



# **L'aérosolisation préférentielle de différentes souches de *Streptococcus suis*, un microorganisme pathogène du porc**

**Mémoire**

**Léa Gauthier-Levesque**

**Maitrise en microbiologie**  
Maitre ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Léa Gauthier-Levesque, 2015



## Résumé

*Streptococcus suis* est un agent pathogène porcin causant des pneumonies, des septicémies et des méningites. Il est aussi un agent de zoonose responsable de plusieurs éclosions en Asie. Les souches de *S. suis* sont classifiées en 35 sérotypes basés sur la composition de leur capsule polysaccharidique. *S. suis* sérotype 2 cause la majorité des infections sévères et est sous-divisé en séquence types (ST). Le ST1 est associé avec des souches hautement virulentes. En Amérique du Nord, les souches communément isolées appartiennent aux ST25 et ST28, respectivement modérément et faiblement virulentes dans un modèle animal. La présence de *S. suis* sous forme de bioaérosols dans l'air des bâtiments porcins a été démontré. Le but de ce projet est d'étudier l'aérosolisation préférentielle de différentes souches de *S. suis* en utilisant une chambre expérimentale et un nébuliseur développés pour ce projet. Bien qu'un nombre supérieur de souches doivent être étudiées, les résultats du projet suggèrent que les souches hautement virulentes du sérotype 2 de ST1 semblent être préférentiellement aérosolisées et que l'aérosolisation préférentielle de *S. suis* semble être un processus souche dépendant. Cette étude est une preuve de concept et améliore nos connaissances sur la potentielle transmission de *S. suis* via les bioaérosols.





## Abstract

*Streptococcus suis* is a swine pathogen that causes pneumonia, septicaemia and meningitis. It is also a zoonotic agent responsible for outbreaks in Asia. *S. suis* strains are classified into 35 serotypes based on the composition of their polysaccharide capsule. *S. suis* serotype 2 causes the majority of severe infections and it is subdivided into sequence types (STs). The ST1 is associated with highly virulent strains. In North America, the strains most commonly isolated belong to ST25 and ST28, which are respectively moderately and weakly virulent in animal model. The presence of *S. suis* bioaerosols in the air of swine confinement buildings has been demonstrated. The aim of this study was to better understand the aerosolization behaviour of *S. suis* by investigating preferential aerosolization of different *S. suis* strains using in-house developed environmental chamber and nebulizer. Although more strains should be studied, the results suggest that the highly virulent serotype 2 ST1 strains seem to be preferentially aerosolized and that the *S. suis* preferential aerosolization is a strain-dependant process. This study is a proof of concept and increases our knowledge on the potential aerosol transmission of *S. suis*.



# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures .....	x
Listes des abréviations et des sigles.....	xi
Remerciements .....	xiii
Avant-propos .....	xv
<b>Chapitre 1 : Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Aérosols .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Définition générale .....	3
1.1.2 Diamètre aérodynamique .....	3
1.1.3 Comportement des particules dans l'air .....	4
1.1.4 Bioaérosols.....	6
1.1.5 Études des bioaérosols en laboratoire.....	8
1.1.6 Échantillonnage de l'air.....	11
1.1.7 Analyse des échantillons d'air .....	15
<b>1.2. Aérosolisation préférentielle.....</b>	<b>19</b>
1.2.1. Évolution de l'aérobiologie .....	19
1.2.2. Transmission des maladies infectieuses via les bioaérosols .....	20
<b>1.3. <i>Streptococcus suis</i> .....</b>	<b>23</b>
1.3.1. Généralités .....	23
1.3.2. Transmission .....	24
1.3.3. Zoonose.....	24
<b>1.4. Problématique .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5. Objectifs de recherche.....</b>	<b>29</b>
<b>Chapitre 2 : Étude de l'aérosolisation préférentielle de <i>Streptococcus suis</i> .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Article: Impact of serotype and sequence type on the preferential aerosolization of <i>Streptococcus suis</i> .....</b>	<b>33</b>
2.1.1 Résumé .....	34
2.1.2 Abstract.....	35
2.1.3 Background .....	36
2.1.4 Methods.....	38
2.1.5 Results.....	41
2.1.6 Discussion .....	42

2.1.7	Conclusion.....	44
2.1.8	Competing interest.....	45
2.1.9	Authors' contribution.....	46
2.1.10	Acknowledgment.....	47
2.1.11	References.....	48
<b>Chapitre 3 : Discussion.....</b>		<b>57</b>
<b>Chapitre 4 : Conclusion et perspectives.....</b>		<b>63</b>
<b>Bibliographie.....</b>		<b>67</b>

## Liste des tableaux

Table 2-1: Serotype, sequence type (ST), origin and diseases of <i>S. suis</i> strains used in this study .....	53
Table 2-2: Primers and probe used in this study .....	54
Table 2-3: Relative cell surface hydrophobicity of <i>S. suis</i> strains used in this study .....	55

## Liste des figures

Figure 1-1 : Schéma de la formation des noyaux de gouttelettes à partir de gouttelettes.....	4
Figure 1-2 : Schéma des forces agissant sur le comportement des particules dans l'air.....	6
Figure 1-3 : Nébuliseur de particules.....	10
Figure 1-4 : Chambres environnementales pour l'étude des bioaérosols.....	11
Figure 1-5: Image en microscopie électronique à balayage d'un filtre poreux, d'un filtre membraneux et d'un filtre fibreux.....	13
Figure 1-6 : Cassettes ouverte et fermée.....	13
Figure 1-7 : Différents échantillonneurs d'air par impaction.....	15
Figure 1-8 : Schéma de la transmission via les noyaux de gouttelettes.....	20
Figure 1-9 : Schéma de l'aérosolisation préférentielle.....	22
Figure 1-10 : Photo en microscopie électronique à transmission de deux souches de <i>S. suis</i> .....	23
Figure 2-1: Comparative analysis of strains belonging to different serotypes.....	51
Figure 2-2: Ratio of different ST of <i>S. suis</i> serotype 2 in the nebulising solution and in the air.....	52

## Listes des abréviations et des sigles

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

EC : ester de cellulose

FV : fibre de verre

h : heure

L/min : litres par minute

m : mètre

NIOSH : *National Institute for Occupational Safety and Health*

nm : nanomètre

PC : polycarbonate

PCR : *polymerase chain reaction*, réaction de polymérisation en chaîne

PCV : polychlorure de vinyle

PMA : *propidium mono-azide*

PTFE : polytétrafluoroéthylène

qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*, réaction en chaîne de la polymérase quantitative

ST : *sequence type*, séquence type

UFC : unité formatrice de colonies

µm : micromètre

% : pourcentage

°C : degrés Celsius





# Remerciements

Dès ma deuxième année du baccalauréat en microbiologie, j'ai eu un coup de cœur pour la personnalité hors du commun d'une personne qui allait avoir une influence significative sur ma vie. Cette personne a accepté de m'accueillir au sein de son équipe de recherche et de son cœur. Maintenant, arrivée à la fin de deux années hautes en couleur, c'est avec le cœur gros que je te remercie Caroline Duchaine. Je ne te le dirais jamais assez, mais MERCI POUR TOUT. Merci pour l'opportunité de faire une maîtrise dans ton laboratoire, pour m'avoir permis de me développer en tant que jeune scientifique, mais aussi en tant que personne, pour les sorties de course, pour ton écoute et pour ta joie de vivre. Enfin, merci d'avoir cru en moi. Merci Caroline.

Les parents, nous en avons deux dans la vie et j'ai la chance d'avoir les meilleurs. Sans leur amour et leur dévouement, je n'aurais jamais eu la chance de partir de chez moi à 19 ans pour franchir une étape si importante dans ma vie : les études universitaires. Durant les 5 dernières années, vous avez toujours été là pour moi malgré la distance nous séparant. Vous avez toujours déployé tous les outils nécessaires afin de me voir grandir et maintenant, je suis prête à devenir une personne rayonnante comme vous. Je n'ai pas de mots pour vous dire à quel point je vous aime. Merci, vous m'avez donné le cadeau d'une vie.

Tout au long de ma maîtrise, j'ai eu la chance de côtoyer des scientifiques hors normes. Merci, Valérie de m'avoir appris tout ce qu'il y a à savoir dans le labo. Grâce à toi, j'ai développé une rigueur scientifique qui me suivra toute ma carrière. Merci, Nathalie pour la patience et le temps passé avec moi et la chambre. Sans toi, je n'y serais jamais arrivée. Tu trouves une solution pour tous les problèmes ! Merci, Marc pour ton temps et ton aide avec les protocoles qPCR. Merci aussi pour les vendredis curling ! Merci, Laetitia, tu as été d'une aide et d'une écoute précieuses tout au long de mon passage dans le labo de Caroline. Grâce à toi, j'ai su surmonter des moments de remise en question. Merci, Philippa de m'avoir tout montré de la chambre et du bulleur. J'ai beaucoup appris à tes côtés. J'ai rarement rencontré des personnes comme vous, je suis privilégiée de vous avoir croisé sur mon chemin.

Merci ma sœur! Merci de me prendre avec mes qualités et mes nombreux défauts !! Ton énergie et ta détermination me manquent quotidiennement. Un gros merci à toi et Pierre-Sébastien d'avoir créé une vraie tempête d'amour : Violette !!!! Je l'aime tant. Merci de m'avoir écoutée dans mes peines et dans mes joies.

Un merci spécial à la personne qui a su vivre avec mes périodes de stress, mes bons coups et mes moments difficiles, et ce, à tous les jours. Merci, Jean-Christophe de me permettre de partager ta vie. Je te souhaite tout le succès pour ton doctorat et, souviens-toi, que je serai toujours à tes côtés.

Dans la vie, nous rencontrons des gens avec qui tout est si simple, avec une sensation de se connaître depuis toujours. Merci, Evelyne d'avoir été mon âme sœur au labo. ! Nous avons partagé nos joies comme nos peines depuis notre première rencontre. Merci aussi pour les soupers et les nombreuses discussions sur la bouffe !!! On aime tellement ça ! Je vous souhaite encore beaucoup de soupers, de rires, de masques et... de tout finalement ! À bientôt !!

Un gros merci à toutes les personnes que j'ai côtoyé durant ces deux années et qui mettaient de la joie dans toutes les journées passées au laboratoire : Éric, Vanessa, Hamza, Kevin, Nicolas, Daniel, Gillina, Anne, Rémi, Martyne, Mélissa, Pascale, Maude, Marie-Ève, Jonathan et Hughes. Grâce à vous, mon séjour fut inoubliable et vous garderez tous une place spéciale dans mon cœur.

Merci, Luc Trudel, de m'avoir permis d'être auxiliaire de laboratoire en technique microbiologique et en physiologie bactérienne. Ce fut une expérience très enrichissante.

Merci également au Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA) et au Réseau en santé respiratoire (RSR), les bourses remises par ces organismes m'ont permis de présenter mes résultats de recherche dans un congrès d'envergure internationale soit : l'*American Association of Aerosol Research* (AAAR).

## Avant-propos

Le travail suivant est divisé en trois parties. La première partie consiste en une introduction ayant pour but de faire une mise à jour des connaissances sur l'aérobiologie, sur l'aérosolisation préférentielle et sur *Streptococcus suis*. La deuxième partie correspond à la méthodologie et aux résultats obtenus présentés sous la forme d'un article scientifique. Pour finir, la dernière partie est une discussion permettant de faire le lien entre les nouveaux résultats obtenus et la littérature.

### Article scientifique

«Impact of serotype and sequence type on the preferential aerosolization of *Streptococcus suis*». Cet article est soumis dans la revue *BMC Research Notes*. La contribution de chacun des auteurs est la suivante : le premier auteur (Léa Gauthier-Levesque) a réalisé l'ensemble des expérimentations et a préparé la première version du manuscrit. Dre Laetitia Bonifait et Marc Veillette ont aidé à la mise au point de la méthode et des protocoles qPCR. Dre Nathalie Turgeon et Dre Phillipa Perrott ont créé la chambre environnementale essentielle à la réalisation de cette étude. Dr Daniel Grenier a apporté son expertise sur *Streptococcus suis* et a permis d'obtenir les souches utilisées dans cette étude. Dre Caroline Duchaine a conçu l'étude et a supervisé les travaux ainsi que la rédaction de l'article scientifique en y apportant ses commentaires et corrections.

*La vie est parsemée d'épreuves,  
la réussite dépend de la façon d'y faire face  
–Manifeste Lululemon*

## **Chapitre 1 : Introduction**



## 1.1. Aérosols

### 1.1.1 Définition générale

L'air n'est pas seulement composé d'un mélange de gaz, il est aussi constitué de particules solides ou liquides d'une très petite taille appelées aérosols. Ces particules peuvent comprendre des molécules organiques ou inorganiques. Le contenu des aérosols est complexe et est en lien avec les composantes de la source d'émission de ces particules. Un volcan par exemple émettra de fines particules de roches et de minéraux sous forme de nuages de cendre tandis que les déserts relâchent une grande quantité de poussière dans l'air [1, 2]. Ceux-ci sont des exemples d'aérosols naturels. Il existe également des aérosols d'origine anthropogénique (*anthrôpos* qui signifie homme) donc causés par l'homme. Les particules émises par la combustion du charbon ou différents procédés industriels sont des exemples d'aérosols anthropogéniques.

L'étude des aérosols, est une science multidisciplinaire dans laquelle, un bon nombre de professionnels travaillent conjointement dans différents domaines. Des ingénieurs, des physiciens comme des microbiologistes œuvrent à étudier et à caractériser les aérosols, leur transport sur de très longues distances, la diminution de l'exposition des travailleurs de différentes industries ou plus récemment, la transmission par l'air d'agents pathogènes pour l'humain. Ce dernier champ d'expertise est en expansion et gagne en popularité auprès des centres de soins (présence de microorganismes pathogènes) ou les bâtiments agricoles (hautement contaminés).

### 1.1.2 Diamètre aérodynamique

La composition des aérosols est variable. Cette variabilité modifie la taille et la forme des aérosols. Ils peuvent être de forme sphérique, cubique ou irrégulière [3]. En aérobiologie, le terme diamètre aérodynamique est utilisé pour caractériser le comportement des particules de forme non sphérique. Le diamètre aérodynamique d'une particule correspond au diamètre d'une particule homogène sphérique de densité unitaire, ayant la même vitesse de déposition que la particule [4]. Donc, une particule présente dans l'air ayant le même diamètre aérodynamique qu'une particule homogène sphérique de densité unitaire se comportera de la même manière que celle-ci indépendamment de sa taille et sa forme.

Par définition, le diamètre aérodynamique d'un aérosol se situe entre 2 nm et 100  $\mu\text{m}$ . La limite inférieure correspond au plus petit diamètre mesurable tandis que 100  $\mu\text{m}$  est la limite de taille à laquelle les particules sont incapables de se maintenir dans l'air pour quelques secondes [4]. La vitesse de déposition des particules sera en fonction de leur diamètre aérodynamique. Par exemple, dans les mêmes conditions atmosphériques, les particules ayant un diamètre aérodynamique de 1 nm sédimenteront de 1 m en 4,6 années, celles de 10  $\mu\text{m}$  en 5,4 minutes tandis que celles de 100  $\mu\text{m}$  en 4 secondes [5].

### 1.1.3 Comportement des particules dans l'air

Bien qu'il existe un grand nombre de processus naturels menant à l'aérosolisation de particules comme l'éternuement ou le mouvement de l'eau d'une fontaine d'un centre commercial, toutes les particules aérosolisées entrant en contact avec l'air subiront des modifications. D'abord, les particules sont émises sous forme de gouttelettes, formées d'eau (ou autre solvant), de sels, de microorganismes, etc. Rapidement, le liquide contenu dans ces gouttelettes s'évapore pour former des noyaux de gouttelettes (contenu sec de la gouttelette). La figure 1-1 illustre ce phénomène.

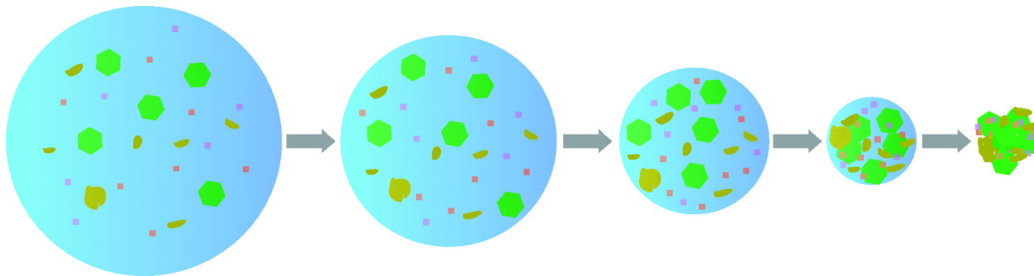


Figure 1-1 : Schéma de la formation des noyaux de gouttelettes à partir de gouttelettes. Figure tirée de [6].

Les noyaux de gouttelettes forment ainsi des aérosols qui ont la possibilité d'être transportés sur de grandes distances. Pour se déplacer, les noyaux de gouttelettes suivront les courants d'air de leur environnement. À l'intérieur, la ventilation, les mouvements humains et les courants de convections de la chaleur déplaceront les aérosols. Tandis qu'à l'extérieur, le vent et les activités industrielles transporteront les particules. Le diamètre aérodynamique de l'aérosol modulera la distance et le comportement de celui-ci. La vitesse de formation de l'aérosol, l'humidité de l'environnement ainsi que la température sont différents paramètres influençant le diamètre aérodynamique d'un aérosol donc la distance qu'il parcourra [7].



De plus, plusieurs facteurs physiques régissent le mouvement des particules aéroportées. Parmi ceux-ci, notons par exemple la gravité, les forces électrostatiques et de Van der Waals, la température et l'inertie. L'importance de ces différents facteurs sur le maintien d'une particule dans l'air dépendra du diamètre aérodynamique de cette dernière. Par exemple, les grosses particules de 200  $\mu\text{m}$  resteront en suspension dans l'air pour un très court laps de temps puisqu'ils sédimenteront en raison de la force gravitationnelle. La figure 1-2 résume chacun des facteurs physiques influençant le mouvement des particules dans l'air.

La sédimentation se définit comme étant la force gravitationnelle qui amène une particule en suspension dans l'air à tomber au sol ou une surface due à sa masse. Ce phénomène est observé lorsque la résistance de l'air n'est pas assez grande pour maintenir une particule en suspension (Figure 1-2, B). Les particules ayant un diamètre aérodynamique plus grand que 1  $\mu\text{m}$  obéissent à ce mécanisme [8, 9]. Les particules de très petite taille régissent au principe de diffusion, soit celles ayant un diamètre aérodynamique plus petit que 0,1  $\mu\text{m}$  [10].

Le déplacement aléatoire (mouvement brownien) d'une particule par diffusion est dû aux nombreuses collisions de ces fines particules avec les molécules de gaz. Les particules se déplacent d'une zone concentrée vers une autre de plus faible concentration. Elles ne suivent donc pas le flot d'air. Ce mécanisme permet aux particules de petite taille d'entrer en contact avec des surfaces (Figure 1-2, D).

L'interception d'une particule sur une surface met en relation le flot d'air et la taille d'une particule. L'interception a lieu lorsque la particule suit le flot d'air (sans être déviée), mais que ses dimensions sont assez importantes pour qu'elle entre en contact avec une surface donnée [10]. Pour une même ligne de flot d'air, une particule peut être interceptée tandis qu'une autre non puisqu'elle a une dimension inférieure à la première (Figure 1-2, C).

L'impaction inertielle d'une particule est directement liée à son inertie. Contrairement à l'interception, la particule n'est pas capable de rester dans sa ligne de flot d'air dû à son inertie. Elle suit le flot jusqu'à ce qu'un changement de direction survienne et que son inertie l'empêche de suivre ce changement. Elle ira ensuite s'impacter sur une surface (Figure 1-2, A) [11].

La déposition par la force électrostatique s'applique lorsqu'une particule se dépose dû à sa charge électrostatique. Les particules de charge électrostatique contraire s'attirent tandis que deux de la même polarité s'opposent dû à la répulsion électrostatique. Donc, une particule chargée positivement aura tendance à se diriger vers les surfaces ayant une charge négative (Figure 1-2, E) [12].

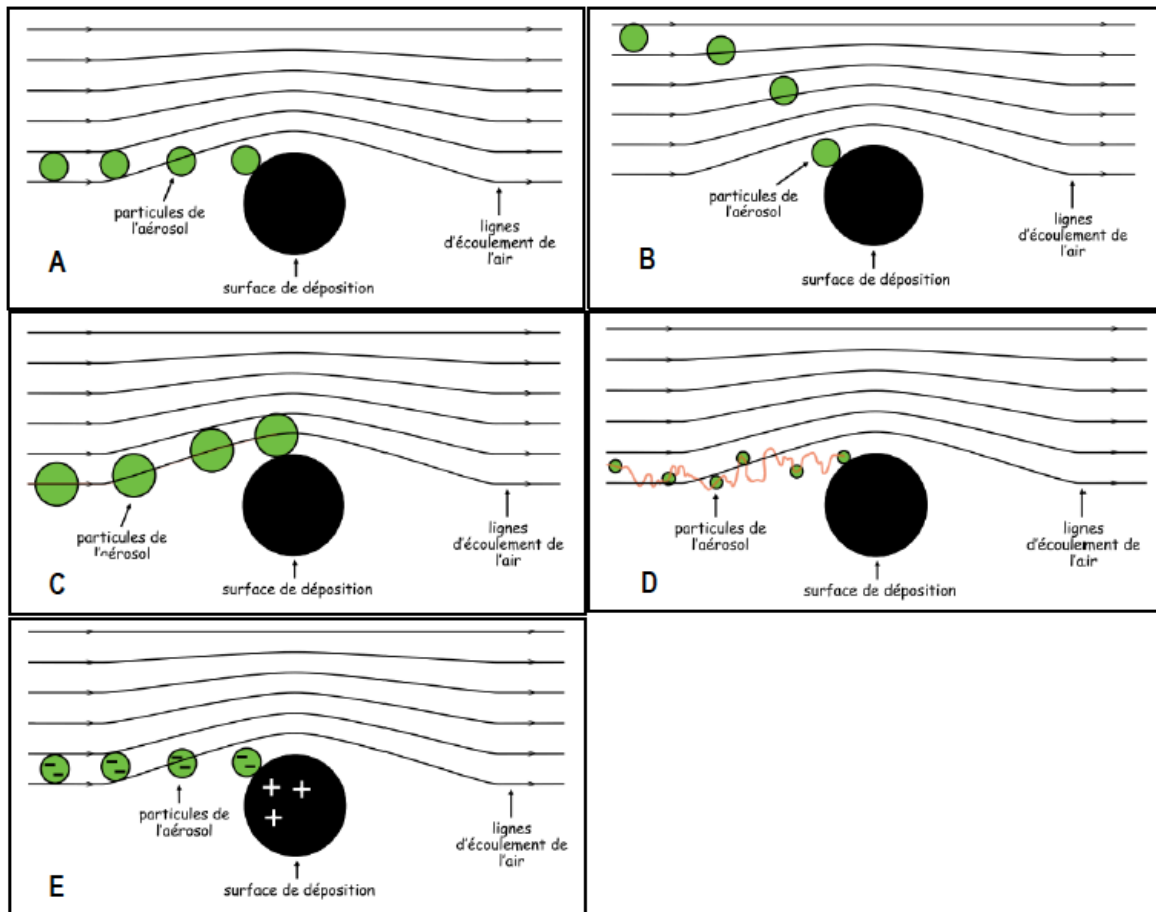


Figure 1-2 : Schéma des forces agissant sur le comportement des particules dans l'air. A) Inertie, B) Sédimentation, C) Interception, D) Diffusion et E) Force électrostatique. Figure tirée de [5, 13].

#### 1.1.4 Bioaérosols

Lorsqu'un aérosol est d'origine biologique, il est nommé bioaérosol. Les bioaérosols se composent d'entités biologiques complètes, mortes ou vivantes, comme des virus, des bactéries ou des moisissures, mais également de molécules dérivées d'organismes vivants soient des toxines, des protéines ou des acides nucléiques [5]. Un bioaérosol peut également contenir des fragments d'organismes de taille plus importante comme du pollen de plantes ou des poils d'animaux domestiques. Les bioaérosols peuvent être produits, entre autres, par la toux, les éternuements, la respiration, le rire, les vomissements, les diarrhées, etc. [14, 15]. Ils sont aussi émis spontanément par la surface du corps humain à cause des gradients de température induisant des courants de convection qui entraînent la libération de microorganismes qui colonisent la peau [16].

Comme ils sont de très petite taille, les microorganismes présents sous forme de bioaérosols peuvent être transportés sur de grandes distances lorsque les conditions météorologiques sont favorables [17]. Ainsi sous forme d'aérosols, ils sont à même d'entrer en contact avec les muqueuses (œil, nez et bouche) et causer divers effets sur la santé. Les effets sur la santé due à une exposition aux bioaérosols vont d'une réponse allergique jusqu'à une infection pouvant être mortelle [18].

La possibilité qu'a une bactérie pathogène d'infecter son hôte, lorsqu'inhalée, est en fonction de sa survie dans l'air. Celle-ci est influencée par différents facteurs environnementaux comme la température, l'humidité relative et les radiations [19, 20]. Comme il existe des caractéristiques membranaires différentes entre les bactéries à Gram positif (paroi riche en peptidoglycane) et à Gram négatif (pauvre en peptidoglycane et avec une membrane externe), il est impossible de porter des conclusions générales sur l'effet des facteurs environnementaux sur la survie dans l'air des bactéries. Par exemple, la survie de certaines bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Klebsiella*) est meilleure à des pourcentages d'humidité relative élevés, des températures basses et si elles sont contenues dans des petites gouttelettes [20, 21].

Plusieurs études démontrent que la température a un effet sur la survie des bactéries dans l'air. En effet, une température supérieure ou égale à 24 °C diminue la survie des bactéries aéroportées [19]. Ceci a été démontré pour plusieurs espèces bactériennes autant à Gram négatif qu'à Gram positif comme *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Chlamydia* et *Mycoplasma* [19].

Tout comme la température, l'humidité relative (RH) a un impact sur la survie des bactéries dans l'air. Cependant, les effets de ce paramètre sont beaucoup plus complexes. Par exemple, pour les mêmes paramètres environnementaux (22 °C et 39% de RH) quatre bactéries à Gram négatif (*Enterobacter cloacae*, *Erwinia herbicola*, *Klebsiella planticola* et *Pseudomonas syringae*) ont un niveau de survie différent lors de l'aérosolisation [22]. De plus, la survie de *Klebsiella planticola* et *Pseudomonas syringae* n'est pas affectée à 54% de RH et 27 °C jusqu'à une distance de 15 m. En diminuant l'humidité relative entre 40 et 45%, il y a une diminution de la survie dans l'air pour ces deux bactéries [21]. Pour le même genre bactérien, l'agent pathogène *Klebsiella pneumonia*, démontre une stabilité à une humidité relative de 60% [23]. Marthi et collaborateurs ont émis l'hypothèse qu'une humidité relative élevée crée des amas de bactéries et ainsi pourrait avoir un effet protecteur sur celles-ci [22].

L'état de la bactérie avant d'être aérosolisé a également un impact sur sa survie dans l'air [19]. Initialement, la bactérie peut être dans un environnement sec comme de la poussière ou dans un environnement humide comme les muqueuses nasales humaines ou la salive. Les bactéries provenant de milieux secs ont tendance à absorber l'humidité tandis que les bactéries provenant de milieux humides ont

tendance à sécher. Ces changements d'hydratation de la bactérie ont un effet sur sa survie sous forme de bioaérosols [19]. Cox et collaborateurs ont étudié ce phénomène avec la bactérie *Pasteurella tularensis* [24]. Ils ont démontré que lorsque *P. tularensis* est aérosolisé à partir d'une suspension humide, sa survie est minimale entre 50 et 55 % RH. Lorsqu'aérosolisée à partir d'une suspension sèche, *P. tularensis* montre un niveau de survie minimum à 75 % RH.

Les rayonnements ultraviolets (UV), quant à eux, ont un effet mutagène sur les bactéries aéroportées principalement à une longueur d'onde de 260 nm. Les rayons UV créent des dimères de pyrimidines dans l'ADN bactérien. Ces pyrimidines adjacentes forment deux liaisons covalentes et inhibent la réplication de l'ADN [25]. Les mutations causées par les rayons UV ne sont pas nécessairement létales puisque les bactéries sont en mesure de reconstruire leur génome via divers mécanismes de réparation de l'ADN. Cependant, une exposition prolongée aux rayons UV est létale pour les bactéries qui ne sont plus en mesure de réparer le grand nombre de cassures dans leur génome [25]. Comme les UV sont des rayons peu pénétrants, leur effet bactéricide diminue lorsque l'humidité augmente probablement à cause de l'augmentation de la taille des gouttelettes [26]. Ce pouvoir germicide des rayons UV est étudié pour son utilisation dans les hôpitaux [14].

Il existe donc un grand nombre de facteurs environnementaux entraînant un stress chez les bactéries sous forme de bioaérosols et ces paramètres ont un impact direct sur la survie des bactéries dans l'air et par le fait même sur leur potentiel infectieux.

### 1.1.5 Études des bioaérosols en laboratoire

L'étude des bioaérosols *in vitro* permet, entre autres, le développement de méthodes de génération de particules, le développement de nouvelles méthodes d'échantillonnages, l'étude de l'impact de facteurs environnementaux sur la survie d'un microorganisme pathogène ou l'étude d'effet de l'inhalation sur la santé d'organismes modèles. Il est donc possible d'étudier les bioaérosols dans un environnement de laboratoire contrôlé (chambre expérimentale) où ils sont produits artificiellement, via des nébuliseurs.

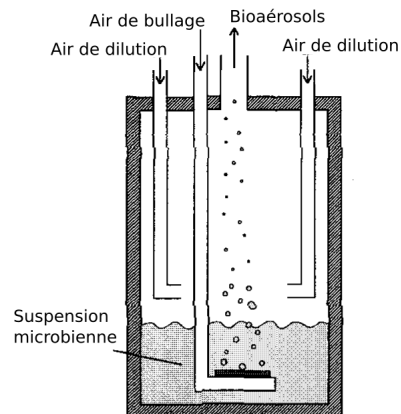
### 1.1.5.1 Nébuliseurs

Les bioaérosols produits *in vitro* sont créés à partir de nébuliseurs. La nébulisation permet d'obtenir une suspension de particules de tailles différentes (gouttelettes et noyaux de gouttelettes). La nébulisation à partir d'une solution peut se faire à l'aide d'un *jet nebulizer* ou nébuliseur à jet comme le Collison (Figure 1-3, A) ou le TSI 9302. La nébulisation avec le nébuliseur à jet aérosolise des particules par l'entrée, à grande vitesse, d'un flot d'air dans un contenant qui héberge une suspension d'un microorganisme à aérosoliser. Ce flot d'air frappe perpendiculairement l'extrémité supérieure d'un tube vertical dont l'extrémité inférieure baigne dans la solution à nébuliser. Le flot d'air crée une différence de pression entre les deux extrémités du tube entraînant ainsi la solution de nébulisation vers l'extrémité supérieure. La solution ainsi entraînée vers le haut du tube ira frapper le flot d'air et il y aura ainsi formation de gouttelettes de grosseurs différentes. Les plus grosses particules iront s'impacter sur la surface du récipient du nébuliseur et seront recyclées [27]. Les petites particules suivront le flot d'air et seront entraînées à l'extérieur du contenant de nébulisation et feront partie du nébulisat. Dans ce type de système, il est possible de moduler certains paramètres afin de modifier la taille des particules. Par exemple, en modifiant la distance entre l'extrémité supérieure du tube et la surface d'impaction, en changeant le débit du flot d'air ou encore la concentration en sels de la solution.

Il est important de noter que la production artificielle en laboratoire de bioaérosols, à partir d'une solution, peut être dommageable pour les microorganismes étudiés. À l'aide d'un nébuliseur à jet, la solution est frappée par un flot d'air entrant à haute vitesse, ceci peut engendrer des dommages à la paroi cellulaire du microorganisme [28, 29]. Zhen *et al* [30] ont démontré que le Collison créait un stress pour l'intégrité de la membrane cellulaire. Ces nébuliseurs n'ont pas été construits pour l'aérosolisation de particules biologiques, c'est pourquoi des méthodes plus douces ou naturelles ont été développées pour aérosoliser des microorganismes. Dans les nébuliseurs naturels comme des bulleurs (Figure 1-3, B), l'air comprimé passe à travers un disque de métal poreux et crée des bulles dans la solution à nébuliser [31-34]. La formation de bulles dans une suspension par l'air ou un gaz a été rapportée dans la nature et via des moyens anthropologiques. De manière naturelle, les bulles sont produites, entre autres, dans les océans [35, 36] et de manière anthropogénique par différents processus dont les tours de refroidissement, les piscines de thérapies et les usines de traitements d'eaux usées [37-39].



A)



B)

Figure 1-3 : Nébuliseur de particules. A) Nébuliseur Collison 24 jets et B) Bulleur. Figure adaptée de [34].

### 1.1.5.2 *Chambre expérimentale*

Afin d'étudier les bioaérosols en laboratoire, il faut également prévoir une chambre pour les accueillir. Suite à la nébulisation, les bioaérosols sont acheminés dans une chambre expérimentale ou ils peuvent être produits directement à l'intérieur de la chambre. Il existe très peu de chambres expérimentales commerciales et celles-ci peuvent ne pas correspondre aux objectifs de l'étude, il faut donc créer une chambre selon les travaux réalisés et les hypothèses émises. Selon les besoins, une chambre peut être statique ou rotative. Une chambre statique est utilisée simplement pour contenir les bioaérosols produits afin de les échantillonner. Une chambre rotative, contrairement aux chambres statiques, permet l'étude longitudinale des bioaérosols, puisque ceux-ci sont maintenus en suspension grâce à la rotation de la chambre [40]. La figure 1-4 montre en A) une chambre environnementale statique et en B) rotative. Il existe également des chambres expérimentales de transition. Un exemple de chambre de transition est la GenaMimi™ (SCL MedTech, Montréal, Canada). Dans cette chambre, les aérosols sont produits à partir d'un nébuliseur et acheminés dans la chambre où ils sont mélangés avec de l'air et maintenus dans un flot d'air en continu [41].

D'importants paramètres doivent être pris en compte dans la construction d'une chambre d'aérosolisation. D'abord, le matériel utilisé pour construire la chambre doit être facile à nettoyer/ désinfecter et doit aussi être électrostatiquement neutre [5]. Des matériaux souvent utilisés pour la construction de chambres d'aérosolisation sont l'aluminium et l'acier inoxydable [5]. L'ajout d'air de turbulence ou encore de ventilateur mélange l'air. Pour finir, il est important de garder une pression interne négative pour prévenir les fuites d'agents biologiques pathogènes dans l'environnement de travail. Afin de réduire les risques d'exposition, il

est possible de placer la chambre d'aérosolisation à l'intérieur d'une hotte de bioconfinement, selon la taille de celle-ci.

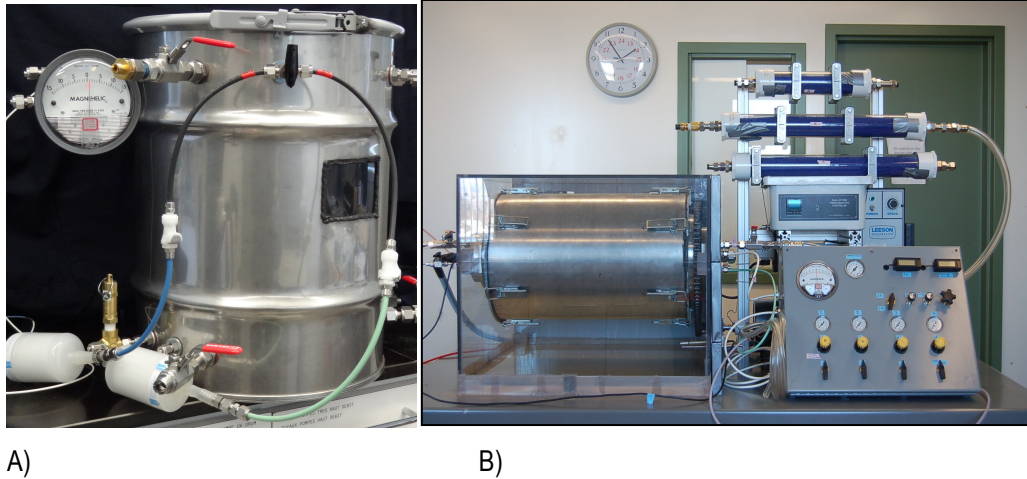


Figure 1-4 : Chambres environnementales pour l'étude des bioaérosols. Photo de A) Chambre environnementale statique et B) chambre environnementale rotative.

Pour échantillonner l'air, il est important de prévoir différents ports d'échantillonnage. Par exemple, un port pour l'échantillonnage à partir d'un filtre (voir section 1.1.6.1.), un port pour l'entrée d'aérosols, un autre pour permettre l'entrée ou la sortie passive de l'air.

### 1.1.6 Échantillonnage de l'air

Pour les études *in vitro* ou pour détecter la présence d'un microorganisme pathogène dans l'air afin de le quantifier, il faut d'abord être en mesure d'échantillonner l'air efficacement. L'échantillonnage est efficace si :

- Les bioaérosols récoltés sont représentatifs de ceux présents dans l'environnement (diamètre aérodynamique, concentration)
- Les bioaérosols recherchés dévient du flot d'air et sont capturés par l'échantillonneur
- L'intégrité physique et biologique (viabilité) des bioaérosols sont conservée

Les méthodes les plus communément utilisées de nos jours pour l'échantillonnage des bioaérosols sont la filtration et l'impaction. Certains échantillonneurs modernes permettent de séparer les particules selon les fractions inhalable, thoracique et respirable selon le niveau de déposition dans les voies respiratoires humaines [42, 43]. La fraction inhalable correspond aux particules dont le diamètre aérodynamique se situe entre 0 et 100  $\mu\text{m}$  se retrouvant dans l'ensemble de l'arbre respiratoire et ayant un impact sur la santé qui n'est pas lié au site de déposition. Les particules de la fraction thoracique ont impact sur la santé les voies respiratoires intermédiaires (trachée, bronches) et la région des échanges gazeux (bronchioles et alvéoles pulmonaires). Le diamètre aérodynamique médian des particules de la fraction thoracique est de 11,64  $\mu\text{m}$ . La fraction respirable des aérosols représente un risque potentiel pour la région des échanges gazeux puisque la taille médiane des particules de cette fraction est de 4  $\mu\text{m}$ .

Il existe également des échantillonneurs personnels pouvant être portés par des personnes dans le but de connaître leur exposition aux bioaérosols. Afin de déterminer le bon échantillonneur à utiliser afin d'obtenir un échantillon représentatif de l'environnement, plusieurs paramètres doivent être pris en compte comme la concentration probable du microorganisme dans l'air, le débit de l'échantillonneur, son poids et ses dimensions [44]. Un mauvais choix d'échantillonneur pourrait mener à des faux négatifs et ainsi sous-estimer l'exposition à des bioaérosols infectieux.

#### *1.1.6.1 Filtration*

La filtration permet de récolter les bioaérosols sur une surface (filtre). Le flot d'air entraîne les particules sur un filtre. Pour échantillonner les bioaérosols par filtration, il faut prendre en considération le diamètre aérodynamique des particules, la vitesse du flot d'air et la porosité du filtre.

Il existe différents types de filtres, les plus utilisés sont en polychlorure de vinyle (PCV), en polycarbonate (PC), en ester de cellulose (EC) et en fibre de verre (FV). Ces différents filtres peuvent être poreux, membraneux ou fibreux. Les filtres PC sont des filtres poreux et lisses. Les filtres poreux ont des pores d'une taille uniforme, d'une forme cylindrique et perpendiculaire à la surface du filtre (Figure 1-5, A). Les particules plus grosses que la taille des pores seront captées efficacement par impaction et interception. Les particules plus petites que la taille des pores sont échantillonnées par diffusion dans des proportions moindres. Leur surface lisse permet de récolter les microorganismes dans un tampon d'élution. Les filtres membraneux sont composés d'une matrice complexe qui complique le passage de l'air (Figure 1-5, B). Ce passage tumultueux permet de collecter les particules par interception avec les structures du filtre. La



grosseur des pores est établie en manufacture par la filtration d'une solution contenant des particules de grosseur connue. Les filtres fibreux sont faits de fibres orientées de manière aléatoire dans deux dimensions (Figure 1-5, C). Les particules sont captées par les fibres via les forces d'interception, d'impaction et de diffusions. Pour capter efficacement les grosses particules, il faut utiliser un flot d'air faible [45].

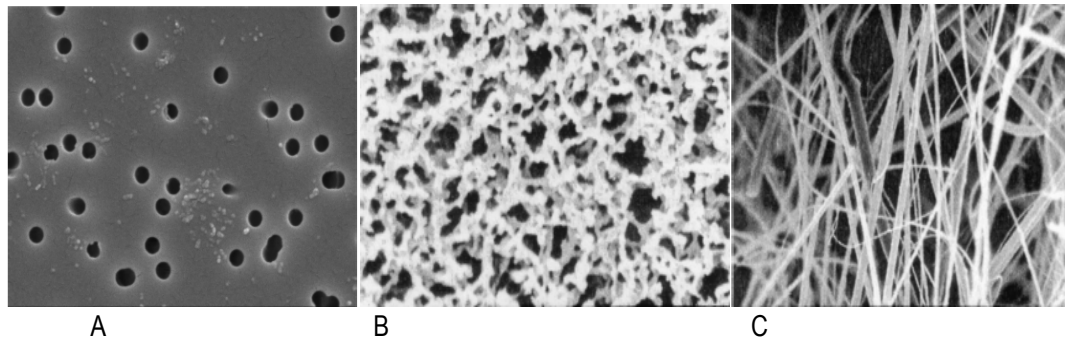


Figure 1-5: Image en microscopie électronique à balayage d'un filtre poreux (A), d'un filtre membraneux (B) et d'un filtre fibreux (C). Figure tirée de [45].

En vue de leur utilisation, les filtres sont installés sur un support, une cassette (Figure 1-6), et cette dernière est reliée à une pompe. Ces cassettes peuvent être à face ouverte ou fermée. Les cassettes à face ouverte exposent directement le filtre aux aérosols tandis que les cassettes à face fermée protègent les filtres [45].



Figure 1-6 : Cassettes ouverte (gauche) et fermée (droite). Figure tirée de [45].

Une étude portant sur la comparaison de différents échantillonneurs d'air réalisée par Wang *et al.*, a démontré que les filtres en polycarbonate (PC) sont les filtres les plus efficaces pour échantillonner les bactéries totales et cultivables, autant en quantité qu'en diversité [46]. Les autres filtres testés étaient les filtres en gélatine et en polytétrafluoroéthylène (PTFE). Les auteurs citent que les filtres en gélatine sont très fragiles suite à un long échantillonnage (6 h) et qu'il est difficile de collecter des bioaérosols d'un filtre en PTFE puisque ces filtres sont hydrophobes. Le principe même de la filtration peut mener à une perte de la viabilité des microorganismes présents sur le filtre puisqu'ils subissent la dessiccation jusqu'à la fin de l'échantillonnage [4]. Des résultats contradictoires ont été obtenus par Durant *et al.* qui étudiaient l'effet du temps d'échantillonnage sur la viabilité des bactéries et des moisissures dans l'air des usines de compostage [47]. Ils ont démontré qu'après un temps d'échantillonnage de 6 h, la viabilité des bioaérosols n'était pas affectée. Cependant, les auteurs n'ont pas comparé l'efficacité de récupération des filtres avec celui d'échantillonneur comme un impacteur ou un Andersen (voir section 1.1.6.2) reconnu pour avoir une meilleure efficacité de récupération.

#### 1.1.6.2 *Impaction inertielle*

L'impaction inertielle est la déposition d'une particule sur une surface après avoir dévié du flot d'air en raison de son inertie [48]. La force d'inertie est proportionnelle au diamètre aérodynamique des particules. Dans un échantillonneur, les dimensions et la forme de l'orifice de celui-ci ont un effet sur l'impaction inertielle. Sur le marché, il existe des impacteurs à trous multiples, à fentes et à centrifugation (cyclone).

Les impacteurs à trous multiples peuvent avoir un, deux ou plusieurs étages contenant jusqu'à 400 trous. Dans les impacteurs à trous multiples en cascades, donc avec plusieurs étages, la vitesse de l'air augmente lorsque l'air passe à travers les étages puisque la taille des trous diminue. Un bon exemple est l'impacteur Andersen 6 étages (Figure 1-7, A). Les particules avec le plus d'inertie, donc plus grosses, seront retenues sur la surface de collection des étages supérieurs où la vitesse de l'air est moins importante. Avec l'Andersen 6 étages, les particules sont séparées sur les étages selon leur diamètre aérodynamique : sur le premier étage, les particules de 7,0  $\mu\text{m}$  et plus, sur le deuxième étage, les particules de 4,7 à 7,0  $\mu\text{m}$ , sur le troisième étage, les particules de 3,3 à 4,7  $\mu\text{m}$ , sur le quatrième étage, les particules de 2,1 à 3,3  $\mu\text{m}$ , sur le cinquième étage, les particules de 1,1 à 2,1  $\mu\text{m}$  et sur le sixième étage, les particules de 0,6 à 1,1  $\mu\text{m}$  [49].

Le mode de fonctionnement des impacteurs à fentes est relativement simple. L'orifice de l'impacteur est rectangulaire de taille différente selon la compagnie. La surface de collection est stationnaire ou rotative.

La surface de collection peut être une boîte de Pétri contenant un milieu de culture ou encore une lame de microscope [48].

Dans les impacteurs par centrifugation, les particules s'impactent sur les parois du récipient puisqu'elles dévient du flot d'air en tirebouchon par la force inertielle. Il existe deux sortes d'impacteurs par centrifugation, les secs où les particules s'impactent sur les parois sèches du récipient comme le NIOSH 2 étages et les humides comme le SKC BioSampler® (Figure 1-7, B) dont les parois sont mouillées par la solution de collection.

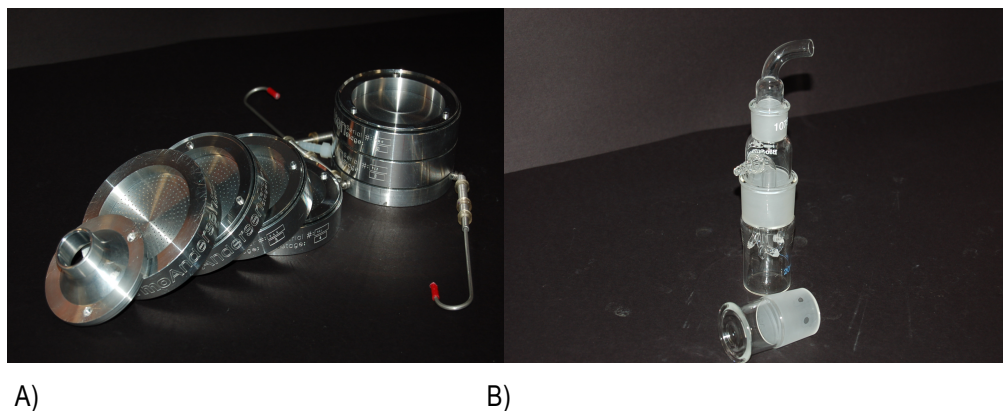


Figure 1-7 : Différents échantillonneurs d'air par impaction. A) Impacteur en cascade Andersen 6 étages et B) Impacteur par centrifugation liquide le SKC BioSampler®.

### 1.1.7 Analyse des échantillons d'air

Il existe plusieurs méthodes d'analyse du contenu microbien des aérosols. Ces méthodes sont complémentaires puisqu'aucune méthode n'est universelle et ne permet l'analyse de l'ensemble du contenu microbien des bioaérosols. Ces méthodes peuvent être quantitatives ou qualitatives.

#### 1.1.7.1 Culture

La culture des bactéries ou des moisissures sur des milieux de culture est possible via l'échantillonnage de l'air directement sur les milieux gélosés, un liquide de collection ou un éluat étalé sur un

milieu de culture. Le temps d'échantillonnage doit être ajusté pour l'échantillonnage directement sur les boîtes de Pétri pour ne pas saturer le milieu et ainsi rendre le décompte impossible. Il faut aussi noter que lors de l'échantillonnage direct sur un milieu de culture, une unité formatrice de colonie (UFC) provient d'une particule. Cependant, dans une particule, il peut y avoir plus qu'une cellule microbienne. Donc, ceci sous-estime encore une fois le nombre réel de microorganismes dans l'échantillon. Lorsque l'échantillonnage d'air se fait à l'aide de filtres, il est possible d'éluer les bioaérosols présents sur les filtres dans une solution et ensuite étaler des aliquotes de cette solution.

Lors de l'utilisation d'échantillonneurs liquides comme le SKC BioSampler®, il est important de prendre en considération l'évaporation du liquide [50]. C'est pour cette raison qu'il ne peut être utilisé plus de 30 minutes. Échantillonner dans un liquide prévient la dessiccation et facilite l'extraction des acides nucléiques [51]. Cependant, l'utilisation de liquide dilue beaucoup l'échantillon.

Il est important de se rappeler que les cellules présentes dans un échantillon d'air sont hautement stressées dû à l'échantillonnage, le passage dans l'air ou le processus d'aérosolisation, l'utilisation d'antibiotiques est donc à proscrire [52]. La culture peut ne pas être possible pour certaines bactéries et ainsi sous-estimer la quantité à laquelle des travailleurs sont exposés par exemple.

#### *1.1.7.2 Biologie moléculaire*

La biologie moléculaire permet l'analyse des bioaérosols via les acides nucléiques, ADN ou ARN. Les acides nucléiques doivent d'abord être extraits pour les analyses subséquentes. La biologie moléculaire peut être utilisée pour détecter un microorganisme en particulier grâce à une séquence d'ADN qui lui est propre ou encore un genre en particulier dont les espèces possèdent une séquence commune. La séquence génique ciblée dans la majorité des essais est l'ARNr 16S bactérien ou ARNr 18S pour les eucaryotes.

Dans l'air, les microorganismes peuvent se retrouver en stade physiologique viable, mais non cultivable. Certains microorganismes ont une croissance très lente ou très difficile comme les mycobactéries. Pour ces raisons, et bien que la culture soit la méthode d'identification usuelle, elle ne permet pas toujours d'isoler les microorganismes capturés dans l'air. La biologie moléculaire est souvent la seule méthode possible pour détecter la présence de microorganismes dans l'environnement. Comme la culture, l'amplification par qPCR comporte des inconvénients. Il existe des molécules inhibant les réactions d'amplification comme des protéines, des acides gras ou des polysaccharides [53, 54] ceux-ci peuvent provenir de l'environnement ou encore de la méthode d'échantillonnage. Par exemple, l'utilisation de filtres en

gélatine peut mener à une diminution de l'efficacité d'amplification [55]. Il est possible de diluer les échantillons et par le fait même diminuer la concentration des inhibiteurs et ainsi permettre l'amplification [54]. Plusieurs études ont comparé la quantification par la culture et par des outils de biologie moléculaire [53, 56-58] et toutes ces études ont démontré que la quantification par qPCR dénombre une plus grande quantité de bactéries dans l'air comparativement à la culture. Les méthodes de biologie moléculaire permettent également de mettre en évidence une plus grande diversité bactérienne [53].



## 1.2. Aérosolisation préférentielle

### 1.2.1. Évolution de l'aérobiologie

Bien avant les pionniers de la microbiologie que sont Pasteur et Koch, les populations ont craint les vapeurs nocturnes nauséabondes (appelées miasmes). La théorie des miasmes remonte au Moyen-Âge. Cette théorie dicte que les miasmes, particules provenant de matière en décomposition, étaient responsables de la transmission des maladies via des émanations empoisonnées [5, 59]. Cette théorie a servi à expliquer la transmission de la peste de cette époque. Au 17<sup>e</sup> siècle, comme la transmission de la peste était associée aux mauvaises odeurs, le médecin De Lorme a conçu un masque à bec de canard afin d'y déposer des plantes aromatiques et ainsi se protéger. La théorie des miasmes a permis la mise au point des premiers protocoles sanitaires et l'isolement des patients contagieux.

Depuis le milieu du 19<sup>e</sup> siècle, la théorie des germes est celle qui s'oppose à la théorie de la génération spontanée et des miasmes. Grâce aux études de Pasteur avec les ballons aux cols de cygne, il fut démontré qu'un milieu de culture stérile n'ayant aucun contact avec l'air ambiant restera intact jusqu'à ce qu'il soit mis en contact avec l'air et que les microorganismes présents en suspension le contaminent [60]. Également, les travaux de Koch (et les postulats qu'il a formulés) permettent de faire le lien entre une maladie et un microorganisme. Ceci réfuta la théorie de la génération spontanée qui dicte que les microorganismes apparaissent spontanément sur un milieu et que ceux-ci ne proviennent pas d'une division cellulaire ou de parents. Donc, selon les travaux de Pasteur et ceux effectués par Koch, les microorganismes sont responsables de diverses maladies.

Par la suite au 20<sup>e</sup> siècle, la théorie des gouttelettes permettra d'expliquer la transmission de diverses maladies infectieuses et respiratoires [43]. Les microorganismes présents dans des gouttelettes de plus de 200  $\mu\text{m}$  demeurent en suspension dans l'air pour une courte période avant de sédimenter au sol. Les éternuements ou la toux d'une personne infectés libéreront une grande quantité de gouttelettes contenant potentiellement des microorganismes infectieux [7]. Une personne se trouvant dans l'environnement immédiat d'un patient (par exemple le personnel soignant) sera exposée à ces gouttelettes via les muqueuses nasales et oculaires. Une infection souvent associée aux gouttelettes est la grippe causée par le virus Influenza [61].

Plus récemment, la voie de transmission de certains virus a été élucidée grâce à la théorie des noyaux de gouttelettes ou aérosols. Les noyaux de gouttelettes correspondent au contenu asséché (les sels, les protéines et les microorganismes) d'une gouttelette suite à son évaporation. Cette théorie dicte que les noyaux de gouttelettes, contrairement aux gouttelettes, resteront en suspension dans l'air sur une période

pouvant atteindre plusieurs heures (Figure 1-8) [7]. La possibilité qu'a un microorganisme de se transmettre via les noyaux de gouttelettes varie en fonction de divers facteurs par exemple sa survie sous forme asséchée ou sa dose infectieuse. Un exemple de virus qui s'est transmis via les noyaux de gouttelettes est le virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS). Ce virus s'est propagé via l'air à travers plusieurs tours d'un complexe d'habitation à Hong-Kong se trouvant à une bonne distance les unes des autres [62].

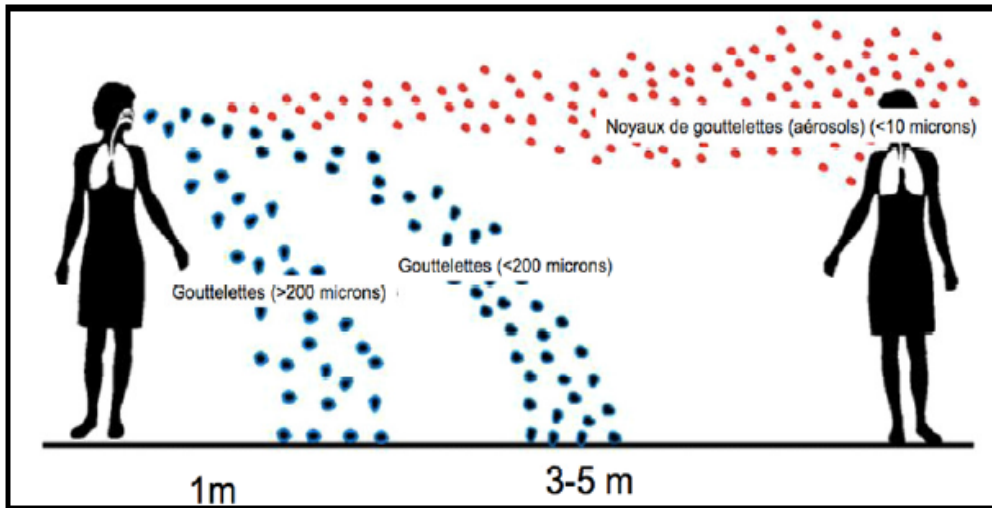


Figure 1-8 : Schéma de la transmission via les noyaux de gouttelettes. Figure tirée de [5].

### 1.2.2. Transmission des maladies infectieuses via les bioaérosols

Pour qu'un individu développe une maladie liée à un agent pathogène, il doit avoir été en contact avec ce microorganisme. Comme les microorganismes n'apparaissent pas de manière spontanée sur une surface ou sur les mains d'une personne, ils doivent avoir été transportés. Pour ce faire, les microorganismes sont transportés via différents modes de transmission comme un contact direct entre personnes, par contact indirect avec une surface contaminée (fomites), via un vecteur (animaux ou insectes), les gouttelettes émises par une personne infectée ou encore les aérosols produits par l'évaporation de l'eau contenue dans les gouttelettes. Un microorganisme peut utiliser plus qu'un de ces moyens. L'air étant un moyen de transmission des infections possible, la transmission des maladies infectieuses via les noyaux de gouttelettes peut se faire de manière obligatoire, préférentielle ou opportuniste. Ceci est basé sur la possibilité qu'a un microorganisme à se transmettre et infecter son hôte via des noyaux de gouttelettes [43].



À ce jour, il existe un seul microorganisme qui doit obligatoirement être transmis via les noyaux de gouttelettes pour infecter son hôte. Ce microorganisme est l'agent causal de la tuberculose soit *Mycobacterium tuberculosis* [43]. Cette bactérie doit, pour infecter son hôte, descendre profondément dans les voies respiratoires inférieures afin de s'y établir et causer l'infection [63]. Seuls les noyaux de gouttelettes ont une taille assez petite pour permettre d'atteindre cette partie du système respiratoire. Les microorganismes utilisent habituellement les voies de transmission qui permettent leur survie comme le contact direct ou l'ingestion. Cependant, si les conditions environnementales sont favorables, ils peuvent utiliser l'air pour se transmettre, on dit alors que les noyaux de gouttelettes (aérosols) sont un moyen de transmission opportuniste pour ces microorganismes [43]. On ne connaît pas tous les microorganismes qui utilisent ce mode de transmission, mais il y en a probablement plusieurs. Le virus saisonnier de la grippe (influenza) est un exemple puisqu'il peut se transmettre via l'air dans des conditions favorables, mais il utilise normalement d'autres moyens de transmission comme le contact direct ou les fomites [61]. Les agents pathogènes qui se transmettent préférentiellement via les aérosols se transmettent aussi via d'autres modes comme le contact direct, mais leur transmission est préférentielle via les aérosols afin d'atteindre les voies respiratoires inférieures. Deux infections virales sont préférentiellement transmises via les aérosols soit la varicelle et la rubéole [43].

Ainsi, certains microorganismes pathogènes seraient en mesure d'utiliser l'air comme moyen de dissémination et leur présence dans l'air pourrait ne pas être due au hasard. Certains ont émis l'hypothèse que, dans une même suspension bactérienne, certains microorganismes pourraient être préférentiellement aérosolisés comparativement à d'autres [38, 64-66], faisant en sorte qu'il soit enrichi dans l'air en comparaison avec la concentration dans la source. La figure 1-9 schématise ce phénomène. En 1981, Parker *et al.* ont étudié, en laboratoire, l'aérosolisation préférentielle de différentes espèces de mycobactéries et d'autres bactéries pathogènes comme *Legionella pneumophila* en utilisant un bulleur. Ils ont proposé que l'enrichissement dans l'air puisse être dû à l'hydrophobicité de la surface cellulaire des mycobactéries et des légionelles qui interagissent préférentiellement avec l'interface air-eau [66]. Angenent *et al.* ont étudié les bioaérosols aux alentours des piscines thérapeutiques d'hôpitaux et ont conclu, comme l'étude précédemment citée, que les mycobactéries sont enrichies dans l'air. Ils ont utilisé des méthodes d'analyse de biologie moléculaire [38]. Moletta *et al.* ont proposé que les échantillons de biogaz ne soient pas des copies diluées de leur source d'émission (digesteurs anaérobiques) et que certains microorganismes semblent être enrichis dans les bioaérosols [64, 65]. Ces études suggèrent que si l'aérosolisation préférentielle existe vraiment, les facteurs la favorisant sont sans doute complexes.

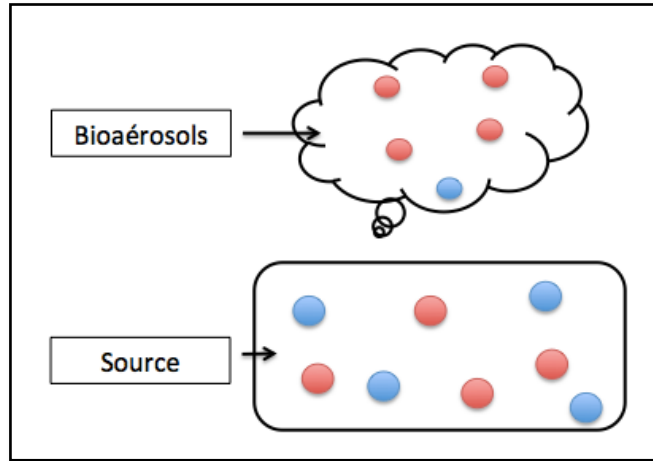


Figure 1-9 : Schéma de l'aérosolisation préférentielle.

## 1.3. *Streptococcus suis*

### 1.3.1. Généralités

*Streptococcus suis* est une coque à Gram positif pathogène du porc causant d'importantes pertes économiques pour l'industrie porcine [67]. Le premier cas d'infection chez le porc a été répertorié en 1951 en Hollande et, depuis les 20 dernières années, cette bactérie a été isolée dans les pays où l'industrie porcine est importante [68]. Chez le porc, *S. suis* cause différentes maladies comme des méningites, des septicémies, des pneumonies, des endocardites et de l'arthrite [69]. *S. suis* est divisé en 35 sérotypes basés sur la réaction immunologique de leur capsule polysaccharidique (Figure 1-10, A), les sérotypes 1 à 34 et le sérotype 1/2 [70-73]. Il existe également bon nombre de souches non typables soit parce qu'elles ne possèdent pas de capsule ou parce que leur capsule n'appartient pas à un des 35 sérotypes connus [74]. Parmi tous ces sérotypes, le sérotype 2 est le plus souvent isolé chez les porcs malades [68-70, 75, 76]. Malgré cela, à travers le monde, d'autres sérotypes ont été isolés en cas de maladies chez le porc soit : 1/2, 3, 4, 5, 8,9 et 22 [77-82]. Le sérotype 5 produit une très petite capsule comparativement au sérotype 2 (Figure 1-10, B) [82].

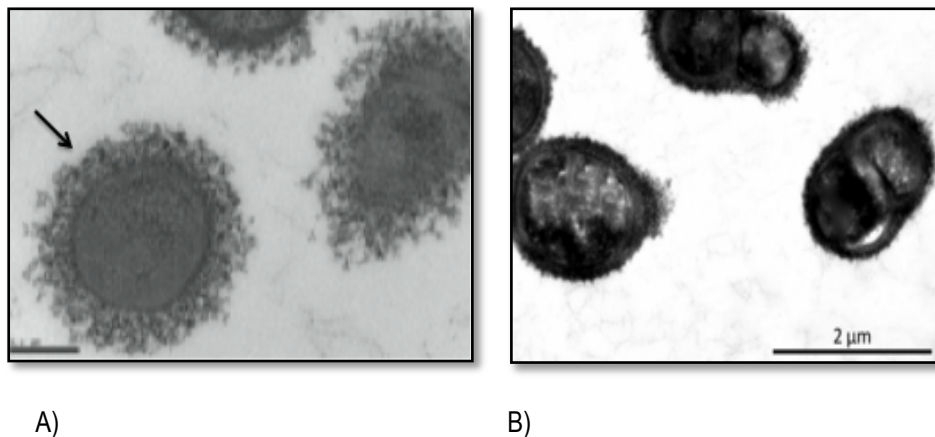


Figure 1-10 : Photo en microscopie électronique à transmission de deux souches de *S. suis*. A) *S. suis* sérotype 2 souche S735, la flèche noire montre la capsule de polysaccharide et en B) *S. suis* sérotype 5 souche 11538. A) Figure adaptée de [74] et B) Figure tirée de [82].

Il existe des variations génétiques entre les souches de *S. suis* sérotype 2. Le typage des séquences de plusieurs locus ou en anglais *Multilocus Sequence Typing* (MLST) sépare le sérotype 2 en 16 groupes appelés en anglais *sequence types* (ST). Les souches du ST1 sont invasives et hautement virulentes chez la

souris et sont surtout retrouvées en Asie [83]. En Amérique du Nord, il y a deux ST importants, ST25 et ST28 qui sont respectivement moyennement et non virulents chez un modèle murin [84].

### 1.3.2. Transmission

Le porc est l'hôte naturel de *S. suis*. Cette bactérie colonise les amygdales, les cavités nasales, le tube digestif et le tractus génital du porc [68, 85]. Les porcs colonisés ne développent pas nécessairement de maladie; ils sont donc des porteurs sains jouant un rôle important dans la transmission de l'infection [86]. La transmission de l'infection débute lorsqu'un porteur sain d'une souche virulente est introduit dans un troupeau non infecté [68]. Plusieurs routes de transmission entre les porcs d'un même troupeau ont été proposées. La voie de transmission la plus acceptée est le contact direct par le nez entre deux porcs [68, 86]. Durant la mise bas, il y a une transmission de la truie vers le nez des porcelets via la muqueuse vaginale de la truie [87, 88].

Berthelot-Hérault *et al.* ont démontré la transmission via les bioaérosols d'une souche virulente du sérotype 2 provient de porcs infectés vers des porcs sains qui étaient physiquement séparés [86, 89]. De plus, les lésions observées chez les porcs ayant été exposés aux bioaérosols sont comparables aux lésions chez des cas spontanés d'infection [90-92]. Dekker *et al.* ont démontré que le sérotype 9 pouvait également être transmis via les bioaérosols [93]. La présence de *S. suis* dans l'air des porcheries a été démontrée par Bonifait *et al.* [94]. Dans cette étude, l'air de porcheries avec et sans cas d'infection à *S. suis* a été analysé et *S. suis* a été retrouvé dans l'air de toutes les porcheries, peu importe le statut infectieux [94]. *S. suis* sérotype 2 ou 1/2 a été rapporté dans l'air de toutes les porcheries avec un historique d'infection à *S. suis* et dans près de la moitié des porcheries sans cas d'infection [94]. Bonifait *et al.* ont aussi démontré que *S. suis* est plus résistant au passage dans l'air et à l'échantillonnage que l'ensemble des bactéries en utilisant la méthode d'amplification PMA-qPCR [94]. Ces études démontrent le potentiel de transmission par l'air de *S. suis* et en fait donc un modèle d'étude intéressant en aérobiologie.

### 1.3.3. Zoonose

Le premier cas d'infection à *S. suis* chez l'humain a été rapporté au Danemark en 1968 [68]. Depuis, *S. suis* est reconnu comme un agent pathogène de zoonose particulièrement en Orient. *S. suis* cause principalement des méningites chez l'humain [70]. Comme chez le porc, le sérotype le plus souvent isolé en cas d'infection chez l'humain est le sérotype 2 [76]. Les infections chez l'humain sont associées avec le travail

en industrie porcine ou la consommation de viandes de porc contaminées [95-97]. En Chine, en 1998 et 2005, il y a eu deux éclosions d'infections chez l'humain à *S. suis* sérotype 2, plus de 200 personnes ont été infectées et 50 en sont décédées [76, 98]. *S. suis* est la cause principale de méningites bactériennes au Vietnam [99] et la deuxième en Thaïlande [100]. La situation dans les pays occidentaux est différente. En Amérique du Nord et en Europe, les infections à *S. suis* chez l'humain sont sporadiques et associées avec une exposition professionnelle au porc ou à la viande contaminée. Depuis 1991, sept décès chez l'humain dus à une infection à *S. suis* ont été rapportés au Canada et aux États-Unis [101-107]. *S. suis* peut entrer dans l'organisme via une plaie dans la peau ou par colonisation des voies naso-pharyngées et du tractus gastro-intestinal [97]. La faible incidence d'infection humaine à *S. suis* en Amérique du Nord, comparativement à l'Asie, peut-être sous-estimée due à un manque lors de l'identification de l'espèce de streptocoque en cause [97].



## 1.4. Problématique

Tel que mentionné plus haut, les travailleurs de l'industrie porcine sont potentiellement exposés aux bioaérosols de *S. suis* même s'il n'y a aucun cas de maladie diagnostiqué dans le bâtiment puisque cette bactérie semble présente de manière ubiquitaire dans l'air des établissements d'élevage. De plus, une étude suggère que *S. suis* résiste mieux au passage dans l'air que l'ensemble des autres bactéries [94]. Aussi, des auteurs ont soulevé la possibilité que certains microorganismes soient préférentiellement aérosolisés à partir d'un consortium microbien [38, 64-66]. Puisque le sérotype 2 est le plus isolé en cas de maladie, autant chez l'homme que chez l'animal, le projet actuel propose que ce sérotype pourrait être aérosolisé préférentiellement par rapport à d'autres sérotypes en fonction de différents paramètres et ainsi, se retrouver plus fréquemment dans l'air. Ceci pourrait représenter une de ses stratégies pour atteindre son hôte plus facilement. Également, les *sequence type* possèdent des niveaux de virulence différente et ceci pourrait influencer leur aérosolisation. Afin d'étudier le processus d'aérosolisation préférentielle, il faut donc être en mesure de créer des bioaérosols naturels. Cependant, les nébuliseurs commerciaux ne produisent pas d'aérosols de manière naturelle et il n'existe aucun nébuliseur mimant des processus naturels d'aérosolisation.

C'est en regard à cette problématique que le projet suivant a été développé. Ce projet vise 1) à mettre au point un protocole d'aérosolisation en chambre environnementale en utilisant un bulleur pour mimer le processus d'aérosolisation naturelle et 2) à l'aide du système d'aérosols naturels développé, d'étudier le phénomène d'aérosolisation préférentielle chez *S. suis*.





## 1.5. Objectifs de recherche

Une chambre environnementale statique et un bulleur à filtre poreux ont été utilisés pour étudier l'aérosolisation préférentielle de différentes souches de *S. suis*. Ces appareils ont été construits par les Drs Nathalie Turgeon et Phillipa Perrott de l'équipe du Pre Caroline Duchaine. La chambre permet l'utilisation de nébuliseurs commerciaux ou du bulleur à filtre poreux. L'air de la chambre peut être échantillonné par différents types d'échantillonneurs.

Des souches de *S.suis* ont été aérosolisées deux par deux en même temps à partir de la même solution de nébulisation. L'analyse des échantillons a été réalisée en utilisant des techniques de biologie moléculaire. La technique du qPCR a été utilisée afin de déterminer la quantité de génomes présents dans les échantillons d'air et de solution de nébulisation. Ensuite, les ratios de chaque souche ont été calculés dans la solution de nébulisation et dans l'air. Il y a aérosolisation préférentielle si le ratio d'une souche est supérieur dans l'air par rapport à son ratio dans la solution de nébulisation.

Les objectifs de recherche sont donc :

1. Développer et optimiser un protocole d'aérosolisation naturelle en chambre
2. Étudier l'aérosolisation préférentielle de souches de *S. suis* en laboratoire à l'aide d'une méthode mimant les bioaérosols naturels



**Chapitre 2 : Étude de l'aérosolisation préférentielle de  
*Streptococcus suis***



## 2.1 Article: Impact of serotype and sequence type on the preferential aerosolization of *Streptococcus suis*

### Research Article

Article soumis dans la revue *BMC Research Notes* sous le numéro RESN-D-15-00656

Léa Gauthier-Levesque<sup>1, 2</sup>, Laetitia Bonifait<sup>1, 2</sup>, Nathalie Turgeon<sup>1</sup>, Marc Veillette<sup>1</sup>, Phillipa Perrott<sup>1</sup>, Daniel Grenier<sup>2, 3</sup> and Caroline Duchaine<sup>1, 2, 4\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (CRIUCPQ), Quebec City, Qc, Canada;

<sup>2</sup>Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole (CRIPA), Fonds de Recherche Nature et Technologies du Québec (FRQNT);

<sup>3</sup>Groupe de Recherche en Écologie Buccale (GREB), Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Quebec City, Qc, Canada; and

<sup>4</sup>Département de Biochimie, Microbiologie et Bio-informatique, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Quebec City, Qc, Canada

Keywords: Preferential aerosolization, *Streptococcus suis*, serotype 2, sequence type, airborne

Léa Gauthier-Levesque: [lea.gauthier-levesque@criucpq.ulaval.ca](mailto:lea.gauthier-levesque@criucpq.ulaval.ca); Laetitia Bonifait: [laetitia.bonifait@criucpq.ulaval.ca](mailto:laetitia.bonifait@criucpq.ulaval.ca); Nathalie Turgeon: [Nathalie.Turgeon@criucpq.ulaval.ca](mailto:Nathalie.Turgeon@criucpq.ulaval.ca); Marc Veillette: [Marc.Veillette@criucpq.ulaval.ca](mailto:Marc.Veillette@criucpq.ulaval.ca); Phillipa Perrott: [philly.perrott@gmail.com](mailto:philly.perrott@gmail.com); Daniel Grenier: [Daniel.Grenier@greb.ulaval.ca](mailto:Daniel.Grenier@greb.ulaval.ca)

\* Corresponding author. Mailing address: Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (CRIUCPQ), 2725 chemin Sainte-Foy, Quebec City, Qc, Canada, G1V 4G5. Phone: (418) 656-8711 #5837, Fax: (418) 656-4713, E-mail: [caroline.duchaine@bcm.ulaval.ca](mailto:caroline.duchaine@bcm.ulaval.ca)

### 2.1.1 Résumé

**Contexte:** *Streptococcus suis* est un microorganisme pathogène porcine causant des pneumonies, septicémies et méningites. Il est aussi un agent de zoonose important responsable de plusieurs épidémies en Chine. Les souches de *S. suis* sont divisées en 35 sérotypes basés sur la composition de leur capsule polysaccharidique. Les souches de *S. suis* sérotype 2 causent la majorité des infections sévères et celles-ci sont sous-divisées en *sequence types* (STs) basée sur le *multilocus sequence typing*. Les souches du ST1 sont hautement virulentes. En Amérique du Nord, les souches les plus communément isolées appartiennent au ST25 et ST28, lesquelles sont respectivement modérément et faiblement virulentes dans un modèle murin. La présence de *S. suis* sous forme de bioaérosols dans l'air des bâtiments porcins a été précédemment démontré. Le but de cette étude est de mieux comprendre le comportement sous forme de bioaérosols de *S. suis* en étudiant l'aérosolisation préférentielle de diverses souches de *S. suis*, appartenant à différents sérotypes ou STs, en utilisant une chambre environnementale et un nébuliseur naturel développés pour cette étude. La technologie du qPCR a été utilisée pour analyser le ratio des souches de *S. suis*. **Résultats:** Les résultats suggèrent que les souches hautement virulentes du sérotype 2 ST1 sont préférentiellement aérosolisées et que le phénomène d'aérosolisation préférentielle de *S. suis* est un processus souche-dépendant. **Conclusion:** Ces observations ont besoin d'être confirmées en utilisant un plus grand nombre de souches et de sérotypes. Cette étude est une preuve de concept et augmente nos connaissances sur le risque potentiel de transmission via les bioaérosols de *S. suis*.

### 2.1.2 Abstract

**Background:** *Streptococcus suis* is a swine pathogen that causes pneumonia, septicaemia and meningitis. It is also an important zoonotic agent responsible of several outbreaks in China. *S. suis* strains are classified into 35 serotypes based on the composition of their polysaccharide capsule. *S. suis* serotype 2 causes the majority of severe infections and can be further subdivided into sequence types (STs) based on multilocus sequence typing. The ST1 is associated with highly virulent strains. In North America, the strains most commonly isolated belong to ST25 and ST28, which are respectively moderately and weakly virulent in a mouse model. The presence of *S. suis* bioaerosols in the air of swine confinement buildings has been previously demonstrated. The aim of this study was to better understand the aerosolization behaviour of *S. suis* by investigating the preferential aerosolization of various strains of *S. suis*, belonging to different serotypes or STs, using in-house developed environmental chamber and bubble-burst nebulizer. qPCR technology was used to analyse the ratio of *S. suis* strains. **Results:** The results suggest that the highly virulent serotype 2 ST1 strains are preferentially aerosolized and that the *S. suis* preferential aerosolization is a strain-dependent process. **Conclusion:** These observations will need to be confirmed using a larger number of strains. This study is a proof of concept and increases our knowledge on the potential aerosol transmission of *S. suis*.

### 2.1.3 Background

*Streptococcus suis* is a swine pathogen that causes important economic losses in the swine industry worldwide. Swine are natural hosts of *S. suis*, which can be isolated from their tonsils and nasal cavities, as well as genital and digestive tracts [1, 2]. *S. suis* causes a wide range of illness in swine such as meningitis, septicaemia, pneumonia, endocarditis and arthritis. It is also known as an important zoonotic agent for individuals in close contact with pigs or pork by-products [3]. Two serotype 2 human infection outbreaks occurred in China with more than 200 cases declared and 50 deaths reported [4]. However, in North America and Europe, human *S. suis* infections are still considered sporadic. Seven human deaths related to *S. suis* infections have been described in Canada and the United States since 1991 [5-11].

*S. suis* strains are classified into 35 different serotypes on the basis of the antigenicity of their capsular polysaccharide [12-15]. Amongst these serotypes, serotype 2 is the most commonly isolated from diseased animals [1, 3, 12, 16, 17]. Multilocus Sequence Typing (MLST) allowed to separate the serotype 2 strains into 16 sequence types (STs) based on genetic variations. The ST1 is associated with invasive and highly virulent strains [18-20]. In North America, strains belonging to ST25 and ST28 are most often recovered [21]. They are respectively strains with moderate and weak virulence in a mouse model [21].

Healthy carrier pigs could act as an infectious reservoir for pathogenic strains of *S. suis*. Many modes of transmission have been proposed for the transfer of *S. suis* between swine within the herd. The most accepted relates to a transmission of *S. suis* by a "nose-to-nose" contact between uninfected and infected pigs, especially when animals show clinical signs of infection [1, 22]. In 2001, Berthelot-Hérault *et al.* first emphasized the transmission of *S. suis* virulent serotype 2 strains through aerosols from infected swine to pathogen-free swine [22, 23]. Then, Dekker *et al.*, further supported these observations and showed that a clinical serotype 9 strain could be transmitted through aerosols [24]. Very recently, Bonifait *et al.* demonstrated the presence of *S. suis*, more particularly serotype 2, in bioaerosols of swine confinement buildings (SCBs), with and without recent documented infection cases [25]. All the above studies support the potential of air transmission of this swine and zoonotic pathogen.

The notion of preferential aerosolization was introduced by Parker *et al.*, when they showed that *Mycobacterium intracellulare* was more concentrated than *Mycobacterium scrofulaceum* in air samples produced by an equally mixed solution using natural bubble-burst nebulizer [26]. Moletta *et al.* have also highlighted this concept of preferential aerosolization of some microorganisms in anaerobic microbial communities [27] and consequently suggested that aerosolization appears to be a non-randomly phenomenon and that some bacteria are more prone to be transferred to the air.



The aim of this study was to investigate the aerosolization behaviour of *S. suis* in a controlled environment. In this regard, the possibility of a preferential aerosolization of different isolates of *S. suis* have been studied in terms of serotype (serotype 2, serotype 5) and of ST (ST1, ST25, ST28) in order to determine whether the virulence of the strains may be related to their aerosolization.

## 2.1.4 Methods

### **Serotype and sequence type (ST)**

The serotype 2 *S. suis* S735 was aerosolized with either strains of serotype 5 (Amy12C, 4B) included in this study, in order to compare the preferential aerosolization of *S. suis* serotype 2. The choice of serotype 5 strains was based on the fact they present differences in morphological characteristics. Indeed, *S. suis* serotype 5 appears to possess a capsule thinner than that of *S. suis* serotype 2 [28]. Seven strains belonging to either ST1, ST25 or ST28 were tested (Table 1) [21]. Each strain was nebulized separately with *S. suis* Amy12C (serotype 5) used as an internal reference strain. Strains of *S. suis* used in this study are listed in Table 1. Bacteria were grown in Todd Hewitt Broth (THB) (Difco Laboratories, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, U.S.A.) at 37°C.

### **Cell surface hydrophobicity test**

Cell surface hydrophobicity was determined by measuring the adsorption of *S. suis* cells to n-hexadecane as described previously [29]. Assays were performed in triplicate.

### **Experimental chamber**

The chamber used in this study was designed, built and characterised by Perrott *et al.* (Manuscript in preparation). This chamber consists in a stainless steel drum of 45.2 L, was 470 mm in height by 350 mm in diameter and was airtight by a lid. Ports were created to allow nebulization or air sampling.

### **Preparation of nebulizing solutions**

For each comparative analysis, two strains of *S. suis* were grown separately in 300 mL of THB overnight, and harvested by centrifugation (10 min at 7000 x *g*). Cells were washed twice with 1X Phosphate Buffered Saline (PBS, Lonza, Bâle, Switzerland) and suspended in PBS at an optical density 660 nm = 1.5 (about 4 x 10<sup>8</sup> bacteria/mL) using a GeneQuant pro spectrometer (model 80-2114-98, GE Healthcare Biosciences, Buckinghamshire, England). Nebulizing solutions of 150 mL were prepared and contained both strains of *S. suis*.

### **Preferential aerosolization assay**

For the preferential aerosolization assays, two different *S. suis* strains were mixed in the nebulizing solution. Ratios in the nebulizing solution and in the air were compared to evaluate if one of the two strains was

enriched in the bioaerosols compared with the original bacterial suspension. Aerosolization assays of tested strains were performed in duplicate.

### **Nebulization**

The nebulizer used in this study has been described by Perrot *et al.* (Manuscript in preparation). Briefly, this nebulizer was designed to mimic the natural bubbling process and minimize the stress associated with the aerosolization of bacteria. This nebulizer was located inside the experimental chamber. It was made with a 250 mL of polypropylene container to allow sterilization by an autoclave. At the bottom of the container, a hole was made to fix a stainless steel tube that allows air to pass. At the end of the tube, the air passes through a cotton fabric that makes bubbles and create bioaerosols.

### **Aerosolization**

Aerosolization was performed with a nebulization set at 4 L/min and an addition of dilution air at 6 L/min. Prior to bacterial aerosolization, PBS was aerosolized for conditioning the chamber; this was followed by a purge of the chamber prior to the baseline air sampling. Bacteria were first nebulized during 20 min to fill the chamber with aerosols and then, the air of the chamber was sampled. Between each duplicate, the nebulizer and the nebulizing solution were changed.

### **Air sampling**

Aerosols and baseline were sampled using SKC 37 mm cassettes (SKC inc., Eighty Four, PA, USA) loaded with a 0.8  $\mu\text{m}$  polycarbonate filter (SKC inc., Eighty Four, PA, U.S.A.). The cassettes were connected to a Gilian AirCon2 High Volume Air Sampler (Gilian Instrument Corp., W. Caldwell, NJ, U.S.A.) set at 10 L/min, for 30 min. Aerosol samples were taken during the nebulization. Filter samples were eluted in 5 mL of PBS using Genie-2 vortex (Scientific industries, Bohemia, NY, U.S.A.) for 15 min. A blank was prepared for each experiment (cassettes not plugged to a pump).

### **DNA extraction**

Aliquots of air samples and nebulizing solution (1.5 mL) were centrifuged for 10 min at 14 000 x *g* and the pellets were stored at -20 °C until use. DNA extraction was performed with MOBio PowerLyser® UltraClean® Microbial DNA kit (Carlsbad, CA, U.S.A.) following the manufacturer's instructions using an homogenisation with Mixer Mill MM301 (Retsch, Düsseldorf, Germany) at 20 movements per min during 10 min. DNA was eluted with 50  $\mu\text{L}$  of elution buffer supplied with the kit. Samples were kept at -20 °C.

## Quantitative PCR

Quantitative PCR (qPCR) analyses were performed with the Bio-Rad CFX 96 Touch™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Primers and probes were purchased from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, U.S.A.) and are listed in Table 2. Results were analysed using the CFX Manager™ Software version 3.1 (Bio-Rad Laboratories). Quantification of *S. suis* serotype 2 was performed according to Nga *et al.* [30]. Primers target the *cps2J* gene that is part of the serotype 2 capsular polysaccharide operon [31]. As standard curve, a 10-fold dilution of *S. suis* S735 genomic DNA was used. Quantification of *S. suis* serotype 5 was made as previously described by Wang *et al.* [32]. Primers target the *cps5I* gene that is part of the serotype 5 capsular polysaccharide operon coding for a glycosyltransferase [32]. As standard curve, a 10-fold dilution of *S. suis* 4B genomic DNA was used.

## 2.1.5 Results

### Cell surface hydrophobicity

Table 3 reports the relative cell surface hydrophobicity for strains of *S. suis* used in this study. All *S. suis* serotype 2 strains showed a low cell surface hydrophobicity ( $\leq 11\%$ ) compared to the high hydrophobicity observed for the serotype 5 strains ( $\geq 87\%$ ).

### Preferential aerosolization assay

The ratios of the tested strains of *S. suis* in the nebulizing solution and the bioaerosols are reported in Figure 1. A ratio of 100% means that the tested strain represents the entire sample. The serotype 2 strain *S. suis* S735 was aerosolised along with either *S. suis* Amy12C or *S. suis* 4B, two serotype 5 isolates. Figure 1A shows that *S. suis* S735 is preferentially recovered in bioaerosols when aerosolized concomitently with *S. suis* Amy12C. However, although the ratio in the air is higher than that in the nebulizing solution, these differences are not statistically significant ( $p < 0.05$ ). Regarding *S. suis* 4B, an opposite result was obtained. Indeed, the serotype 5 strain was the one almost exclusively detected in the bioaerosols (Figure 1B).

Strains belonging to different STs were aerosolized separately with *S. suis* Amy12C (serotype 5) used as an internal reference strain. The ST1 virulent strains selected were isolated from meningitis/septicemia cases [21]. ST25 and ST28 strains were isolated from septicemia and pneumonia cases, respectively [21]. Figure 2 compares the aerosolization of the *S. suis* ST1 (3 strains), ST25 (2 strains) and ST28 (2 strains) when pooling data obtained for the different strains. For *S. suis* ST1, the ratio in the nebulizing solution was 53 %, while the ratio in the air was 80 % which is statistically different ( $p = 0.0059$ ). The ratio in the nebulizing solution for *S. suis* ST25 was 81 % and its ratio in the air was 57 %. Lastly, ratios in the nebulizing solution and in the air for the *S. suis* ST28 were respectively 78 and 75 %. There are no statistical differences for the *S. suis* ST25 and ST28.

## 2.1.6 Discussion

The presence of *S. suis* in the air of SCBs and the potential risks of transmission of this pathogen through bioaerosols have been previously studied [22, 24, 25]. However a better understanding of the aerosolization process of *S. suis* is essential and was the topic of this study. More specifically, we proposed the hypothesis of a preferential aerosolization of *S. suis* in function of serotype and ST.

Given that *S. suis* serotype 2 is the serotype most commonly isolated from diseased animals, it can be suggested that this serotype is preferentially aerosolized compared to the others. When comparing the preferential aerosolization behaviours of *S. suis* S735 (serotype 2) with *S. suis* Amy12C or *S. suis* 4B (serotype 5), it appears that aerosolization is more likely to be strain-dependent than serotype-dependent, although additional strains belonging to different serotypes should be tested. Both strains of *S. suis* serotype 5 possessed characteristics (thin capsule and high hydrophobicity) that differentiate them from serotype 2 strains [28]. Consequently, these two properties appear not to have significant impact on the preferential aerosolization of *S. suis*.

Preferential aerosolization occurs when the ratio of bacteria is higher in the air compared to the original source. In this regard, *S. suis* ST1 strains tested in this study, but not *S. suis* ST25 and ST28 strains, appear to be statistically preferentially aerosolized. Differences at the gene and protein levels, may at least in part, explain the aerosolization behaviours of the various ST [33]. Tringe et al. showed that bacterial genes up-regulated in the air were those involved in motility, secretion, redox metabolism and inorganic ion metabolism [33]. Fimbrial adhesin genes are up-regulated in air [33]. It has been shown that *S. suis* possesses pili that have a putative role as adhesins [16]. Moreover, Fittipaldi et al. demonstrates that almost all strains express genes encoding the Sfp1 and/or Sgp1 pili [21]. The ST1 strains, which have been found to be preferentially aerosolized in this study, express the Sfp1 pilus but not the Sgp1 (Sfp1+/Sgp1-) while of the ST25 strains express the Sgp1 pilus and not the Sfp1 (Sfp1-/Sgp1+) [21]. ST28 express predominantly both Sfp1 and Sgp1 pili (Sfp1+/Sgp1+) [21]. The phenotype Sfp1+/Sgp1- could lead to preferential aerosolization when Sfp1 is the only pilus present at the cell surface. However, this hypothesis needs to be verified.

Given that the ST found to be preferentially aerosolized was the most virulent (ST1 strains), it can be suggested that virulence factors could be involved in the preferential aerosolization process. Suilysin and extracellular factor are two virulence factors expressed by ST1 strains and not by ST25 and ST28 strains [21, 34]. Ye et al. demonstrated that the ST1 strains evolved from the ST25 strains and that they acquired 132 genomic islands, including 5 pathogenicity islands and 4 ST1 specific genes [19]. The genomic islands acquired by ST1 include genes involved in antibiotic resistance, cell structure, DNA recombination, DNA/RNA

processing, immunogenic protein, metabolism, phage related, regulation, signal transduction, transport, virulence related and unknown function [19]. One or several genes acquired by ST1 isolates could favor bacterial aerosolization.

Very recently, Atanassov et al. identified nine proteins that differentiate ST1, ST25 and ST28 from other STs; including two that were overexpressed by ST1 [35]. These two proteins has not been purified for identification. Again, these proteins overexpressed by ST1 could promote the aerosolization of these strains. The proteins and genes specific or overexpressed by the ST1 strains could modify the water/air interface cell affinity or change the cell density. These factors could contribute to the preferential aerosolization process. The construction of mutants deficient in specific factors may allow to evaluate the above hypotheses.

A better understanding of the aerosolization process of *S. suis* is essential to reduce the economic losses for the swine industry and to increase the swine's health. Furthermore, aerosolization studies are of particular interest because *S. suis* is an important zoonotic agent especially in the Asian countries where the proximity between swine and farmers is more important.

### 2.1.7 Conclusion

This study is a proof of concept and provides new evidence on the potential risks associated with the transmission of *S. suis* serotype 2 through bioaerosols. It also suggests a preferential aerosolization of *S. suis* serotype 2 ST1 strains and that preferential aerosolization of *S. suis* is likely a strain-dependent process, although more strains should be studied. This study emphasizes the importance to develop an exposure prevention strategy to protect the swine and the swine producers against *S. suis* infections.



### 2.1.8 Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

### 2.1.9 Authors' contribution

LGL realized the preferential aerosolization assays and drafted the manuscript. LB and MV participated in the design of the study and qPCR protocols. NT and PP created the experimental chamber and the bubble-burst nebulizer. DG critically revised the manuscript. CD conceived, coordinated and participated in the design of the study and helped to the draft of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### 2.1.10 Acknowledgment

This project was funded through a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant. C.D. is a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRQ-S) Senior Scholar and a member of the Réseau en Santé Respiratoire du FRQ-S. L. G.-L. received conference travel grants from the Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA) and from the Respiratory Health Network of the Fonds de recherche du Québec-Santé.

The authors are thankful to Marcelo Gottschalk (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal) who provided the *S. suis* strains used in this study. We also thank Serge Simard for his expertise in statistical analysis.

## 2.1.11 References

1. Higgins R, Gottschalk M: **Streptococcal Diseases**. In: *Diseases of Swine*. Edited by Barbara E. Straw JJZ, Sylvie D'Allaire and David J. Taylor, 9th edn. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2006: 769-783.
2. Lowe BA, Marsh TL, Isaacs-Cosgrove N, Kirkwood RN, Kiupel M, Mulks MH: **Microbial communities in the tonsils of healthy pigs**. *Veterinary microbiology* 2011, **147**(3-4):346-357.
3. Lun ZR, Wang QP, Chen XG, Li AX, Zhu XQ: **Streptococcus suis: an emerging zoonotic pathogen**. *The Lancet Infectious diseases* 2007, **7**(3):201-209.
4. Yu H, Jing H, Chen Z, Zheng H, Zhu X, Wang H, Wang S, Liu L, Zu R, Luo L *et al*: **Human Streptococcus suis outbreak, Sichuan, China**. *Emerging infectious diseases* 2006, **12**(6):914-920.
5. Trottier S, Higgins R, Brochu G, Gottschalk M: **A case of human endocarditis due to Streptococcus suis in North America**. *Reviews of infectious diseases* 1991, **13**(6):1251-1252.
6. Michaud S, Duperval R, Higgins R: **Streptococcus suis meningitis: First case reported in Quebec**. *The Canadian journal of infectious diseases = Journal canadien des maladies infectieuses* 1996, **7**(5):329-331.
7. Willenburg KS, Sentochnik DE, Zadoks RN: **Human Streptococcus suis meningitis in the United States**. *The New England journal of medicine* 2006, **354**(12):1325.
8. Lee GT, Chiu CY, Haller BL, Denn PM, Hall CS, Gerberding JL: **Streptococcus suis meningitis, United States**. *Emerging infectious diseases* 2008, **14**(1):183-185.
9. Fittipaldi N, Collis T, Prothero B, Gottschalk M: **Streptococcus suis meningitis, Hawaii**. *Emerging infectious diseases* 2009, **15**(12):2067-2069.
10. Haleis A, Alfa M, Gottschalk M, Bernard K, Ronald A, Manickam K: **Meningitis caused by Streptococcus suis serotype 14, North America**. *Emerging infectious diseases* 2009, **15**(2):350-352.
11. Fowler HN, Brown P, Rovira A, Shade B, Klammer K, Smith K, Scheffel J: **Streptococcus suis meningitis in swine worker, Minnesota, USA**. *Emerging infectious diseases* 2013, **19**(2):330-331.
12. Feng Y, Zhang H, Wu Z, Wang S, Cao M, Hu D, Wang C: **Streptococcus suis infection: an emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases?** *Virulence* 2014, **5**(4):477-497.
13. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Beaudoin M, Henrichsen J: **Isolation and characterization of Streptococcus suis capsular types 9-22**. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 1991, **3**(1):60-65.

14. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Beaudoin M, Henrichsen J: **Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis***. *Journal of clinical microbiology* 1991, **29**(11):2590-2594.
15. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J: **Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis***. *Journal of clinical microbiology* 1989, **27**(12):2633-2636.
16. Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M: **Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis***. *Future microbiology* 2012, **7**(2):259-279.
17. Gottschalk M, Segura M, Xu J: ***Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America**. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 2007, **8**(1):29-45.
18. King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, Whatmore AM: **Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange**. *Journal of clinical microbiology* 2002, **40**(10):3671-3680.
19. Ye C, Zheng H, Zhang J, Jing H, Wang L, Xiong Y, Wang W, Zhou Z, Sun Q, Luo X *et al*: **Clinical, experimental, and genomic differences between intermediately pathogenic, highly pathogenic, and epidemic *Streptococcus suis***. *The Journal of infectious diseases* 2009, **199**(1):97-107.
20. Ye C, Zhu X, Jing H, Du H, Segura M, Zheng H, Kan B, Wang L, Bai X, Zhou Y *et al*: ***Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China**. *Emerging infectious diseases* 2006, **12**(8):1203-1208.
21. Fittipaldi N, Xu J, Lacouture S, Tharavichitkul P, Osaki M, Sekizaki T, Takamatsu D, Gottschalk M: **Lineage and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from North America**. *Emerging infectious diseases* 2011, **17**(12):2239-2244.
22. Berthelot-Herault F, Gottschalk M, Labbe A, Cariolet R, Kobisch M: **Experimental airborne transmission of *Streptococcus suis* capsular type 2 in pigs**. *Veterinary microbiology* 2001, **82**(1):69-80.
23. Berthelot-Herault F, Cariolet R, Labbe A, Gottschalk M, Cardinal JY, Kobisch M: **Experimental infection of specific pathogen free piglets with French strains of *Streptococcus suis* capsular type 2**. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 2001, **65**(3):196-200.
24. Dekker N, Bouma A, Daemen I, Klinkenberg D, van Leengoed L, Wagenaar JA, Stegeman A: **Effect of spatial separation of pigs on spread of *Streptococcus suis* serotype 9**. *PloS one* 2013, **8**(4):e61339.

25. Bonifait L, Veillette M, Letourneau V, Grenier D, Duchaine C: **Detection of *Streptococcus suis* in bioaerosols of swine confinement buildings.** *Applied and environmental microbiology* 2014, **80**(11):3296-3304.
26. Parker BC, Ford MA, Gruft H, Falkinham III JO: **Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria, IV. Preferential aerosolization of *Mycobacterium intracellulare* from natural waters.** *Am Rev Respir Dis* 1983, **128**:652-656.
27. Moletta M, Delgenes JP, Godon JJ: **Differences in the aerosolization behavior of microorganisms as revealed through their transport by biogas.** *The Science of the total environment* 2007, **379**(1):75-88.
28. Gomez E, Kennedy CC, Gottschalk M, Cunningham SA, Patel R, Virk A: ***Streptococcus suis*-related prosthetic joint infection and streptococcal toxic shock-like syndrome in a pig farmer in the United States.** *Journal of clinical microbiology* 2014, **52**(6):2254-2258.
29. Bonifait L, Gottschalk M, Grenier D: **Cell surface characteristics of nontypeable isolates of *Streptococcus suis*.** *FEMS microbiology letters* 2010, **311**(2):160-166.
30. Nga TV, Nghia HD, Tu le TP, Diep TS, Mai NT, Chau TT, Sinh DX, Phu NH, Nga TT, Chau NV *et al*: **Real-time PCR for detection of *Streptococcus suis* serotype 2 in cerebrospinal fluid of human patients with meningitis.** *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2011, **70**(4):461-467.
31. Smith HE, de Vries R, van't Slot R, Smits MA: **The *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: genetic determinant for the synthesis of sialic acid.** *Microbial pathogenesis* 2000, **29**(2):127-134.
32. Wang K, Sun X, Lu C: **Development of rapid serotype-specific PCR assays for eight serotypes of *Streptococcus suis*.** *Journal of clinical microbiology* 2012, **50**(10):3329-3334.
33. Tringe SG, Zhang T, Liu X, Yu Y, Lee WH, Yap J, Yao F, Suan ST, Ing SK, Haynes M *et al*: **The airborne metagenome in an indoor urban environment.** *PloS one* 2008, **3**(4):e1862.
34. Takeuchi D, Akeda Y, Nakayama T, Kerdsin A, Sano Y, Kanda T, Hamada S, Dejsirilert S, Oishi K: **The contribution of suilysin to the pathogenesis of *Streptococcus suis* meningitis.** *The Journal of infectious diseases* 2014, **209**(10):1509-1519.
35. Atanassov C, Bonifait L, Perivier M, Gottschalk M, Grenier D: **Candidate proteomic biomarkers for three genogroups of the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2.** *BMC microbiology* 2015, **15**(1):84.

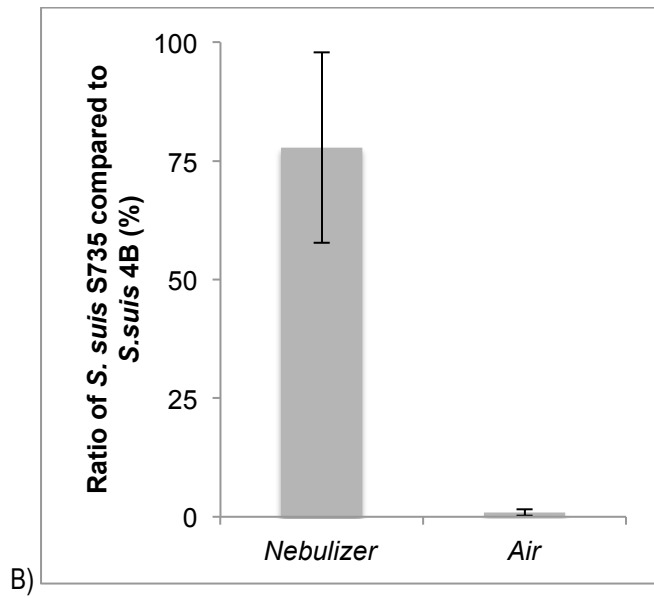
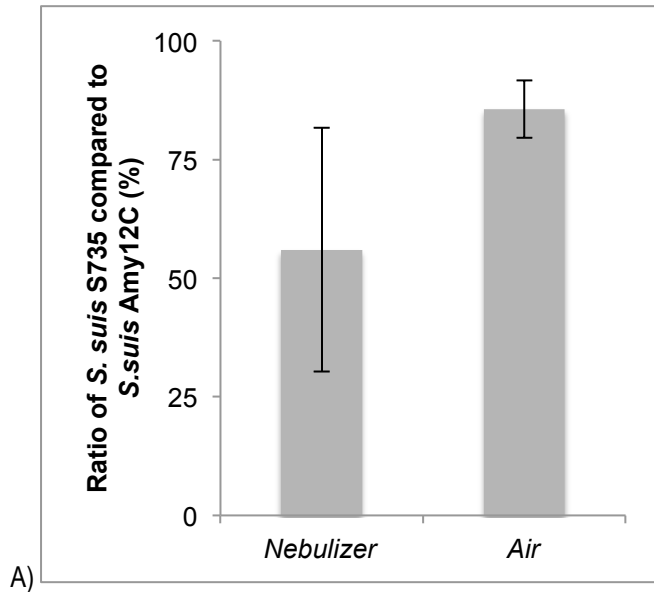


Figure 2-1: Comparative analysis of strains belonging to different serotypes. A) Ratio of *S. suis* S735 (serotype 2) in the nebulizing solution and in the air compared to *S. suis* Amy12C (serotype 5) and B) Ratio of *S. suis* S735 (serotype 2) in the nebulizing solution and in the air compared to *S. suis* 4B (serotype 5)

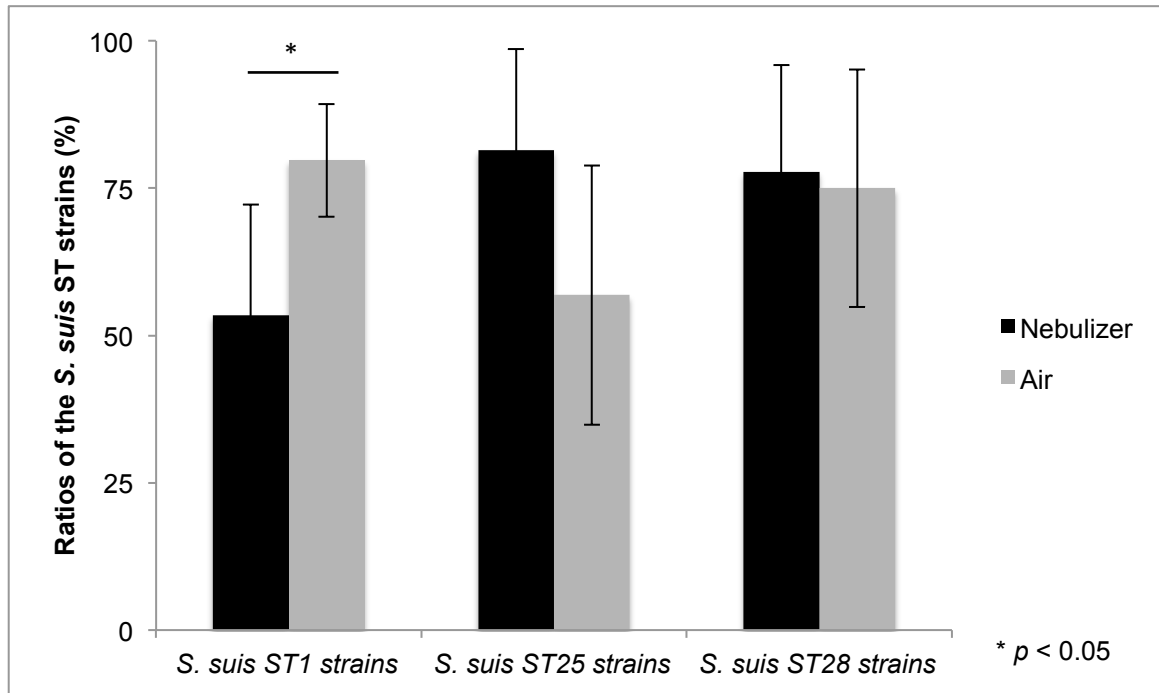


Figure 2-2: Ratio of different ST of *S. suis* serotype 2 in the nebulizing solution and in the air. ST1, 3 strains tested. ST25, 2 strains tested. ST28, 2 strains tested. A Student's t-test analysis for normal distribution was used to perform comparisons. \*, significantly different at  $P$  value < 0.05.



Table 2-1: Serotype, sequence type (ST), origin and diseases of *S. suis* strains used in this study

<b>Strain</b>	<b>Serotype</b>	<b>ST</b>	<b>Origin</b>	<b>Tissue/Disease</b>
<b>P 1/7</b>	2	1	United Kingdom	Meningitis
<b>S735</b>	2	1	Netherlands	Pneumonia
<b>MGGUS2</b>	2	1	United States	Brain
<b>MGGUS4</b>	2	25	United States	Septicaemia
<b>MNCM51</b>	2	25	Thailand	Septicaemia
<b>MGGUS10</b>	2	28	United States	Lung
<b>MGGUS11</b>	2	28	United States	Lung
<b>Amy12C</b>	5	NA	Canada	Infected pig
<b>4B</b>	5	NA	Canada	Infected pig

NA: Not applicable

Table 2-2: Primers and probe used in this study

Primer/ Probe	Target	Sequence	Amplicon length (pb)	Reference
<b>CpS2Jf</b>	<i>cps2J</i>	5'-GGTACTTGCTACTTTTGATGGAAATT-3'	88	Nga <i>et al.</i> [30]
<b>CpS2Jr</b>	<i>cps2J</i>	5'-CGCACCTCTTTTATCTCTTCCAA-3'	88	Nga <i>et al.</i> [30]
<b>CpS2Jp</b>	<i>cps2J</i>	5'-FAM-TCAAGAATCTGAGCTGCAAAG TGTCAAATTGA-TAMRA-3'	88	Nga <i>et al.</i> [30]
<b>CpS5lf</b>	<i>cps5l</i>	5'-TTTTCGTTGTATTTTCCAAA-3'	262	Wang <i>et al.</i> [32]
<b>CpS5lr</b>	<i>cps5l</i>	5'-TCCAAACATTATCCCCTATT-3'	262	Wang <i>et al.</i> [32]

Table 2-3: Relative cell surface hydrophobicity of *S. suis* strains used in this study

Serotype	ST	Strains of <i>S. suis</i>	Hydrophobicity (%)
		P1/7	11 ± 5
	1	S735	6 ± 7
		MGGUS2	1 <sup>a</sup>
2		MGGUS4	5 ± 2
	25	MNCM51	5 ± 1
		MGGUS10	>0 <sup>b</sup>
	28	MGGUS11	5 ± 2
5	NA	Amy12C	88 ± 7
		4B	87 ± 10

NA: Not applicable

a: Two out of three values were negative

b: The three values were negative



# Chapitre 3 : Discussion



La présence de *S. suis* dans l'air des porcheries et le risque potentiel de transmission de ce microorganisme pathogène via l'air a été étudié précédemment [86, 93, 94]. Cependant, il est important d'en connaître davantage sur le processus d'aérosolisation et ceci est le sujet de l'étude. Plus spécifiquement, les objectifs de cette étude étaient de comparer l'aérosolisation préférentielle 1) en fonction du sérotype et 2) en fonction du *sequence type*.

Le fait que *S. suis* sérotype 2 soit le plus fréquemment isolé lors de maladie chez le porc et l'humain ainsi que le fait que ce sérotype possède une capsule épaisse, nous a amené à suggérer qu'il pourrait être préférentiellement aérosolisé par rapport aux autres sérotypes. En analysant les résultats des aérosolisations de *S. suis* S735 (sérotype 2) avec *S. suis* Amy12C ou *S. suis* 4B (sérotype 5), l'aérosolisation apparaît plutôt être souche-dépendante et non sérotype-dépendant. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait pertinent d'aérosoliser d'autres sérotypes par exemple, le sérotype 9. Les deux souches de *S. suis* sérotype 5 avaient des caractéristiques différentes que celles de *S. suis* sérotype 2 soit : une petite capsule et une forte hydrophobicité [82]. Ces deux caractéristiques ne semblent donc pas avoir d'impact important sur le phénomène d'aérosolisation préférentielle de *S. suis*.

L'aérosolisation préférentielle a lieu lorsque le ratio d'une bactérie est plus grand dans l'air par rapport à la source (eaux, sols, etc.). Donc, les souches de *S. suis* du ST1 étudiées dans ce projet, mais non celles du ST25 et ST28, semblent être préférentiellement aérosolisées. Des différences au niveau du génome et des protéines pourraient, en partie, expliquer le phénomène d'aérosolisation préférentielle des différents ST [108]. Tringe *et al.* ont démontré que certains gènes bactériens sont surreprésentés dans l'air (en comparaison avec le profil des gènes dans le sol et dans l'eau). Ces gènes sont impliqués dans la motilité bactérienne, le métabolisme d'oxydoréduction et d'ions inorganiques [108]. Aussi, selon une étude de métagénomique de l'air, les gènes des adhésines seraient surreprésentés dans l'air [108] et il a été démontré que les pili de *S. suis* possède un potentiel rôle d'adhésines [75]. De plus, Fittipaldi et collaborateurs ont démontré que presque toutes les souches de *S. suis* expriment les gènes des pili Sfp1 et/ou Sgp1 [84]. Les souches du ST1, lesquelles ont démontré être aérosolisées préférentiellement dans cette étude, expriment le pilus Sfp1, mais pas le Sgp1 (Sfp1+/Sgp1-) alors que les souches ST25 expriment le pilus Sgp1, mais pas le Sfp1 (Sfp1-/Sgp1+) [84]. Les souches du ST28 expriment, pour la majorité, les deux pili (Sfp1+/Sgp1+) [84]. Alors, le phénotype Sfp1+/Sgp1- pourrait mener à une aérosolisation préférentielle lorsque le pilus Sfp1 est le seul présent à la surface de la cellule. Cependant, cette hypothèse doit être vérifiée.

Comme les souches du ST1 sont préférentiellement aérosolisées et sont les souches les plus virulentes utilisées dans cette étude, il peut être suggéré que les facteurs de virulence peuvent être impliqués dans le phénomène d'aérosolisation préférentielle. La suilysine et le facteur extracellulaire sont deux facteurs de

virulence exprimés par les souches du ST1 et pas chez les souches du ST25 et ST28 [67, 84]. Ye *et al.* ont démontré que les souches du ST1 évoluent des souches du ST25 et qu'elles ont acquis 132 îlots géniques, incluant 5 îlots de pathogénicité et 4 gènes spécifiques aux ST1 [109]. Les îlots géniques acquis par les souches du ST1 sont des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, la structure cellulaire, la recombinaison de l'ADN, le traitement de l'ADN et de l'ARN, des protéines immunogéniques, le métabolisme, des gènes phagiques, la régulation, les signaux de transduction, le transport, la virulence et d'autres fonctions inconnues [109]. Un ou plusieurs gènes acquis par les souches du ST1 pourraient favoriser l'aérosolisation.

Récemment, Atanassov et collaborateurs ont identifié neuf protéines différenciant les souches du ST1, ST25 et ST28 des autres ST. Parmi celles-ci, deux sont surexprimées chez les souches du ST1 [110]. Cependant, ces deux protéines n'ont pas été purifiées pour permettre leur identification. Ces protéines surexprimées chez les souches du ST1 pourraient faciliter l'aérosolisation de ces souches ou encore, les protéines présentes chez les ST25 et ST28 pourraient diminuer l'aérosolisation des souches ST25 et ST28. Les protéines et les gènes spécifiques aux souches du ST1 ou surexprimés dans ces souches peuvent modifier l'affinité de ces souches pour l'interface air/eau ou encore changer la densité cellulaire. Ainsi, ces facteurs pourraient contribuer au phénomène d'aérosolisation préférentielle.

Les souches les moins retrouvées dans l'air pourraient être comprises dans les gouttelettes ayant un diamètre aérodynamique supérieur et ainsi sédimenteraient comparativement aux souches aérosolisées préférentiellement qui, elles, pourraient se retrouver sur les particules avec un diamètre aérodynamique qui leur permet de rester dans l'air pour une plus grande période de temps. Ceci pourrait expliquer que les différentes souches ne se retrouvent pas dans l'air dans les mêmes proportions.

Le nombre de réplicats de chaque expérience se limite à deux, ce qui ne permet pas de tirer de conclusions significatives quant à l'aérosolisation préférentielle d'une souche. Également, dans les solutions de nébulisation, le ratio des deux souches n'était pas toujours de 50% ce qui pourrait avoir eu un impact sur le comportement dans la solution de nébulisation. De plus, le nombre de souches de chaque sérotype ainsi que le nombre de sérotypes sont limités pour permettre des conclusions claires sur l'effet du sérotype sur l'aérosolisation préférentielle. Un nombre de sérotype plus élevé permettrait une meilleure vue d'ensemble de l'aérosolisation préférentielle de *S. suis*. Aussi, les conditions de culture peuvent avoir eu un effet sur la capsule et ainsi fausser les résultats. Également, la phase de croissance de la bactérie peut avoir eu un effet sur la présence de la capsule.

Une meilleure compréhension du processus d'aérosolisation de *S. suis* est essentielle pour permettre de réduire les pertes économiques pour l'industrie porcine et pour augmenter la santé des porcs. De plus, les



études portant sur l'aérosolisation ont un intérêt particulier parce que *S. suis* est un important agent de zoonose particulièrement en Asie où il y a une proximité entre les producteurs et leurs animaux.



## **Chapitre 4 : Conclusion et perspectives**



Le projet avait pour but de développer une méthode d'aérosolisation naturelle permettant l'étude de l'aérosolisation préférentielle de la bactérie pathogène *S. suis*. Pour ce faire, des souches de *S. suis* ont été sélectionnées sur la base de différentes caractéristiques comme le sérotype, le ST et le niveau de virulence. En comparant leur aérosolisation avec une souche de référence, il est suggéré que 1) l'aérosolisation ne semble pas être en fonction du sérotype, mais plutôt en fonction de la souche et 2) les souches du ST1 du sérotype 2 semblent être préférentiellement aérosolisées.

Ce qui est très intéressant des résultats est que les souches les plus virulentes sont également celles qui sont aérosolisées préférentiellement. Ceci met l'accent sur le développement de moyen d'assainissement de l'air dans les porcheries afin de protéger les porcs et les travailleurs. Il serait intéressant d'aérosoliser d'autres souches du ST1 ayant été isolées d'autres maladies que les méningites et les septicémies. Aussi, il serait intéressant d'étudier des souches provenant d'autres ST comme le ST7 qui sont associées à l'éclosion de maladies chez l'homme en Chine. Une autre suite à ce projet serait d'augmenter le nombre de sérotypes étudiés. Par exemple, inclure le sérotype 9 qui est très présent en Europe [81]. Dans un but de protection des travailleurs de l'industrie porcine, l'étude de l'aérosolisation d'isolats humains de *S. suis* serait d'une grande importance.

L'aérosolisation de *S. suis* étant démontré, la suite de ce projet serait d'aérosoliser à l'intérieur d'une chambre environnementale rotative afin de permettre une étude longitudinale. Également, dans ce type de chambre, il est possible d'aérosoliser des bactéries avec des poussières, des agents désinfectants ou des rayonnements ultraviolets afin d'étudier leurs effets sur l'intégrité de la bactérie. Aussi, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'ajout de mucus artificiel sur l'aérosolisation des différentes souches.

Afin de déterminer l'implication de certaines protéines dans l'aérosolisation préférentielle de *S. suis*, la suite du projet serait de créer des mutants n'exprimant plus une certaine protéine. Ceci permettrait de connaître les protéines favorisant l'aérosolisation des bactéries et ainsi de mieux comprendre pourquoi certaines bactéries sont transmises par l'air.



## Bibliographie

1. Sebastian Engelstaedter, I.T., Richard Washington, *North African dust emissions and transport*. Earth-Science Reviews, 2006. **79**: p. 73-100.
2. Miranda, J., F. Zepeda, and I. Galindo, *The possible influence of volcanic emissions on atmospheric aerosols in the city of Colima, Mexico*. Environ Pollut, 2004. **127**(2): p. 271-9.
3. Esther Coza, B.A., Allen L. Robinsonb, Gary S. Casuccioc, Traci L. Lerschc & Spyros N. Pandisde, *Individual Particle Morphology and Acidity*. Aerosol Science and Technology, 2008. **42**(3).
4. Hinds, W.C., *Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles*. Second edition ed. 1999.
5. Duchaine, C., Trudel, L., Létourneau, V., *Bioaérosols et aérobiologie, MCB-4003*, U. Laval, Editor. 2011: Québec, Canada.
6. Verreault, D., S. Moineau, and C. Duchaine, *Methods for sampling of airborne viruses*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(3): p. 413-444.
7. Xie, X., Li, Y., Chwang, A. T. Y. , Ho, P. L., Seto, W. H., *How far droplets can move in indoor environments-revisiting the Wells evaporation-falling curve*. Indoor Air, 2007. **17**: p. 211-225.
8. J. Heyder, J.G., G. Rudolf, C.F. Schiller, W. Stahlhofen, *Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.005–15 µm*. J Aerosol Sci, 1986. **17**(5).
9. W. STAHLHOFEN, G.R., and A.C. JAMES, *Intercomparison of Experimental Regional Aerosol Deposition Data*. J Aerosol Med, 1989. **2**(3).
10. Lev S. Ruzer, N.H.H., *Aerosols Handbook: Measurement, Dosimetry, and Health Effects*. Second Edition ed. 2013: Taylor & Francis Group. 648.
11. Hinds, W.C., *Filtration*, in *Aerosol Technology Properties, Behavior and Measurement of Airborne Particles*. 1999, Wiley-Interscience publication. p. 182-205.
12. Kulkarni, P., Baron, P. A., Willeke, K., *Introduction to aerosol characterization*, in *Aerosol Measurement Principles, Techniques, and Applications*, P. Kulkarni, Baron, P. A., Willeke, K., Editor. 2011, Wiley. p. 3-13.
13. Marcoux-Voiselle, M., *Développement de modèles standardisés pour l'étude des aérosols viraux*. 2014, Université Laval. p. 120.
14. Tang, J.W., et al., *Factors involved in the aerosol transmission of infection and control of ventilation in healthcare premises*. J Hosp Infect, 2006. **64**(2): p. 100-14.
15. Bonifait, L., et al., *Detection and Quantification of Airborne Norovirus During Outbreaks in Healthcare Facilities*. Clin Infect Dis, 2015. **61**(3): p. 299-304.
16. Fox, K., et al., *MALDI-TOF mass spectrometry speciation of staphylococci and their discrimination from micrococci isolated from indoor air of schoolrooms*. J Environ Monit, 2010. **12**(4): p. 917-23.
17. Dee, S., et al., *Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Res, 2009. **40**(4): p. 39.
18. Caruana, D.J., *Detection and analysis of airborne particles of biological origin: present and future*. Analyst, 2011. **136**(22): p. 4641-52.
19. Tang, J.W., *The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents*. J R Soc Interface, 2009. **6 Suppl 6**: p. S737-46.
20. MARTHI, B., FIELAND, V. P., WALTER, M., SEIDLER, R. J., *Survival of Bacteria during Aerosolization*. Appl Environ Microbiol, 1990. **56**(11): p. 3463-3467.
21. Walter, M.V., et al., *Effect of aerosolization on subsequent bacterial survival*. Appl Environ Microbiol, 1990. **56**(11): p. 3468-72.
22. Marthi, B., et al., *Survival of bacteria during aerosolization*. Appl Environ Microbiol, 1990. **56**(11): p. 3463-7.
23. Bolister, N.J., H.E. Johnson, and C.M. Wathes, *The ability of airborne Klebsiella pneumoniae to colonize mouse lungs*. Epidemiol Infect, 1992. **109**(1): p. 121-131.

24. Cox, C.S., *Aerosol survival of Pasteurella tularensis disseminated from the wet and dry states*. Appl Microbiol, 1971. **21**(3): p. 482-486.
25. Prescott, H., Klein, Wiley, J. M., Sherwood, L. M. and Woolverton, C. J., *La nutrition, la croissance et le contrôle des microorganismes*, in *Microbiologie*, L. Bruflodt, Klein, J., Roerig-Blong, J. and Wheatley, C., Editor. 2010, De Boeck.
26. Ko, G., M.W. First, and H.A. Burge, *Influence of relative humidity on particle size and UV sensitivity of Serratia marcescens and Mycobacterium bovis BCG aerosols*. Tuber Lung Dis, 2000. **80**(4-5): p. 217-28.
27. May, K.R., *The Collison Nebulizer: Description, Performance and Application*. Aerosol Science, 1973. **4**: p. 235-243.
28. Zhen, H., et al., *Release of free DNA by membrane-impaired bacterial aerosols due to aerosolization and air sampling*. Appl Environ Microbiol, 2013. **79**(24): p. 7780-9.
29. Thomas, R.J., et al., *The cell membrane as a major site of damage during aerosolization of Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(3): p. 920-5.
30. Zheng, H., Han, T., Fennell, D.E and Mainelis, G, *A systematic comparison of four bioaerosol generators: Affect on culturability and cell membrane integrity when aerosolizing Escherichia coli bacteria*. J Aerosol Sci, 2014. **70**: p. 67-79.
31. Ulevicius, V., Willeke, K., Grinshpun, S. A. , Donnelly, J. , Lin, X. & Mainelis, G., *Aerosolization of Particles from a Bubbling Liquid: Characteristics and Generator Development*. Aerosol Sci Tech, 1997. **26**(2): p. 175-190.
32. Mainelis, G., Berry, D. , An, H. R., Yao, M., DeVoe, K., Fennell, D. E. , Jaeger, R., *Design and performance of a single-pass bubbling bioaerosol generator*. Atmos Environ, 2005. **39**: p. 3521-3533.
33. Simon, X., Duquenne, P. , Koehler, V. , Piernot, C. , Coulais, C. , Faure, M., *Aerosolisation of Escherichia coli and associated endotoxin using an improved bubbling bioaerosol generator*. J Aerosol Sci, 2011. **42**: p. 517-531.
34. Reponen, T., Willeke, K. , Ulevicius, V. , Grinshpun, S. A. & Donnelly, J., *Techniques for Dispersion of Microorganisms into Air*. Aerosol Sci Tech, 1997. **27**(3): p. 405-421.
35. Aller, J.Y., et al., *The sea surface microlayer as a source of viral and bacterial enrichment in marine aerosols*. J Aerosol Sci, 2005. **36**(5-6): p. 801-812.
36. Fahlgren, C., et al., *Seawater mesocosm experiments in the Arctic uncover differential transfer of marine bacteria to aerosols*. Environ Microbiol Rep, 2015.
37. Ishimatsu, S., et al., *Sampling and detection of Legionella pneumophila aerosols generated from an industrial cooling tower*. Ann Occup Hyg, 2001. **45**(6): p. 421-7.
38. Angenent, L.T., et al., *Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(13): p. 4860-5.
39. Fracchia, L., et al., *Site-related airborne biological hazard and seasonal variations in two wastewater treatment plants*. Water Res, 2006. **40**(10): p. 1985-94.
40. Verreault, D., et al., *Design of an environmentally controlled rotating chamber for bioaerosol aging studies*. Inhal Toxicol, 2014. **26**(9): p. 554-8.
41. Turgeon, N., et al., *Neuraminidase Activity as a Potential Enzymatic Marker for Rapid Detection of Airborne Viruses*. Aerosol Science and Technology, 2011. **45**(2): p. 183-195.
42. Drolet, D., Beauchamp, G., *Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail*. 2012, Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité au travail p. 150.
43. Roy, C.J. and D.K. Milton, *Airborne transmission of communicable infection--the elusive pathway*. N Engl J Med, 2004. **350**(17): p. 1710-2.
44. Kesavan, J. and J.L. Sagripanti, *Evaluation criteria for bioaerosol samplers*. Environ Sci Process Impacts, 2015. **17**(3): p. 638-45.
45. Raynor, P.C., Leith, D., Lee, K. W., Mukund, R., *Sampling and analysis using filters*, in *Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications*, P. Kulkarni, Baron, P. A., Willeke, K., Editor. 2011, Wiley. p. 107-128.



46. Wang, C.H., et al., *Field evaluation of personal sampling methods for multiple bioaerosols*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0120308.
47. Durand, K.T.H., *Effect of sampling time on the culturability of airborne fungi and bacteria sampled by filtration*. Ann Occup Hyg, 2002. **46**(1): p. 113-118.
48. Marple, V.A., Olson, B. A., *Sampling and measurement using inertial, gravitational, centrifugal, and thermal techniques*, in *Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications* P. Kulkarni, Baron, P. A., Willeke, K., Editor. 2011, Wiley. p. 129-151.
49. *Instruction Manual, Six and Two Stage Viable Samplers*, T.F.S. Inc., Editor. 2007.
50. willeke, K., X. Lin, and S.A. Grinshpun, *Improved Aerosol Collection by Combined Impaction and Centrifugal Motion*. Aerosol Science and Technology, 1998. **28**(5): p. 439-456.
51. Henningson, E.W., Ahlberg, W. S., *Evaluation of microbiological aerosol samplers: A review*. Journal of Aerosol Science, 1994. **25**(8): p. 1459-1492.
52. Stewart, S.L., et al., *Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface*. Appl Environ Microbiol, 1995. **61**(4): p. 1232-9.
53. Hubad, B. and A. Lapanje, *The efficient method for simultaneous monitoring of the culturable as well as nonculturable airborne microorganisms*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82186.
54. Alvarez, A.J., Buttner, M. P., Stetzenbach, L. D., *PCR for bioaerosol monitoring: sensitivity and environmental interference*. Appl Environ Microbiol, 1995. **61**: p. 3639-3644.
55. Wilson, I.G., *Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**.
56. Rinsoz, T., et al., *Application of real-time PCR for total airborne bacterial assessment: Comparison with epifluorescence microscopy and culture-dependent methods*. Atmospheric Environment, 2008. **42**(28): p. 6767-6774.
57. Chen, P.S. and C.S. Li, *Real-time quantitative PCR with gene probe, fluorochrome and flow cytometry for microorganism analysis*. J Environ Monit, 2005. **7**(3): p. 257-62.
58. Kim, S.Y., et al., *Comparison of molecular and total ATP-based analytical methods with culture for the analysis of bioaerosols*. Sci Total Environ, 2011. **409**(9): p. 1732-7.
59. Sterner, C.S., *A Brief History of Miasmatic Theory*, U.o. Cincinnati, Editor. August 2007.
60. *La génération spontanée n'existe pas*. Site Internet du Musée Louis Pasteur]. Available from: <http://www.musee-pasteur.com/index.php?id=334>.
61. Lindsley, W.G., et al., *Viable influenza A virus in airborne particles from human coughs*. J Occup Environ Hyg, 2015. **12**(2): p. 107-13.
62. Yu, I.T., et al., *Severe acute respiratory syndrome beyond Amoy Gardens: completing the incomplete legacy*. Clin Infect Dis, 2014. **58**(5): p. 683-6.
63. Centers for Disease Control and Prevention, N.C.f.H.A., *Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention Division of Tuberculosis Elimination, Chapter 2– Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis*, in *Introduction to the Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know*. 2013.
64. Moletta-Denat, M., et al., *Selective microbial aerosolization in biogas demonstrated by quantitative PCR*. Bioresour Technol, 2010. **101**(19): p. 7252-7.
65. Moletta, M., J.P. Delgenes, and J.J. Godon, *Differences in the aerosolization behavior of microorganisms as revealed through their transport by biogas*. Sci Total Environ, 2007. **379**(1): p. 75-88.
66. Parker, B.C., et al., *Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria, IV. Preferential aerosolization of Mycobacterium intracellulare from natural waters*. Am Rev Respir Dis, 1983. **128**: p. 652-656.
67. Takeuchi, D., et al., *The contribution of sullysin to the pathogenesis of Streptococcus suis meningitis*. J Infect Dis, 2014. **209**(10): p. 1509-19.
68. Higgins, R. and M. Gottschalk, *Streptococcal Diseases*, in *Diseases of Swine*, J.J.Z. Barbara E. Straw, Sylvie D'Allaire and David J. Taylor, Editor. 2006, Blackwell Publishing: Ames, Iowa. p. 769-783.
69. Lun, Z.R., et al., *Streptococcus suis: an emerging zoonotic pathogen*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(3): p. 201-9.

70. Feng, Y., et al., *Streptococcus suis* infection: an emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases? *Virulence*, 2014. **5**(4): p. 477-97.
71. Gottschalk, M., et al., *Isolation and characterization of Streptococcus suis capsular types 9-22*. *J Vet Diagn Invest*, 1991. **3**(1): p. 60-5.
72. Gottschalk, M., et al., *Characterization of six new capsular types (23 through 28) of Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*, 1991. **29**(11): p. 2590-4.
73. Gottschalk, M., et al., *Description of 14 new capsular types of Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*, 1989. **27**(12): p. 2633-6.
74. Bonifait, L., M. Gottschalk, and D. Grenier, *Cell surface characteristics of nontypeable isolates of Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2010. **311**(2): p. 160-6.
75. Fittipaldi, N., et al., *Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent Streptococcus suis*. *Future Microbiol*, 2012. **7**(2): p. 259-79.
76. Gottschalk, M., M. Segura, and J. Xu, *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim Health Res Rev*, 2007. **8**(1): p. 29-45.
77. Gottschalk, M., et al., *Characterization of Streptococcus suis isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada*. *Vet Microbiol*, 2013. **162**(2-4): p. 819-25.
78. Wei, Z., et al., *Characterization of Streptococcus suis isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007*. *Vet Microbiol*, 2009. **137**(1-2): p. 196-201.
79. Kim, D., et al., *Distribution of capsular serotypes and virulence markers of Streptococcus suis isolated from pigs with polyserositis in Korea*. *Can J Vet Res*, 2010. **74**(4): p. 314-6.
80. Fittipaldi, N., et al., *Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and suliyisin by field strains of Streptococcus suis isolated in the United States*. *Vet Microbiol*, 2009. **139**(3-4): p. 310-7.
81. Wisselink, H.J., et al., *Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of Streptococcus suis strains isolated from diseased pigs in seven European countries*. *Vet Microbiol*, 2000. **74**(3): p. 237-48.
82. Gomez, E., et al., *Streptococcus suis*-related prosthetic joint infection and streptococcal toxic shock-like syndrome in a pig farmer in the United States. *J Clin Microbiol*, 2014. **52**(6): p. 2254-8.
83. King, S.J., et al., *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*, 2002. **40**(10): p. 3671-80.
84. Fittipaldi, N., et al., *Lineage and virulence of Streptococcus suis serotype 2 isolates from North America*. *Emerg Infect Dis*, 2011. **17**(12): p. 2239-44.
85. Lowe, B.A., et al., *Microbial communities in the tonsils of healthy pigs*. *Vet Microbiol*, 2011. **147**(3-4): p. 346-57.
86. Berthelot-Herault, F., et al., *Experimental airborne transmission of Streptococcus suis capsular type 2 in pigs*. *Vet Microbiol*, 2001. **82**(1): p. 69-80.
87. Cloutier, G., et al., *Epidemiology of Streptococcus suis serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease*. *Vet Microbiol*, 2003. **97**(1-2): p. 135-51.
88. Robertson, I.D., et al., *A longitudinal study of natural infection of piglets with Streptococcus suis types 1 and 2*. *Epidemiol Infect*, 1991. **107**(1): p. 119-26.
89. Berthelot-Herault, F., et al., *Experimental infection of specific pathogen free piglets with French strains of Streptococcus suis capsular type 2*. *Can J Vet Res*, 2001. **65**(3): p. 196-200.
90. Madsen, L.W., et al., *Experimental infection of conventional pigs with Streptococcus suis serotype 2 by aerosolic exposure*. *Acta Vet Scand*, 2001. **42**(2): p. 303-6.
91. Madsen, L.W., et al., *Aerogenous infection of microbiologically defined minipigs with Streptococcus suis serotype 2. A new model*. *APMIS*, 2001. **109**(6): p. 412-8.
92. Madsen, L.W., et al., *Bacterial colonization and invasion in pigs experimentally exposed to Streptococcus suis serotype 2 in aerosol*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2002. **49**(5): p. 211-5.

93. Dekker, N., et al., *Effect of spatial separation of pigs on spread of Streptococcus suis serotype 9*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61339.
94. Bonifait, L., et al., *Detection of Streptococcus suis in bioaerosols of swine confinement buildings*. Appl Environ Microbiol, 2014. **80**(11): p. 3296-304.
95. Gottschalk, M., et al., *Streptococcus suis Infections in Humans: What is the prognosis for Western countries? (Part I)*. Clinical Microbiology Newsletter, 2010. **32**(12): p. 89-96.
96. Huong, V.T., et al., *Epidemiology, clinical manifestations, and outcomes of Streptococcus suis infection in humans*. Emerg Infect Dis, 2014. **20**(7): p. 1105-14.
97. Gottschalk, M., et al., *Streptococcus suis Infections in Humans: What is the prognosis for Western countries (Part II)*. Clinical Microbiology Newsletter, 2010. **32**(13): p. 97-102.
98. Yu, H., et al., *Human Streptococcus suis outbreak, Sichuan, China*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(6): p. 914-20.
99. Mai, N.T., et al., *Streptococcus suis meningitis in adults in Vietnam*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(5): p. 659-67.
100. Suankratay, C., et al., *Streptococcus suis meningitis in Thailand*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2004. **35**(4): p. 868-76.
101. Michaud, S., R. Duperval, and R. Higgins, *Streptococcus suis meningitis: First case reported in Quebec*. Can J Infect Dis, 1996. **7**(5): p. 329-31.
102. Trottier, S., et al., *A case of human endocarditis due to Streptococcus suis in North America*. Rev Infect Dis, 1991. **13**(6): p. 1251-2.
103. Willenburg, K.S., D.E. Sentochnik, and R.N. Zadoks, *Human Streptococcus suis meningitis in the United States*. N Engl J Med, 2006. **354**(12): p. 1325.
104. Haleis, A., et al., *Meningitis caused by Streptococcus suis serotype 14, North America*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(2): p. 350-2.
105. Lee, G.T., et al., *Streptococcus suis meningitis, United States*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(1): p. 183-5.
106. Fittipaldi, N., et al., *Streptococcus suis meningitis, Hawaii*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(12): p. 2067-9.
107. Fowler, H.N., et al., *Streptococcus suis meningitis in swine worker, Minnesota, USA*. Emerg Infect Dis, 2013. **19**(2): p. 330-1.
108. Tringe, S.G., et al., *The airborne metagenome in an indoor urban environment*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1862.
109. Ye, C., et al., *Clinical, experimental, and genomic differences between intermediately pathogenic, highly pathogenic, and epidemic Streptococcus suis*. J Infect Dis, 2009. **199**(1): p. 97-107.
110. Atanassov, C., et al., *Candidate proteomic biomarkers for three genogroups of the swine pathogen Streptococcus suis serotype 2*. BMC Microbiol, 2015. **15**(1): p. 84.