

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-2:2010

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 2: BỆNH DO VI KHUẨN *STREPTOCOCCUS SUI*
GÂY RA TRÊN LỢN**

*Animal disease – Diagnostic procedure –
Part 2: Streptococcus suis disease in pig*

HÀ NỘI – 2010

Lời nói đầu

TCVN 8400-2:2010 do Cục Thú y biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

TCVN 8400 *Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán* gồm có các phần sau:

- TCVN 8400-1:2010 *Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán – Phần 1: Bệnh lở mồm long móng;*
- TCVN 8400-2:2010 *Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán – Phần 2: Bệnh do vi khuẩn Streptococcus suis gây ra trên lợn;*
- TCVN 8400-3:2010 *Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán – Phần 3: Bệnh giun xoắn;*
- TCVN 8400-4:2010 *Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán – Phần 4: Bệnh Niu cát xơn.*

Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán –

Phần 2: Bệnh do vi khuẩn streptococcus suis gây ra trên lợn

Animal disease – Diagnostic procedure –

Part 2: Streptococcus suis disease in pig

CẢNH BÁO – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn sức khỏe thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chẩn đoán bệnh do vi khuẩn *Streptococcus suis* gây ra trên lợn.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau:

Vi khuẩn *S. suis* (liên cầu khuẩn lợn)

Vi khuẩn gram dương, có 35 typ huyết thanh giáp mô của *S. suis* đã được xác định, trong đó typ 1, 2, ½, 3, 7, 9, 14 là những typ huyết thanh thường gây bệnh trên lợn. *S. suis* typ 2 là typ gây bệnh phổ biến nhất và có thể lây sang người.

Bệnh do vi khuẩn *Streptococcus suis* (*S. suis*) thường gặp ở lợn con đặc biệt lợn sau cai sữa. Triệu chứng, bệnh tích điển hình của bệnh bao gồm: sốt, viêm khớp, viêm bao tim, viêm phổi, viêm não, bại huyết và chết đột ngột.

TCVN 8400-2:2010

3 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và sử dụng nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

- Môi trường nước pepton
- Thạch colombia, thạch máu
- Axit nalidixic
- Môi trường Voges- Proskauer (VP)
- Huyết thanh chuẩn định typ *Streptococcus suis*
- Alpha naphthol ($C_{10}H_7OH$)
- Etanol (C_2H_6O)
- Kali hydroxit (KOH)
- Axit fucsin ($C_{20}H_{17}N_3Na_2O_9S_3$)
- Natri hydroxit (NaOH)
- Bộ kit giám định đặc tính sinh hóa vi khuẩn *S. suis*
- Nguyên liệu cho PCR
- Agarose
- Etidi bromua (EtBr)
- Dung dịch TAE hoặc TBE
- Tím tinh thể ($C_{25}H_{30}N_3Cl$)
- Amoni oxalat ($(NH_4)_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$)
- Basic fuchsin ($CH_{19}O$)
- Phenol (C_6H_6O)
- Kali iodua (KI)
- Iodua (I_2) tinh thể

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

- Tủ ấm 37 °C
- Kính hiển vi quang học
- Panh, kéo
- Que cấy
- Đĩa petri để đổ môi trường
- Lam kính
- Kính lúp
- Lamen (coverslip)
- Lọ thủy tinh các cỡ: 100 ml, 200 ml, 500 ml và 1000 ml
- Pipet thủy tinh các cỡ
- Dụng cụ chạy điện di (electrophoresis).

5 Lấy mẫu

Mẫu xét nghiệm được lấy là các phủ tạng (tim, phổi, gan, lách), máu (thể nhiễm trùng huyết), não, khớp và dịch rỉ viêm.

Bệnh phẩm phải được lấy vô trùng, bảo quản trong các dụng cụ đựng mẫu vô trùng trong điều kiện lạnh từ 2 °C đến 8 °C và gửi về phòng thí nghiệm chậm nhất 24 h sau khi lấy mẫu.

Gửi kèm theo bệnh phẩm giấy yêu cầu xét nghiệm có ghi rõ triệu chứng, bệnh tích và đặc điểm dịch tễ.

6 Cách tiến hành

6.1 Chẩn đoán lâm sàng

6.1.1 Dịch tễ học

- Bệnh thường xảy ra ở lợn con và sau cai sữa
- Bệnh thường phát ra khi có tác động của các yếu tố stress

TCVN 8400-2:2010

6.1.2 Triệu chứng lâm sàng

- Trường hợp quá cấp tính lợn thường chết đột ngột.
- Lợn sốt rất cao (42,5 °C), bỏ ăn, lờ đờ và suy yếu
- Khó thở
- Triệu chứng thần kinh (do viêm não): Lợn mất thăng bằng, liệt, đi lại loạng choạng, uốn người ra phía sau, run rẩy, co giật.
- Mát đờ
- Mù, đi lại khập khiễng, què.
- Viêm khớp trong các trường hợp mạn tính.

6.1.3 Giải phẫu bệnh học

- Phù thũng, tụ máu ở não và màng não, có nhiều dịch não tủy màu đục.
- Xác chết màu đỏ, nhu mô và các hạch bạch huyết sưng (nhiễm trùng máu)
- Viêm đa khớp có mũ, bao hoạt dịch có thể dày lên.
- Viêm nội tâm mạc
- Viêm phổi.

6.2 Chẩn đoán phòng thí nghiệm

6.2.1 Phân lập vi khuẩn

Cấy bệnh phẩm lên các loại môi trường thạch máu hay môi trường thạch chọn lọc Colombia (có bổ sung 5 % đến 7 % máu cừu hoặc máu bê). Thạch Colombia có thể bổ sung thêm Colistin (0,01 g/ lít) và axit nalidixic (0,015 g/ lít). Nuôi cấy vi khuẩn ở 37 °C có 5 % CO₂, trong 24 h.

Trên môi trường thạch máu, khuẩn lạc *S. suis* có dạng nhỏ (đường kính khoảng 1 mm đến 2 mm), dạng tròn trơn bóng láng hoặc nhẵn, thường gây dung huyết alfa hoặc không dung huyết.

6.2.2 Giám định vi khuẩn

Nên chọn các khuẩn lạc nghi ngờ phân lập được từ các tổ chức khác nhau, từ những lợn khác nhau trên cùng một đàn để giám định.

6.2.2.1 Hình thái vi khuẩn trên kính hiển vi

Phết kính khuẩn lạc sau khi phân lập để nhuộm gram (Phụ lục A)

Vi khuẩn *S. suis* bắt màu gram dương (+), có dạng hình cầu hoặc ovan đứng thành chuỗi ngắn, có khi xếp đôi hay đơn lẻ.

6.2.2.2 Đặc tính sinh hóa

Có thể dùng kit thương mại và sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Một số kit sinh hoá cũng có thể xác định được đến typ huyết thanh (thường là typ 1 và typ 2).

Có thể dựa vào một số đặc tính sinh hóa cơ bản sau của *S. suis* để giám định.

Một số tính chất cơ bản của *S. suis*

Chủng vi khuẩn	Phân hủy arginin	Voges-Proskauer	Inulin	Salicin	Trehaloza	Lactoza	Sucroza	Sorbitol	Mannitol	Glycerol
<i>S. suis</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-

Phương pháp tiến hành phản ứng sinh hoá xem Phụ lục B

6.2.2.2.1 Giám định gene xác định vi khuẩn *S. suis*

Phát hiện gene glutamate dehydrogenase (*gdh*) xác định vi khuẩn *S. suis* có thể tiến hành bằng phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction) (xem phụ lục C).

6.2.2.2.2 Định typ huyết thanh giáp mô của *S. suis*

Định typ bằng huyết thanh chuẩn: sử dụng kháng huyết thanh chuẩn thương mại và phương pháp tiến hành theo chỉ dẫn của nhà sản xuất

Định typ bằng phương pháp PCR: có thể dùng phản ứng PCR xác định các typ huyết thanh 1, 2, ½, 7, 9 là những typ huyết thanh chủ yếu gây bệnh trên lợn (xem Phụ lục C).

CHÚ THÍCH: Có thể xác định typ huyết thanh bằng phương pháp huyết thanh học hoặc bằng phương pháp PCR.

7 Kết luận

Lợn được xác định là mắc bệnh do vi khuẩn *S. suis* gây ra khi:

TCVN 8400-2:2010

- Có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích điển hình của bệnh;
- Phát hiện được vi khuẩn *S. suis* thuộc các typ huyết thanh thường gây bệnh trên lợn như: typ 1, typ 2, typ ½, typ 3, typ 7, typ 9, typ 14 hoặc nếu vi khuẩn *S. suis* không thuộc các serotyp thông thường trên nhưng phân lập được từ gan, lách, não hay khớp.

Phụ lục A

(Quy định)

Phương pháp nhuộm gram**A.1 Thuốc nhuộm****A.1.1 Dung dịch kết tinh tím**

Tím tinh thể	2,0 g
Etanol 95%	20,0 ml
Amoni oxalat	0,8 g
Nước cất	80,0 ml

Hoà tan tím tinh thể trong etanol, hòa tan amoni oxalat trong nước cất. Sau đó trộn 2 dung dịch này với nhau và lắc cho tan hết.

A.1.2 Dung dịch fuscine đậm đặc

Basic fuchsin	1g
Etanol 95 %	10 ml
Phenol (axit phenic)	5g
Nước cất	100ml

Khi dùng, pha loãng dung dịch mẹ theo tỉ lệ 1/10 với nước cất.

A.1.3 Dung dịch lugol

Kali iodua	2g
Iodua tinh thể	1g
Nước cất	200 ml

Nghiền Kali iodua và iodua tinh thể, cho nước cất vào từ từ và lắc cho tan.

TCVN 8400-2:2010

A.1.4 Cồn-axeton

Etanol 95 %	3 phần
Axeton	1 phần

A.2 Tiến hành nhuộm

- Nhỏ dung dịch tím lên tiêu bản: từ 1 min đến 2 min
- Rửa nước nhanh, để khô
- Nhỏ dung dịch lugol: để 1 min
- Rửa nước nhanh, để khô
- Nhỏ cồn-axeton
- Rửa nước thật nhanh, để khô
- Nhỏ dung dịch fucsin loãng, để 1 min
- Rửa nước
- Thấm khô hoặc sấy khô

A.3 Xem tiêu bản

- Nhỏ 1 giọt dầu vào tiêu bản và xem tiêu bản bằng kính hiển vi quang học bằng với vật kính độ phóng đại 100 lần.
- Vi khuẩn gram dương bắt màu tím
- Vi khuẩn gram âm bắt màu đỏ.

Phụ lục B

(Quy định)

Một số phản ứng sinh hóa

B.1 Khả năng lên men carbohydrat: lactoza, inulin, salicin, trehaloza, sucroza, sorbitol, manitol và glycerol.

B.1.1 Chuẩn bị môi trường

Chuẩn bị nước pepton theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Chuẩn bị chỉ thị màu andrade:

Axit fucsin	0,5 g
Nước cất	100 ml
NaOH 1 N	16 ml

Chuẩn bị: Nghiền fucsin, hoà vào nước cất cho tan hết. Cho từ từ lượng NaOH 1 N, vừa cho vừa lắc đến khi chuyển màu từ đỏ tươi sang đỏ nâu, đến vàng úa, vàng thẫm thì dừng (thường từ 12 ml đến 17 ml). Để lắng 1 h đến 2 h, lọc qua giấy lọc. Hấp 120 °C trong 15 min.

Cho 1 ml chỉ thị màu andrade vào 100 ml môi trường nước pepton, chia ra các ống (4 ml mỗi ống). Hấp 120 °C trong 30 min.

Chuẩn bị dung dịch đường: các loại đường pha thành dung dịch 10 % hấp ở 110 °C trong 15 min đến 20 min hoặc hấp cách quãng 3 lần 100 °C trong 30 min hoặc lọc qua bộ lọc màng 0,45 µm.

Cho đường vào các ống môi trường: mỗi ống (4 ml) một loại đường riêng rẽ theo tỷ lệ 0,3 ml dung dịch đường 10 %.

Bổ sung huyết bổ sung huyết thanh ngựa (vô trùng) theo tỷ lệ 10 %

B.1.2 Phương pháp kiểm tra và đọc kết quả

Cấy vi khuẩn đã nuôi cấy thuần khiết vào các ống môi trường pepton có đường, để ủ ấm 37 °C sau 24 h đọc kết quả, như sau:

– Phản ứng âm tính: môi trường không thay đổi màu.

TCVN 8400-2:2010

- Phản ứng dương tính: môi trường chuyển màu đỏ.

B.2 Kiểm tra khả năng phân huỷ Arginine

B.2.1 Môi trường Falkow

Nước pepton	5 g
Chất chiết nấm men	3 g
Glucosa	1 g
Bromocresol purple 0,2 %	10 ml
Nước cất	1000 ml

Hòa tan các chất và dung dịch chỉ thị màu trong nước cất. Bổ sung 0,5 % L- arginine hydrochloride. Điều chỉnh pH 6,7. Chia ra lọ nhỏ (khoảng 2 ml/ lọ). Hấp ở 115 °C trong 10 min.

B.2.2 Phản ứng và đọc kết quả

Cấy vi khuẩn (đã nuôi cấy thuần khiết trên thạch máu ở 37 °C, 5 % CO₂ từ 18 h đến 24 h), vào môi trường trên. Kiểm tra môi trường nuôi cấy hàng ngày, trong vòng 4 ngày. Đọc kết quả như sau:

- Phản ứng dương tính (vi khuẩn phân huỷ arginin): môi trường có màu tím.
- Phản ứng âm tính: môi trường có màu vàng

B.3 Phương pháp kiểm tra khả năng sản sinh acetoin trong môi trường Voges- Proskauer (VP)

B.3.1 Chuẩn bị môi trường, thuốc thử

Môi trường VP được pha chế theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chia ra lọ nhỏ (2,5 ml/ống), hấp vô trùng ở 120 °C trong 15 min

Thuốc thử A

Alpha naphthol	5 g
Etanol (thuần khiết)	100 ml

Hoà tan alpha naphthol trong một lượng nhỏ etanol, đổ thêm cho đủ 100 ml. Giữ trong lọ thủy tinh có màu nâu ở nhiệt độ 4 °C.

Thuốc thử B

Kali hydroxit	40 g
Nước cất	100 ml

B.3.2 Phương pháp kiểm tra và đọc kết quả

Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường VP ít nhất là 48 h ở nhiệt độ 37 °C, sau đó nhỏ thêm 0,6 ml thuốc thử A và 0,2 ml thuốc thử B. Lắc đều. Đọc kết quả sau 15 min và 1 h, như sau.

- Phản ứng dương tính: môi trường có màu hồng đậm.
- Phản ứng âm tính: môi trường có màu vàng hoặc không màu.

Phụ lục C

(Tham khảo)

Phương pháp PCR**C.1 Chuẩn bị mẫu**

Mẫu kiểm tra là vi khuẩn nghi là *S. suis* đã nuôi cấy thuần khiết trên thạch máu ở 37 °C, (5 % CO₂) từ 18 h đến 24 h.

Đối chứng dương: chủng vi khuẩn đã được giám định là *S. suis* hoặc sử dụng các chủng *S. suis* chuẩn.

C.2 Tách chiết DNA

Các vi khuẩn phân lập được từ mẫu bệnh phẩm và các mẫu đối chứng dương được tách chiết DNA bằng các kit thương mại hay bằng phương pháp shock nhiệt. Nếu sử dụng kit thì các bước tiến hành theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Tách chiết bằng phương pháp shock nhiệt: Lấy 3 khuẩn lạc đến 4 khuẩn lạc hòa vào 100 µl nước vô trùng không chứa men Rnase và Dnase (nuclease free water). Đun sôi cách thủy trong 10 min, rồi làm lạnh nhanh huyền dịch trong đá 5 min. Ly tâm huyền dịch 12000 g trong 4 min. Thu hoạch phần nổi phía trên (phần nước trong) để làm phản ứng PCR.

C.3 PCR phát hiện gene glutamate dehydrogenase (*gdh*)

Có thể sử dụng cặp mồi và chu trình nhiệt sau:

Gen đích	Kí hiệu mồi	Trình tự cặp mồi (5' – 3')	Kích cỡ sản phẩm (base pair-bp)	Chu trình nhiệt
<i>gdh</i>	Str2 – F (mồi xuôi)	5'-GCAGCGTATTCTGTCAAACG-3'	688	Chu trình 35 vòng: (94 °C – 1 min; 55 °C – 1 min; 72 °C – 1 min), 72 °C – 7 min Giữ: 4 min
	Str2 – R (mồi ngược)	5'-CCATGGACAGATAAAGATGG-3'		

Phản ứng PCR

Có thể dùng các bộ kit PCR thương mại để làm phản ứng và sử dụng kết hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nếu sử dụng Taq DNA polymerase của hãng QIAGEN thì thành phần cho 1 phản ứng PCR với tổng thể tích là 50 µl gồm: 10X coral bufer: 5 µl; 200 µM mỗi loại dNTP; Taq DNA polymerase 2,5 UI; mỗi xuôi và mỗi ngược 1 µM mỗi loại; nước cất vô trùng; DNA tách chiết từ mẫu (C.2): 2 µl.

Đối chứng dương: DNA tách chiết từ vi khuẩn *S. suis* ở C.2

Đối chứng âm: bao gồm đầy đủ thành phần của một phản ứng PCR, nhưng không có DNA của vi khuẩn.

C.4 Chạy điện di

Sản phẩm PCR được chạy điện di trên thạch agarose 1,5 % đến 2 % trong dung dịch đệm TAE hoặc TBE

Bản thạch được điện di trong môi trường dung dịch đệm TAE hoặc TBE (tùy thuộc vào loại đệm sử dụng khi pha thạch), trong thời gian từ 30 min đến 50 min, ở 100 V, sau đó nhuộm bằng dung dịch etidi bromua 0,2 mg/100 ml.

Có thể dùng các sản phẩm có sẵn chất nhuộm DNA để pha chế thạch agarose (như SYBR safe DNA gel stain – của hãng Invitrogen) và sử dụng theo quy định của nhà sản xuất.

C.5 Đọc kết quả

Phản ứng dương tính khi:

- Mẫu đối chứng dương có một vạch duy nhất đúng kích cỡ của sản phẩm.
- Mẫu đối chứng âm: không xuất hiện vạch.
- Mẫu kiểm tra có vạch giống mẫu đối chứng dương.

C.6 PCR định typ huyết thanh

Các serotyp gây bệnh chủ yếu trên lợn được phát hiện thông qua các gene mã hóa quá trình sinh tổng hợp giáp mô (*cps- capsular biosynthesis*) tương ứng.

Có thể sử dụng các cặp mồi sau để xác định các typ huyết thanh của vi khuẩn *S. suis*.

Phản ứng PCR tiến hành theo B.3 và bổ sung các mẫu đối chứng dương là chủng chuẩn *S. suis* typ 1, 2, ½, 7, 9.

Một số cặp mồi cho PCR giám định týp huyết thanh

Gen đích	Sero type	Kí hiệu mồi	Chuỗi mồi (5' – 3')	Kích cỡ sản phẩm (bp)	Chương trình nhiệt
cps 1	1	cps1H-F cps1H-R	5'-GCGAACTGTTAGCAATGAC-3' 5'-GGCGGTCTAGCAGATGCTCG-3'	441	94 °C – 0,5 min; 60 °C – 1 min; 72 °C –3 min: chu trình 40 vòng, 72 °C – 10 min
cps 2 và 1/2	2 và 1/2	cps2J-s cps2J-as	5'-GTTGAGTCCTAATACACCTGTT-3' 5'-CAGAAAATTCATATTGTCCACC-3'	459	94 °C – 30 s; 60 °C – 30s; 72 °C – 30 s: chu trình 40 vòng, 72 °C – 7 min
cps 7	7	cps7H- F cps7H-R	5'-GAATCAATCCAGTCAGTGTGG-3' 5'-CTAATTCGATACGAAGCTAAAC-3'	541	94 °C – 0,5 min; 60 °C – 1 min; 72 °C –3 min: chu trình 40 vòng, 72°C – 10 min
cps 9	9	cps9H-F cps9H-R	5'-GGCTACATAATGGAAGCCC-3' 5'-GGCATCATTGCTCGACAGAT-3'	388	94 °C – 0,5 min; 60 °C – 1 min; 72°C –3 min: chu trình 40 vòng, 72 °C – 10 min
cps 2	2	cps2J cps2J	5'-TTTGTCGGGAGGGTACTTC-3' 5'-TTTGGAAGCGATTCATCTCC-3'	498	94 °C – 1 min; 58 °C – 1 min; 72 °C –1 min 30 s: chu trình 40 vòng, 72 °C – 2 min
cps 1	1	cps1J-F cps1J-R	5'- TGGCTCTGTAGATGATTCTGCT-3' 5'-TGATACGTCAAAATCCTCACCA-3'	637	94 °C – 1 min; 58 °C – 1 min; 72 °C –1 min 30 s: chu trình 40 vòng, 72 °C – 2 min
cps 7	7	cps7H- F cps7H-R	5'-AATGCCCTCGTGGAATACAG-3' 5'- TCCTGACACCAGGACACGTA-3'	379	94 °C – 1 min; 58 °C – 1 min; 72 °C –1 min 30 s: chu trình 40 vòng, 72 °C – 2 min
cps 9	9	cps7H- F cps7H-R	5'-GGGATGATTGCTCGACAGAT-3' 5'-CCGAAGTATCTGGGCTACTGA-3'	303	94 °C – 1 min; 58 °C – 1 min; 72 °C –1 min 30 s: chu trình 40 vòng, 72 °C – 2 min

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Standard Diagnostic Manual of Diagnostic for Livestock Disease in Thailand. (2003).Third edition. National Institute Animal Health – JICA.
 - [2] Higgins and Gottschalk. (1999). Streptococcal Diseases. In: Disease of Swine, BE Straw, S D'Allaire, WL Mengeling and DL Taylor, Eds, Iowa State University Press.
 - [3] Hilde E.Smith et al (1999). The cps genes of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, and 9: development of rapid serotype specific PCR assays.
 - [4] Henk J.Wisselink, Jeroen J.Joosten, and Hilde E.Smith (2002). Multiplex PCR assay for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs.
 - [5] Silva LM, Baums CG, Rehm T, Wisselink HJ, Goethe R, Valentin-Weigand P. (2006). Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR.Vet Microbiol. 115(1-3):117-27. Epub 2006 Jan 20.
 - [6] Okwumabua, O., O'Connor, M., Shull, E., (2003). A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. FEMS. Microbiol. Lett. 218, 79–84.
 - [7] Marois C, Bougeard S, Gottschalk M, Kobisch M. (2004). Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs. J Clin Microbiol. 2004 Jul;42(7):3169-75.
-