

XÁC ĐỊNH LIÊN CẦU LỢN SEROTYPE 2 (*STREPTOCOCCUS SUIS*) Ở BỆNH PHẨM DỊCH NÃO TỦY BẰNG KỸ THUẬT REALTIME PCR

Lê Văn An¹, Nguyễn Hoàng Bách¹, Phan Nữ Diệu Hồng²

(1)Trường Đại học Y Dược Huế, (2)Bệnh viện Trung ương Huế

Tóm tắt

Mục tiêu: Khảo sát kết quả phát hiện liên cầu lợn serotype 2 trong dịch não tủy ở bệnh nhân viêm màng não mủ bằng kỹ thuật realtime PCR. **Phương pháp:** Sử dụng kỹ thuật realtime PCR khuếch đại vùng gen *cps2J* mã hóa cấu trúc vỏ polysaccharide của vi khuẩn liên cầu lợn serotype 2 để phát hiện vi khuẩn này trên 55 mẫu nghiệm dịch não tủy. **Kết quả:** Realtime PCR xác định liên cầu lợn serotype 2 dương tính trong 21 trường hợp, chiếm tỷ lệ 38,2% mẫu nghiệm, trong đó cả hai xét nghiệm realtime PCR và phân lập dương tính ở 18 mẫu nghiệm chiếm 32,7%, 3 mẫu CSF (5,5%) cho kết quả realtime PCR dương tính nhưng phân lập vi khuẩn không mọc. **Kết luận:** Kỹ thuật realtime PCR xác định được liên cầu lợn serotype 2 với tỷ lệ cao hơn so với phân lập vi khuẩn, kỹ thuật này nên dùng phối hợp với phân lập vi khuẩn khi có nghi ngờ viêm màng não do liên cầu lợn ở những phòng xét nghiệm có trang bị.

Từ khóa: Liên cầu lợn (*Streptococcus suis*), viêm màng não, dịch não tủy, realtime PCR.

Abstract

DETECTION OF STREPTOCOCCUS SUIS SEROTYPE 2 IN CEREBROSPINAL FLUID (CSF) SAMPLES BY A REALTIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Le Van An¹, Nguyen Hoang Bach¹, Phan Nu Dieu Hong²

(1)Hue University of Medicine and Pharmacy, (2)Hue Central Hospital

Objective: To apply a realtime PCR for detection of *Streptococcus suis* serotype 2 in CSF samples from patients with purulent meningitis. **Methodology:** Fifty five CSF samples from patients with suspected meningitis were collected for testing by the realtime PCR amplified for *cps2J* gene and bacterial isolation. **Results:** The results showed that *S.suis* was positive in 21 samples (38.2%) by realtime PCR, in which 18 samples (32.7%) were positive by both realtime PCR and bacterial culture, 3 samples (5.5%) were positive by only realtime PCR. **Conclusion:** The realtime PCR detected *S.suis* with higher rate than bacterial isolation, it should be used routinely for detection of meningitis caused by *S.suis* in laboratories equipped with PCR system.

Key words: Liên cầu lợn (*Streptococcus suis*), meningitis, CSF, realtime PCR

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn liên cầu lợn (*Streptococcus suis* viết tắt là *S.suis*) có tác chủ động vật tự nhiên là lợn, thường gây nhiễm trùng không triệu chứng ở đường hô hấp của lợn, ở Canada khoảng 94% lợn con khỏe mạnh ở 4- 8 tuần tuổi có mang vi khuẩn này ở khoang mũi hầu. Căn cứ vào kháng nguyên polysaccharide của vỏ ngoài cùng của vi khuẩn liên cầu lợn được chia thành 35 serotype, trong đó serotype 2 thường gây nhiễm trùng cho người bao gồm nhiễm khuẩn huyết, viêm màng não, viêm nội tâm mạc [1], [2].

Trong 10 năm gần đây nhiều thông báo nhiễm

trùng ở người do vi khuẩn *Streptococcus suis* ở nhiều nơi trên thế giới, chúng gây nên các nhiễm trùng nặng bao gồm nhiễm khuẩn máu và viêm màng não [3], [4], [5]. Chẩn đoán xác định nhiễm liên cầu lợn chủ yếu dựa vào các phương pháp vi khuẩn học gồm phân lập vi khuẩn ở dịch não tủy hay ở máu, đây là phương pháp chuẩn, có sẵn vi khuẩn sống để xác định tính nhạy cảm với các kháng sinh điều trị. Tuy nhiên, phân lập và định danh vi khuẩn cho kết quả chậm, thường kéo dài 2- 3 ngày sau khi cấy, hơn nữa khi bệnh nhân đã dùng kháng sinh trước khi nhập viện, phân lập và nuôi cấy vi khuẩn thường không

- Địa chỉ liên hệ: Lê Văn An, email: levanan.hump@gmail.com

- Ngày nhận bài: 26/11/2015; Ngày đồng ý đăng: 26/4/2016; Ngày xuất bản: 12/7/2016

DOI: 10.34071/jmp.2016.3.14

phát triển. Kỹ thuật khuếch đại gen phát hiện sự hiện diện của DNA đích đặc hiệu của vi khuẩn trong dịch não tủy có thể cho kết quả dương tính khi vi khuẩn còn sống hoặc vi khuẩn đã chết do dùng kháng sinh trước với điều kiện là còn sản phẩm DNA đặc hiệu trong mẫu bệnh phẩm, xét nghiệm này cũng cho kết quả nhanh trong vòng 8 -10 giờ sau khi mẫu nghiệm được đưa đến phòng thí nghiệm. Kỹ thuật realtime PCR gần đây được đưa vào để xác định nhiễm trùng *Streptococcus suis* ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới, ở Việt Nam kỹ thuật này cũng được sử dụng từ nhiều năm trước đây ở một số trung tâm nghiên cứu ở thành phố Hồ Chí Minh và Hà Nội [1], [6], [7].

Ở Thừa Thiên Huế, xác định nguyên nhân liên cầu lợn gây viêm màng não mủ chủ yếu là phân lập và định danh vi khuẩn, phương pháp này có thể không phát hiện được một số trường hợp bệnh nhân đã dùng kháng sinh trước. Nghiên cứu này nhằm khảo sát kết quả phát hiện liên cầu lợn serotype 2 trong dịch não tủy ở bệnh nhân viêm màng não mủ bằng kỹ thuật realtime PCR.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu nghiệm

Năm mươi lăm (55) mẫu nghiệm dịch não tủy (DNT) từ bệnh nhân người lớn bị viêm màng não mủ ở khoa Truyền nhiễm, Bệnh viện Trung ương Huế và từ bệnh nhân điều trị tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế từ tháng 7 năm 2013 đến tháng 9 năm 2015. Bệnh phẩm DNT sau khi lấy được chuyển đến phòng thí nghiệm không quá 2 giờ.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

+ Môi trường phân lập là thạch máu BA (Blood Agar), BHI (brain heart infusion) có sẵn ở Phòng thí nghiệm Vi sinh, Đại học Y Dược Huế.

+ Bộ sinh phẩm tách DNA theo phương pháp Phenol/Chloroform của công ty hóa phẩm Việt Á.

+ Sinh phẩm sử dụng trong PCR gồm dNTP, MgCl₂, dung dịch đệm, platinum Taq DNA polymerase của hãng Invitrogen (Invitrogen, Thermo Fisher scientific, Massachusetts, USA).

+ Các môi và probe dùng trong realtime PCR nhằm khuếch đại và phát hiện sản phẩm DNA có chiều dài 88bp của vùng gen đích *cps2J* mã hóa vỏ polysaccharide đặc hiệu serotype 2 và 1/2 của liên cầu lợn [9], đây là vùng gen đã được chọn để khuếch đại trong realtime PCR phát hiện nhiễm khuẩn liên cầu lợn serotype 2 đã được công bố trong nhiều bài báo [7], [10]. Trình tự môi và probe kiểu TaqMan của kỹ thuật realtime PCR như sau

Môi xuôi: 5'-GGTACTTGCTACTTTTGATG GAAATT-3'

Môi ngược: 5'-CGC ACCTCT TTTATCTCTCCAA-3'

Probe : 5' FAM-TCAAGATCTGAGCTGCAAAAGT-GTCAAATTGA-TAMRA 3'

Máy realtime PCR Mx3000P qPCR system

(Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA)

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Các bước tiến hành

2.3.1.1. Chuẩn bị mẫu nghiệm

Mẫu bệnh phẩm sau khi đến phòng thí nghiệm được xử lý bằng trộn đều, dùng pipet vô trùng lấy

200μl để tiến hành tách chiết DNA, phần còn lại tiến hành xét nghiệm vi khuẩn học bằng nuôi cấy và xét nghiệm trực tiếp tìm vi khuẩn theo quy trình chẩn đoán thường quy [13].

2.3.1.2. Tách chiết DNA: Lấy 200μl mẫu nghiệm được trộn đều và được tách chiết DNA theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm DNA sau khi tách được cho vào dung dịch 50μl TE (1x) và giữ ở âm 20°C đến khi thực hiện khuếch đại.

2.3.1.3. Thực hiện khuếch đại realtime PCR: Chuẩn bị dung dịch khuếch đại với 0.4 μM cho mỗi môi, 0.1μM với probe, 0.2 mM với mỗi nguyên liệu nucleotid NTPs, và 0.5 đơn vị Platinum Taq DNA Polymerase, thêm vào 5μl sản phẩm tách DNA. Thể tích cuối của dung dịch khuếch đại là 25μl.

Phản ứng khuếch đại được tiến hành trên máy realtime PCR (Mx3000P qPCR system) có tại Khoa

Vi sinh, Bệnh viện Đại học Y Dược Huế với chương trình khuếch đại gồm biến tính đầu tiên ở 95°C trong 10 phút, tiếp theo thực hiện khuếch đại trong 40 chu kỳ với 95°C trong 30 giây, cặp đôi 60°C trong 30 giây và tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 30 giây. Mẫu nghiệm luôn được thực hiện kèm theo mẫu chứng dương là DNA của liên cầu lợn serotype 2 đã định danh và mẫu chứng âm tính. Phân tích kết quả với phần mềm Mx Pro (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA), mẫu nghiệm dương khi đường cong tín hiệu chất màu FAM vượt qua đường cơ bản và có chu kỳ ngưỡng Ct (cycle threshold) < 38 và khi các chứng âm đều âm tính [6], [8].

2.3.1.4. Phân lập và định danh vi khuẩn

Mẫu nghiệm được nuôi cấy và phân lập vi khuẩn trên môi trường BA và BHI, khuẩn lạc phát triển được định danh dựa vào hình thái trên nhuộm gram (cầu khuẩn gram dương, xếp thành chuỗi), và phản ứng sinh hóa với API 20 strep (Biomerieux, Lyon, France), vi khuẩn không phát triển ở môi trường thạch chứa 6.5% NaCl, đề kháng với optochin, có catalase âm, thủy phân esculine và VP âm tính, lên men các đường salicin và trehalose [1], [12].

2.3.2. Xử lý số liệu

Liên cầu lợn được xác định khi mẫu nghiệm dương tính với nuôi cấy hoặc realtime PCR dương tính. Số liệu được nhập vào máy tính và xử lý với phương pháp thống kê.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Thực hiện nuôi cấy và phân lập vi khuẩn từ 55 mẫu nghiệm dịch não tủy của bệnh nhân người lớn

bị viêm màng não mủ, kết quả nuôi cấy có các vi khuẩn phát triển được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Vi khuẩn gây bệnh được phân lập và nuôi cấy dương tính từ mẫu DNT

Vi khuẩn	Số mẫu nghiệm	Tỷ lệ %
<i>Streptococcus suis</i>	18	32,7
<i>Neisseria meningitidis</i>	3	5,5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	3,6
<i>Hemophilus influenzae</i>	3	5,5
<i>E. coli</i>	2	3,6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	3,6
<i>Staphylococcus, coagulase âm</i>	2	3,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1,8
<i>Streptococcus mitis</i>	1	1,8
<i>Enterococcus faecium</i>	1	1,8
<i>Listeria monogenes</i>	1	1,8
Cấy không phát triển	19	34,5
Tổng số	55	100

Ba mươi sáu (36) mẫu nghiệm có vi khuẩn phát triển khi nuôi cấy, định danh dựa vào các tính chất sinh vật và phản ứng sinh hóa có 18 mẫu cấy cho kết quả *Streptococcus suis*, chiếm tỷ lệ 32,7%; 18 (32,7%) mẫu nghiệm cấy dương tính

còn lại cho kết quả với nhiều vi khuẩn khác nhau. Có 19 mẫu nghiệm (34,5%) cấy không có vi khuẩn phát triển.

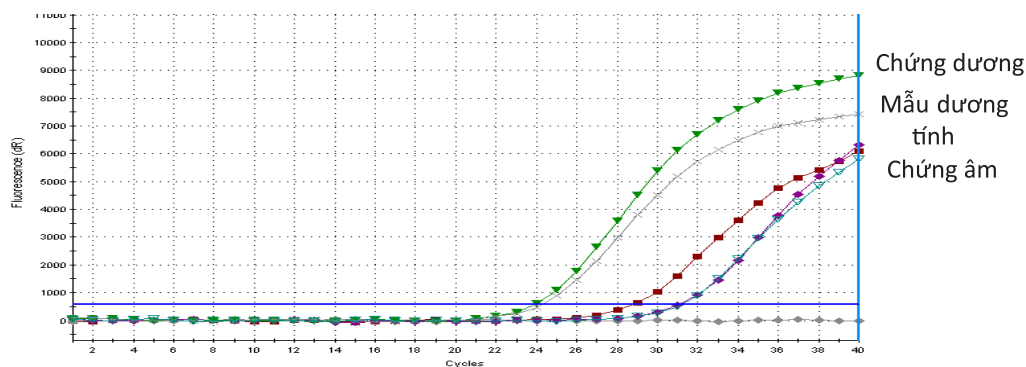
Kết quả của realtime PCR trên 55 mẫu nghiệm dịch não tủy được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả realtime PCR phát hiện *Streptococcus suis* ở mẫu nghiệm dịch não tủy

Vi khuẩn	Số mẫu nghiệm	Mẫu dương tính với realtime PCR	Tỷ lệ dương tính %
Mẫu DNT cấy dương tính <i>Streptococcus suis</i>	18	18	32,7
Mẫu DNT cấy dương tính với các vi khuẩn khác	18	0	0
Mẫu DNT cấy vi khuẩn không mọc	19	3	5,5
Tổng số	55	21	38,2

Kỹ thuật realtime PCR cho kết quả dương tính với *Streptococcus suis* ở 21 mẫu DNT, chiếm tỷ lệ 38,2%, trong đó 18 mẫu có nuôi cấy dương tính và 03 mẫu

cấy âm tính (5,5%). Các mẫu dịch não tủy cấy dương tính với các vi khuẩn khác đều cho kết quả âm tính với realtime PCR xác định *Streptococcus suis* serotype 2.



Hình 1. Kết quả realtime PCR xác định liên cầu lợn serotype 2

4. BÀN LUẬN

Liên cầu lợn gây nhiễm trùng ở vật chủ tự nhiên là lợn, tuy nhiên trong 15 năm gần đây nhiều trường hợp nhiễm trùng do vi khuẩn này gặp ở người ở Hồng Kông, Thái Lan, Việt Nam [3], [4], [5]. *Streptococcus suis* serotype 2 có vỏ polysaccharide gây nhiễm trùng chủ yếu ở người, các nghiên cứu nhiễm trùng liên cầu lợn ở Việt Nam chủ yếu do serotype 2 [3], [11]. Nguyễn Thị Hoàng Mai và các tác giả nghiên cứu trên 450 bệnh nhân viêm màng não mủ nhập viện ở Bệnh viện Nhiệt đới, thành phố Hồ Chí Minh, liên cầu lợn được xác định bằng cấy máu, cấy dịch não tủy và realtime PCR dịch não tủy. Kết quả cho thấy liên cầu lợn được xác định trên 151 bệnh nhân, chiếm tỷ lệ 33,6%, trong đó cấy máu dương tính 73 trường hợp (16,2%), cấy dịch não tủy dương tính ở 117 trường hợp (26%) và realtime PCR dương tính ở 149 (33,1%), tất cả các chủng liên cầu lợn xác định đều do serotype 2, chỉ có 1 chủng do serotype 14 [7]. Phân tích tổng hợp trên 177 nghiên cứu về nhiễm trùng do liên cầu lợn được công bố trên các tạp chí quốc tế của Vũ Thị Lan Hương và các đồng tác giả cho thấy liên cầu lợn serotype 2 chủ yếu gây viêm màng não mủ (68%), nhiễm khuẩn huyết (25%) và hồi phục sau khi điều trị thường kèm theo biến chứng điếc (39,1%), nhiều trường hợp nhiễm khuẩn nặng gây tử vong chiếm tỷ lệ cao 12,8% [3]. Bệnh nhân với viêm màng não mủ nhập viện được lấy mẫu nghiệm dịch não tủy sớm khi chưa sử dụng kháng sinh, các vi khuẩn hiếu khí gây bệnh thường được phân lập với tỷ lệ cao do phát triển khá dễ dàng trên môi trường cấy thích hợp. Số liệu của chúng tôi ở Bảng 1 cho thấy trong 55 mẫu nghiệm DNT phân lập dương tính đến 36 mẫu (65,5%), trong đó có 18 mẫu dương tính (32,7%) với *S. suis*. Có 19 mẫu nghiệm cấy vi khuẩn không mọc (34,5%).

Smith HE và các đồng tác giả đã phân tích tính đặc hiệu của vùng gen *cps2* với 35 serotype của liên cầu lợn và tìm thấy vùng gen *cps2J* đặc hiệu đối với liên cầu lợn serotype 2 và serotype 1/2 [9]. Trần Vũ Thiều Nga và các đồng tác giả ở Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng, Đại học Oxford, Bệnh viện Nhiệt đới thành phố Hồ Chí Minh đã phát triển và ứng dụng quy trình realtime PCR khuếch đại vùng gen đích *cps2J* để phát hiện các nhiễm trùng do liên cầu lợn serotype 2 ở người từ năm 2007 [1], [6], [10]. Độ nhạy phân tích của quy trình có thể phát hiện mức 100 vi khuẩn/ml, độ nhạy trong phát hiện liên cầu lợn serotype 2 ở mẫu nghiệm lâm sàng đạt đến 100% và độ đặc hiệu đạt 100% khi so với cấy vi khuẩn [6], [10]. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã dùng cặp mồi và quy

trình realtime PCR khuếch đại vùng gen đích *cps2J* mã hóa cho vỏ polysaccharide của liên cầu lợn serotype 2 như nghiên cứu của Trần Vũ Thiều Nga và xác định tỷ lệ dương tính với liên cầu lợn serotype 2 là 38,2% so với phân lập và nuôi cấy chỉ dương tính ở 32,7%, trong đó có 19 mẫu nghiệm cấy vi khuẩn không phát triển, realtime PCR đã cho thêm 3 mẫu dương tính (5,5%) với liên cầu lợn serotype 2, trong 18 mẫu cấy DNT dương tính với những vi khuẩn hiếu khí khác ở Bảng 1 realtime PCR đặc hiệu với *S. suis* serotype 2 đều cho kết quả âm tính.

Sự hiện diện của một hàm lượng kháng sinh nhỏ trong mẫu nghiệm DNT ở bệnh nhân viêm màng não mủ đã dùng kháng sinh trước có thể ức chế vi khuẩn phát triển, làm cho tỷ lệ phân lập được vi khuẩn gây bệnh thấp. Trái lại kỹ thuật realtime PCR vẫn còn cho kết quả dương tính khi vi khuẩn chết, mẫu nghiệm DNT vẫn còn DNA đặc hiệu của chúng kéo dài nhiều ngày [7]. Chúng tôi thiếu dữ liệu về bệnh sử dùng kháng sinh trước khi nhập viện của bệnh nhân, và trước thời gian lấy mẫu DNT, nên chưa thể phân tích kỹ hơn về kết quả realtime PCR và phân lập vi khuẩn ở mẫu nghiệm đã dùng kháng sinh và chưa dùng kháng sinh. Tuy nhiên, Trần Vũ Thiều Nga và các tác giả khi phân tích kết quả phân lập vi khuẩn và realtime PCR phát hiện các vi khuẩn liên cầu lợn, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* từ mẫu nghiệm DNT ở nhóm đã dùng kháng sinh trước khi nhập viện và ở nhóm chưa dùng kháng sinh cho thấy tỷ lệ cấy dương tính các vi khuẩn nêu trên là 34,7% ở nhóm đã dùng kháng sinh trước và tỷ lệ cấy dương tính là 82% ở nhóm chưa dùng kháng sinh. Trái lại, xét nghiệm realtime PCR cho tỷ lệ dương tính là 100% ở nhóm đã dùng kháng sinh và với tỷ lệ 97,7% ở nhóm chưa dùng kháng sinh, với tỷ lệ này realtime PCR cho kết quả dương tính tương đương ở hai nhóm có dùng kháng sinh và chưa dùng [6]. Theo dõi tải lượng DNA của vi khuẩn ở dịch não tủy bằng realtime PCR trong quá trình điều trị kháng sinh, Nguyễn Thị Hoàng Mai và các tác giả tìm thấy 63% (58/92) mẫu nghiệm dịch não tủy vẫn còn dương tính với realtime PCR trong 6-10 ngày điều trị kháng sinh, trong lúc phân lập vi khuẩn âm tính [7].

Viêm màng não do liên cầu lợn là một nhiễm khuẩn nặng, cấy vi khuẩn là tiêu chuẩn vàng để xác định liên cầu lợn và có vi khuẩn sống để thực hiện kháng sinh đồ tìm kháng sinh nhạy cảm. Tuy nhiên, phân lập và định danh liên cầu lợn hiện nay còn chưa thực hiện được ở nhiều phòng xét nghiệm Vi sinh tuyến tỉnh do các yếu tố sau: (i) Phần lớn bệnh nhân viêm màng não đã dùng kháng sinh trước khi

vào viện, tỷ lệ này từ 52,2 đến 63,3%, những bệnh nhân này cấy vi khuẩn thường âm tính [6], [10]; (ii) định danh liên cầu lợn cần nhiều thử nghiệm sinh hóa phức tạp như thử nghiệm đề kháng với optochin, Voges-Proskauer (-), lên men các đường salicin và trehalose, vi khuẩn không phát triển ở môi trường chứa 6.5% NaCl, ngay cả cần các bộ kit sinh hóa thương mại như API 20 strep (Biomérieux, Lyon, France) mà các phòng xét nghiệm thường không có sẵn. Realtime PCR xác định liên cầu lợn serotype 2 có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, ngay cả ở những bệnh nhân đã dùng kháng sinh và cho kết quả nhanh từ 8 đến 10 giờ sau khi có mẫu nghiệm, nên kỹ thuật realtime PCR xác định liên cầu lợn là một xét nghiệm bổ sung tốt cho các hạn chế nêu trên của nuôi cấy và định danh liên cầu lợn. Trong thực tế kỹ thuật realtime PCR xác định liên cầu lợn đã được áp dụng để xác định nhiễm khuẩn liên cầu lợn serotype 2 ở bệnh viện Nhiệt đới, thành phố Hồ

Chí Minh và Bệnh viện Nhiệt đới Quốc gia, Hà Nội từ 2007 [1].

Hạn chế của quy trình realtime PCR trong nghiên cứu này là chỉ xác định được vi khuẩn liên cầu lợn serotype 2 và serotype 1/2 mà không xác định được các serotype hiếm gặp khác ở người như liên cầu lợn serotype 14.

5. KẾT LUẬN

Dùng kỹ thuật realtime PCR phát hiện liên cầu lợn serotype 2 và cấy phân lập vi khuẩn trên 55 mẫu dịch não tủy ở bệnh nhân nghi ngờ viêm màng não mủ, kết quả realtime PCR dương tính 38,2%, cấy phân lập dương tính 32,7%. Kỹ thuật realtime PCR phát hiện được 5,5% các mẫu nghiệm không phát hiện bằng kỹ thuật cấy. Kỹ thuật realtime PCR này nên được phối hợp với phân lập vi khuẩn khi có nghi ngờ viêm màng não do liên cầu lợn ở những phòng xét nghiệm có trang bị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Horby P, Wertheim H, Ha NH, Trung NV, Trinh DT, Taylor W, Ha NM, Lien TT, Farrar J, Van Kinh N (2010) Stimulating the development of national Streptococcus suis guidelines in Viet Nam through a strategic research partnership, Bull World Health Organ; 88:458–461.
2. Palmieri, C., Varaldo, P. E., & Facinelli, B. (2011). Streptococcus suis, an Emerging Drug-Resistant Animal and Human Pathogen. Frontiers in Microbiology, 2, 235. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00235>
3. Huong VTL, Ha N, Huy NT, Horby P, Nghia HDT, Thiem VD, et al. Epidemiology, clinical manifestations, and outcomes of Streptococcus suis infection in humans. Emerg Infect Dis [Internet]. 2014 Jul [date cited]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2007.131594>.
4. Ip M, Fung KS, Chi F, Cheuk ES, Chau SS, Wong BW, Lui S, Hui M, Lai RW, Chan PK (2007) Streptococcus suis in Hong Kong, Diagn Microbiol Infect Dis;57(1):15-20.
5. Daisuke Takamatsu, Korawan Wongsawan, Makoto Osaki, Hiroto Nishino, Tomono Ishiji, Prasit Tharavichitkul, Banyong Khantawa, Achara Fongcom, Shinji Takai, Tsutomu Sekizaki (2008) Streptococcus suis in Humans, Thailand, Emerg Infect Dis.; 14(1): 181–183.
6. Nga TV, Nghia HD, Tu le TP, Diep TS, Mai NT, Chau TT, Sinh DX, Phu NH, Nga TT, Chau NV, Campbell J, Hoa NT, Chinh NT, Hien TT, Farrar J, Schultsz C., (2010) Real-time PCR for detection of Streptococcus suis serotype 2 in cerebrospinal fluid of human patients with meningitis, Diagn Microbiol Infect Dis.; 70(4-19): 461–467.
7. Mai NT, Hoa NT, Nga TV, Linh le D, Chau TT, Sinh DX, Phu NH, Chuong LV, Diep TS, Campbell J, Nghia HD, Minh TN, Chau NV, de Jong MD, Chinh NT, Hien TT, Farrar J, Schultsz C. (2008) Streptococcus suis meningitis in adults in Vietnam, Clin Infect Dis.; 46(5):659-67.
8. Bach Hoang Nguyen, Dieu Hong Nu Phan, Hien Xuan Nguyen, An Van Le, Alberto Alberti (2015), Molecular diagnostics and ITS-based phylogenetic analysis of Streptococcus suis serotype 2 in central Vietnam, J Infect Dev Ctries, 9(6):624-630.
9. Smith HE, Veenbergen V, van der Velde J, Damman M, Wisselink HJ, Smits MA, (1999)