 ceppi appartenenti a tutti gli allevamenti esaminati, di cui 28 presentano tra loro un'omologia del 100% (cloni), suggerita anche dall'appartenenza allo stesso ST123. All'interno di questo numeroso cluster il profilo di virulenza più rappresentato (26 ceppi) è *mrp+* *efp-sly+*. Il sierotipo prevalente è il "9" (26 isolati), mentre 3 ceppi appartengono al "2" e 1 al "7". I 4 ceppi appartenenti a sierotipi "2" e "7" del cluster I provengono tutti all'azienda A. Dall'allevamento A sono stati conferiti 4 gruppi di suini tutti nel 2020 per un totale di 6 ceppi analizzati. Tutti i ceppi si collocano nel cluster I e 3 di questi presentano lo stesso profilo di virulenza e sierotipo.

In generale, i ceppi isolati da soggetti diversi di uno stesso conferimento, risultano appartenere al medesimo cluster, profilo di virulenza e sierotipo, ad eccezione di 3 casi sui 10 totali dai quali è disponibile più di un isolato. In uno di questi ultimi, 2 ceppi isolati simultaneamente da R si collocano in 2 diversi cluster (I e VIII), sebbene presentino lo stesso sierotipo e profilo di virulenza. Nel secondo (allevamento S), i 2 isolati da soggetti diversi differiscono per sierotipo, per profilo di virulenza e cluster. Nel terzo (allevamento G), dei 4 ceppi isolati da soggetti diversi, 3 sono tra loro cloni (cluster V), appartengono allo stesso sierotipo e hanno lo stesso profilo di virulenza, mentre il quarto appartiene al cluster 3 e non è risultato sierotipizzabile.

Sulla base dei risultati della PFGE, sono stati selezionati 16 ceppi per MLST (fig. 1): 10 dal cluster I, e uno per ciascuno degli altri cluster, ad eccezione del II. I 10 isolati del cluster I sono risultati tutti ST123, che non è stato rilevato negli altri cluster. Nel cluster III è presente il ST29, nel V il ST1, nel VI e VII il ST16. Due nuovi sequence type non ancora inseriti all'interno del *S. suis* sequence/profile database (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-suis>) si collocano nei cluster IV e VIII.

DISCUSSIONE

Numerosi lavori scientifici di caratterizzazione genetica di *S. suis* hanno indagato i fattori di virulenza o le correlazioni epidemiologiche che esistono tra ceppi isolati in allevamenti diversi o in determinate aree geografiche (Wei *et al.*, 2003; Gottschalk *et al.*, 2013; Cucco *et al.*, 2022). Con questo lavoro si è voluto invece studiare se vi sono diverse popolazioni di *S. suis* in uno stesso allevamento in uno stesso momento e come queste si modificano nel tempo, impiegando diverse tecniche biomolecolari.

I risultati ottenuti evidenziano come vi sia un'ampia popolazione di ceppi isolati in tutti i 4 allevamenti, che presenta caratteristiche comuni prevalenti per quanto riguarda la positività al fattore di virulenza *mrp*, l'appartenenza al sierotipo "9", al cluster I e al ST123. A partire dal 2018, tali ceppi si sono resi responsabili di episodi ricorrenti di malattia negli allevamenti considerati, nel corso di tutti gli anni presi in esame.

Diverse combinazioni nell'espressione dei fattori di virulenza e nell'appartenenza al sierotipo sono compatibili con un elevato grado di omologia alla PFGE e l'appartenenza al medesimo ST.

Ciò nonostante si è osservata anche la sporadica introduzione di ceppi con caratteristiche genetiche diverse, che si potrebbero ripercuotere sull'efficacia della vaccinazione e sulla sensibilità agli antibiotici. Infatti, alcuni autori hanno dimostrato come vi possano essere profili di resistenza associati ad alcuni ST, come ad esempio quella per la penicillina collegata al ST123 (Cucco *et al.*, 2022).

E' interessante notare come la maggior parte dei ceppi isolati da soggetti conviventi, sia costituita da cloni dello stesso sierotipo e con lo stesso profilo di virulenza. In 3 episodi questo non si è verificato, e ciò suggerisce di procedere alla caratterizzazione di più iso-

lati di uno stesso focolaio, soprattutto quando si devono selezionare per l'allestimento di vaccini stabulogeni o per testare l'antimicrobicosensibilità del ceppo.

Dei 16 ceppi sottoposti a MLST, 14 si sono dimostrati appartenere a ST noti. Tra questi il più rappresentato è stato il ST123, descritto per la prima volta in Spagna e già segnalato in Italia (Cucco *et al.*, 2022). Secondo uno studio condotto ormai 8 anni fa, il ST1, presente nel cluster V del solo allevamento "G", sarebbe il più diffuso in Europa e risulta frequentemente isolato in casi di zoonosi (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014). Nel sequenze/profile database sono presenti oltre 450 isolati di *S. suis* ST1 ottenuti da sangue e organi sia di uomo che di suino provenienti da tutti i continenti a partire dal 1985, quando è stato sequenziato il primo ceppo ST1 in Cina da sangue di un uomo con setticemia. Si evidenzia quindi come all'interno dell'allevamento G in un solo anno circolassero diversi *sequence type*, i quali però non si ritrovano l'anno successivo.

Il ST16 è stato isolato per la prima volta in Spagna, e risulta ST prevalente in Olanda dove causa forme cliniche invasive del suino. Il ST29, isolato spesso dal 1992 ad oggi sia da organi di soggetti sintomatici (cervello, polmone, fluido articolare) sia da tamponi nasali di *carriers*, appare associato al sierotipo 7 e al genotipo *mrp+* *sly-* (così come i ceppi isolati nel presente studio) ed è geograficamente distribuito in numerosi paesi europei tra cui UK, Germania, Olanda, Polonia, Austria, Finlandia e Italia, dove è stato isolato da soggetti con forme cliniche articolari, respiratorie e soprattutto nervose (Cucco *et al.*, 2022). Rieckmann e colleghi (2018), infatti, evidenziano come ceppi che si identificano con il ST29 siano in grado di eludere il sistema immunitario nelle prime fasi post-svezzamento e prolungare la fase di batteriemia, momento cruciale nella patogenesi delle meningiti da *S. suis* (Fittipaldi *et al.*, 2012).

Sarà interessante verificare come varieranno le popolazioni di *S. suis* in seguito alla pressione esercitata dalle vaccinazioni con ceppi omologhi.

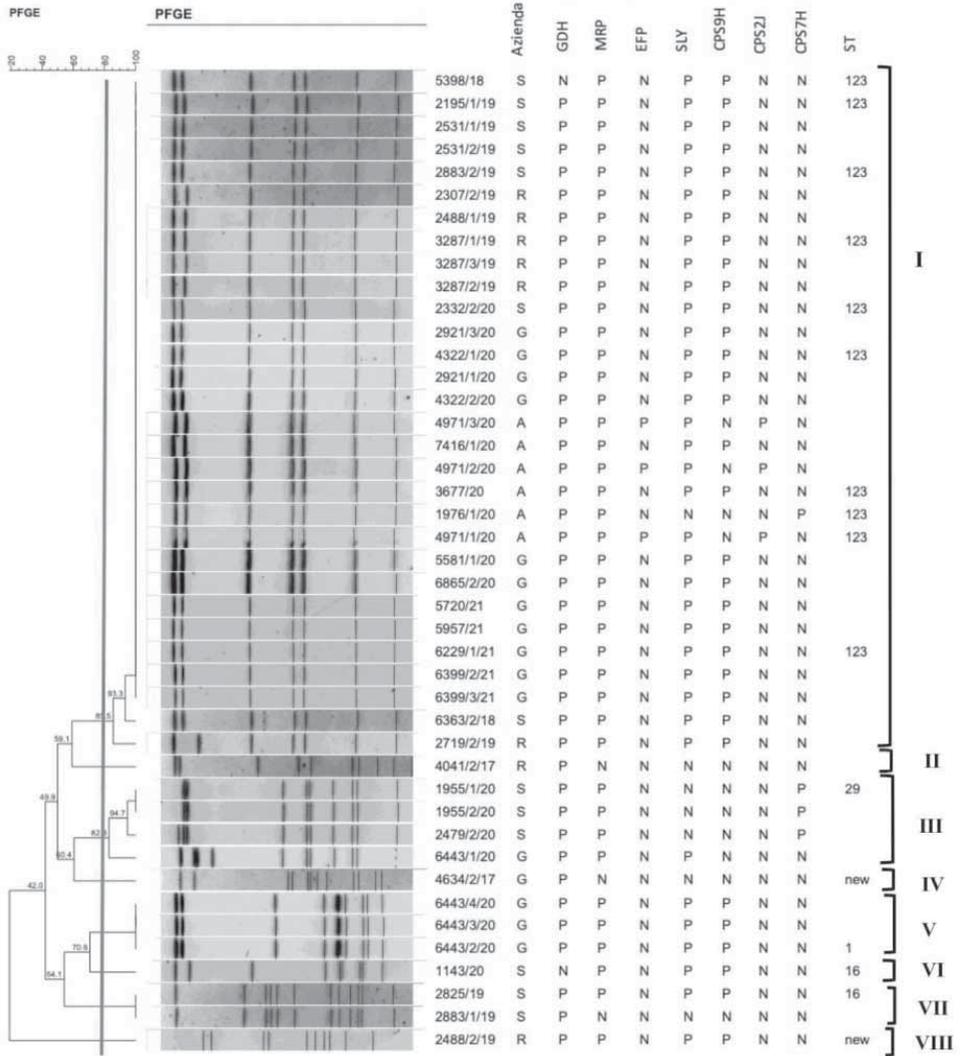


Figura 1. Dendrogramma originato dai pattern PFGE dei ceppi di *S. suis* presenti nei 4 allevamenti oggetto di studio, in cui è possibile distinguere otto cluster di numerosità variabile da 1 a 30 ceppi. La linea rossa indica la soglia di omologia dell'80%.

Figure 1. Tree diagram showing PFGE patterns of *S. suis* strains isolated in the farms studied in the present work showing 8 different clusters including between 1 and 30 strains. The red line represents the 80% of homology threshold.

CONCLUSIONI

La caratterizzazione dei ceppi di *S. suis* eseguita a vari livelli può risultare utile per selezionare i ceppi da inserire in presidi immunizzanti autogeni e per conoscere come questi si modifichino nel tempo rispetto a caratteristiche antigeniche (sierotipo) e fattori genetici di virulenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Cucco, L., Panicià, M., Massacci, F. R., Morelli, A., Ancora, M., Mangone, I., Di Pasquale, A., Luppi, A., Vio, D., Cammà, C., & Magistrali, C. F. (2022). New Sequence Types and Antimicrobial Drug-Resistant Strains of *Streptococcus suis* in Diseased Pigs, Italy, 2017-2019. *Emerging infectious diseases*, 28(1), 139–147. <https://doi.org/10.3201/eid2801.210816>
2. Estrada AA, Gottschalk M, Rossow S, Rendahl A, Gebhart C, Marthaler DG (2019) Serotype and Genotype (Multilocus Sequence Type) of *Streptococcus suis* Isolates from the United States Serve as Predictors of Pathotype. *J Clin Microbiol.*; 57(9):
3. 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 Microbiol.* 7(2):259-79.
4. Gottschalk, M., Lacouture, S., Bonifait, L., Roy, D., Fittipaldi, N., & Grenier, D. (2013). Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada. *Veterinary microbiology*, 162(2-4), 819-825.
5. 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*, 3:1, 1-20.
6. <https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-suis>
7. Kerdsin A, Hatrongjit R, Gottschalk M, Takeuchi D, Hamada S, Akeda Y, Oishi K. (2017). Emergence of *Streptococcus suis* serotype 9 infection in humans. *J Microbiol Immunol Infect.*;50(4):545-546. doi: 10.1016/j.jmii.2015.06.011. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26362754.)
8. King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, Whatmore AM. (2002) Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *J Clin Microbiol.* 40(10):3671-80. doi: 10.1128/JCM.40.10.3671-3680.2002. PMID: 12354864; PMCID: PMC130843.
9. Maiden MC. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 60: 561–588.
10. Okura M., Osaki M., Nomoto R., Arai S., Osawa R., Tsutomu S., Takamatsu D. (2016). Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens* 5, 45.
11. Paul Barrow. (2021) Major pathogens and pathogenesis in Advancements and Technologies in Pig and Poultry Bacterial Disease Control 1a ed. Academic Press
12. Rieckmann, K., Seydel, A., Szewczyk, K., Klimke, K., Rungelrath, V., Baums, CG (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. *Vet Res* 49, 48. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0544-8>
13. Schultsz, C.; Jansen, E.; Keijzers, W.; Rothkamp, A.; Duim, B.; Wagenaar, J.A.; van der Ende, A. (2012). Differences in the population structure of invasive *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and from humans in The Netherlands. *PLoS ONE*, 7, e33854.
14. Segura M., Aragon V., Brockmeier S.L., Gebhart C., Greeff A., Kerdsin A., O’Dea M.A., Okura M., Saléry M., Schultsz C., Valentin-Weigand P., Weinert LA., Wells J.M., Gottschalk, M. (2020). Update on *Streptococcus suis* Research and Prevention in the Era of Antimicrobial Restriction: 4th International Workshop on S. suis. *Pathogens* 9, no. 5: 374.
15. Segura M., Calzas C., Grenier D., Gottschalk M. (2016). Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses. *FEBS Lett.*, 590, 3772-3799.

16. Tonni M., Formenti N., Guarneri F., Romeo C., Guadagno F., Scali F., Rota Nodari S., Bano L., Bacchin C., Maisano A.M., Vezzoli F., Rosignoli C., Santucci G., Luppi A., Zoppi S., Pasquali P., Alborali G.L. (2021). Caratterizzazione molecolare e profili di antimicrobico-resistenza di ceppi di *Streptococcus suis* isolati in allevamenti del nord Italia nel periodo 2013-2020. In: "Volumi degli atti 2020 e 2021", Verona, XLVI Meeting Annuale SIPAS, 133-143.
17. Vela A. I., Goyache J., Tarradas C., Luque I., Mateos A., Moreno M. A., Borge C., Perea J. A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J. F. (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), 2498–2502.
18. Wei, Z., Li, R., Zhang, A., He, H., Hua, Y., Xia, J., Cai, X., Chen, H., Jin, M. (2009). Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Veterinary microbiology*, 137(1-2), 196-201.
19. Willemse, N., van der Ark, K.C.H., Stockhofe-Zurwieden, N. *et al.* (2019) Clonal expansion of a virulent *Streptococcus suis* serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations. *Sci Rep* 9, 15429. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51576-0>
20. Zheng H, Du P, Qiu X, Kerdsin A, Roy D, Bai X, Xu J, Vela AI, Gottschalk M (2018) Genomic comparisons of *Streptococcus suis* serotype 9 strains recovered from diseased pigs in Spain and Canada. *Vet Res.* Jan 9; 49(1):1.
21. Zheng H., Qiu X., Roy D., Segura M., Du P., Xu J., Gottschalk, M. (2017). Genotyping and investigating capsular polysaccharide synthesis gene loci of non-serotypeable *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Canada. *Vet. Res.* 48, e10.