

Université de Montréal

**Caractérisation de la réponse anticorps induite  
par les bactéries autogènes et de leur effet protecteur pour contrôler les  
infections à *Streptococcus suis* chez le porc**

par

Lorelei Corsaut

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)  
en sciences vétérinaires, option microbiologie

Août 2019

© Lorelei Corsaut, 2019

# Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

---

Ce mémoire intitulé

**Caractérisation de la réponse anticorps induite par les bactérines autogènes et de leur effet protecteur pour contrôler les infections à *Streptococcus suis* chez le porc**

Présenté par

**Lorelei Corsaut**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Mme Neda Barjesteh**

Présidente rapporteuse

**Mme Mariela Segura**

Directrice de recherche

**M. Marcelo Gottschalk**

Co-directeur

**M. Marty Misener**

Co-directeur

**Mme Sylvie D'Allaire**

Membre du jury

## Résumé

*Streptococcus suis*, l'une des principales bactéries pathogènes présentes chez les porcelets sevrés, est responsable d'importantes pertes économiques dans l'industrie porcine. Aujourd'hui, les vaccins autogènes composés de bactéries tuées (bactérines) sont principalement utilisés mais les études ayant mesuré leur effet chez les porcs sont rares et controversées. Cette étude a évalué la réponse immunitaire induite par ces vaccins sur le terrain en comparant la vaccination des truies (immunité passive transférée aux porcelets) et des porcelets (immunité active). L'étude utilisait une ferme ayant des problèmes récurrents à *S. suis* et était divisée en deux parties : I) Les porcelets de truies non vaccinées ont reçu 2 doses d'une bactérine autogène. II) Les truies ont reçu 2 doses du même vaccin durant la gestation. Les réponses en anticorps ont été analysées par ELISA et leur effet protecteur par un test d'opsonophagocytose (OPA). La vaccination des porcelets n'a pas induit de réponse immunitaire active même après deux doses. Dans la deuxième partie, des taux élevés d'anticorps (principalement d'origine maternelle) avec une importante activité OPA ont été observés chez les porcelets âgés d'environ 1 semaine, indépendamment de la vaccination des truies. Ils diminuaient à 3 semaines d'âge, période la plus à risque. Malgré une légère augmentation des anticorps chez les truies vaccinées, le transfert d'immunité maternelle aux porcelets restait identique. Globalement, un programme de vaccination actif ou passif de porcelet avec la bactérine autogène utilisée ici n'a pas induit de protection durable chez les porcelets post-sevrés. Une amélioration de la formulation du vaccin est requise.

**Mots-clés :** *Streptococcus suis*, vaccin, bactérines autogènes, étude de terrain, réponse immunitaire, vaccination.

## Abstract

*Streptococcus suis*, one of the most important bacterial pathogen in weaned piglets, is responsible for serious economic losses in the swine industry. Today, mostly autogenous vaccines composed of killed bacteria (bacterins) are used but studies that assessed their protective effect on pigs are missing and their ability to protect is controversial. This comparative field study evaluated the immunological response induced by these vaccines comparing vaccination of sows (passive immunity transferred to piglets) or piglets (active immunity). Using a sow herd with recurrent *S. suis* problems, the study was divided in two parts: I) Piglets from non-vaccinated sows received 2 doses of an autogenous bacterin. II) Sows received 2 doses of the same vaccine during gestation. Antibody responses were analyzed by ELISA and their protective effect was evaluated by an opsonophagocytosis assay (OPA). Piglet vaccination failed to induce an active immune response even after two vaccine doses. In the 2<sup>nd</sup> part of the study, high levels of antibodies (mainly maternal-derived) with marked OPA activity were observed in piglets at 1 week old approximately, independently of sow vaccination. These antibodies decreased at 3 weeks of age, in the post-weaning high-risk period. In spite of a slight increase of antibodies in vaccinated sows, maternal immunity transfer to piglets did not increase. Overall, an active or passive piglet vaccination program with the autogenous bacterin used herein failed to induce lasting protection in post-weaned piglets. An improvement of vaccine formulation may be required.

**Keywords:** *Streptococcus suis*, vaccine, autogenous bacterins, field study, immune response, vaccination.

# Table des matières

Résumé .....	3
Abstract .....	4
Table des matières .....	5
Liste des figures .....	7
Liste des tableaux .....	8
Liste des abréviations .....	9
Remerciements .....	11
I. Introduction .....	13
II. Revue de littérature.....	17
1 <i>Streptococcus suis</i> .....	18
1.1 Caractéristiques générales .....	18
1.1.1 Sérotypes et ‘sequence types’ .....	18
1.1.1.1 Sérotypes .....	19
1.1.1.2 ‘Sequence type’ .....	23
1.2 Aspects épidémiologiques.....	25
1.2.1 Transmission .....	25
1.2.2 Pathogénèse.....	28
1.2.3 Signes cliniques .....	31
1.2.4 Traitements antimicrobiens.....	32
2 Réponses immunitaires contre les infections.....	33
2.1 La réponse immunitaire innée .....	33
2.2 La réponse immunitaire adaptative .....	34
2.3 La production d’anticorps .....	39
3 Vaccination .....	40
3.1 Vaccins vivants atténués (expérimental).....	40
3.2 Vaccins sous-unitaires (expérimental) .....	42
3.3 Bactérines .....	44
3.3.1 Expérimentales.....	46
3.3.2 Commerciales .....	48
3.3.3 Autogènes .....	48

3.4	Les stratégies vaccinales .....	50
3.4.1	Immunsation des porcelets.....	51
3.4.2	Immunsation des truies (transfert de l'immunité maternelle).....	52
3.5	Les adjuvants utilisés en médecine vétérinaire .....	53
III.	Article scientifique .....	56
IV.	Discussion.....	87
V.	Conclusion et perspectives .....	92
Références	.....	94
Annexes	.....	109

# Liste des figures

## Revue de littérature

<b>Figure 1.</b> Distribution mondiale des sérotypes de <i>S. suis</i> les plus fréquemment isolés de porcs malades de janvier 2002 à décembre 2013. ....	22
<b>Figure 2.</b> Distribution mondiale des sérotypes de <i>S. suis</i> les plus fréquemment isolés de zoonoses jusqu'à décembre 2013. ....	22
<b>Figure 3.</b> Les ST du sérotype 2 de <i>S. suis</i> et ses 3 principaux complexes clonaux.....	24
<b>Figure 4.</b> Distribution mondiale des ST du sérotype 2 de <i>S. suis</i> les plus souvent isolés de cas cliniques chez le porc de janvier 2002 à décembre 2013. ....	24
<b>Figure 5.</b> Distribution mondiale des ST du sérotype 2 de <i>S. suis</i> isolés de cas d'infection chez l'Homme jusqu'en 2017 .....	25
<b>Figure 6.</b> Recensement des données sur les vaccins à base de bactérines depuis 1994 .....	46

## Article scientifique

<b>Figure 1.</b> Experimental design of the field study. ....	66
<b>Figure 2.</b> Experiment 1: Kinetics of total Ig against <i>S. suis</i> serotype 7 in piglets.....	67
<b>Figure 3.</b> Experiment 1: Isotype profile of antibodies against <i>S. suis</i> serotype 7 in piglets.....	69
<b>Figure 4.</b> Experiment 1: Opsonophagocytosis killing of <i>S. suis</i> serotype 7 induced by serum antibodies from piglets.....	71
<b>Figure 5.</b> Experiment 1: Number of <i>S. suis</i> -related injectable treatments and <i>S. suis</i> -induced number of death in piglets over time. ....	73
<b>Figure 6.</b> Experiment 2: Total Ig levels against <i>S. suis</i> serotype 7 or serotype 9 in sows.....	74
<b>Figure 7.</b> Experiment 2: Isotype profile of antibodies against <i>S. suis</i> serotype 7 or serotype 9... 75	
<b>Figure 8.</b> Experiment 2: Kinetics of total Ig and isotype profile of antibodies against <i>S. suis</i> serotype 7 or serotype 9 in piglets from either vaccinated or non-vaccinated sows. ....	77
<b>Figure 9.</b> Experiment 2: Opsonophagocytosis killing of <i>S. suis</i> serotype 7 induced by serum antibodies from sows and from their piglets.....	78
<b>Figure 10.</b> Experiment 2: Number of <i>S. suis</i> -related injectable treatments and <i>S. suis</i> -induced number of death in piglets over time.. ....	79

# Liste des tableaux

## Revue de littérature

**Tableau 1** : Distribution des sérotypes retrouvés au Canada dans 582 isolats de cas cliniques de juin 2015 à décembre 2018 .....21

## Article scientifique

**Table 1** : Distribution of mortality among vaccinated and non-vaccinated piglets..... 72

**Table 2** : Distribution of treatment data among vaccinated and non-vaccinated piglets in the post-weaning period..... 72

**Table 3** : Distribution of mortality among piglets from vaccinated and non-vaccinated sows... 79



## Liste des abréviations

ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
BCR	Récepteurs des cellules B
BMEC	Cellules endothéliales microvasculaires
CCL, CXCL	Chimiokines
CEPC	Cellules épithéliales du plexus choroïdien
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CPS	Capsule polysaccharidique
CSF	Liquide céphalo-rachidien
EF	« Extracellular factor »
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T
LTh	Lymphocyte T helper
MLST	« Multilocus sequence typing »
MOI	« Multiplicity Of Infection »
MRP	« Muramidase-release protein »
NK	Cellule Natural Killer
OPA	« Opsonophagocytosis assay »
PAMP	« Pathogen-associated molecular pattern »
PCR	« Polymerase chain reaction »
PMN	Cellules polymorphonucléaires
PRR	« Pattern recognition receptor »
SAO	« Surface antigen one »
SAT	« Surface antigen two »
SEM	« Standard error of the mean »

SNC	Système nerveux central
SRRP	Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin
SsEno	« <i>Streptococcus suis</i> enolase »
SsnA	« Secreted <i>Streptococcus suis</i> nuclease A »
Ss pepO	« Secreted <i>Streptococcus suis</i> putative endopeptidase O »
Ss pepC	« Secreted <i>Streptococcus suis</i> putative endopeptidase C »
ST	« Sequence type »
TCR	Récepteur des cellules T
TD	Voie thymo-dépendante
THA	« Todd Hewitt Broth Agar »
THB	« Todd Hewitt Broth »
TI	Voie thymo-indépendante
TLR	« Toll-like receptor »
TNF	« Tumor necrosis factor »

## Remerciements

Et c'est ici que commence la partie la plus difficile. Réussir à faire tenir toute ma gratitude en quelques lignes.

J'aimerais tout d'abord dire un gros, GROS, que dis-je ENORME merci à ma directrice de recherche Mariela Segura pour m'avoir donné ma chance en maîtrise il y a 2 ans et demi déjà. Grâce à vous j'ai pu acquérir énormément de confiance en moi et en mon travail, je me suis découvert une passion pour la recherche que je ne soupçonnais pas et la confiance que vous m'avez accordée m'a mené jusqu'ici. Je peux dire que je suis fière de mon parcours grâce à vous. Je ne peux pas remercier ma directrice sans citer mon co-directeur Marcelo Gottschalk, sans vous deux ce mémoire n'aurait jamais pu naître, sans vous toute cette incroyable expérience n'aurait jamais été possible. Merci de m'avoir donné cette chance, de m'accorder votre confiance, d'avoir cru en moi et de croire toujours en moi d'ailleurs. Grâce à vous j'ai pu m'épanouir autant professionnellement que personnellement et je ne vous en remercierais jamais assez pour ça. Un clin d'œil tout particulier à votre remarquable sens de gestion de la pression pour qu'on puisse rendre ce mémoire à temps. Vous êtes à mes yeux une belle source d'inspiration.

Je remercie mon co-directeur Marty Misener et son équipe grâce à qui nous avons pu mener ce projet de bout en bout avec une bonne coordination entre Québec et Ontario.

Un merci tout particulier à Claudia Duquette pour m'avoir appris les ELISA et comment faire de belles dilutions dans la plaque. C'est grâce à toi que j'ai pu avoir d'aussi beaux résultats ! Merci pour ton sourire et ta bonne humeur qui ont su apporter beaucoup de joie au début de ma maîtrise.

Un très gros merci à Léa qui a toujours su me rassurer quand je faisais des bêtises au labo. Merci d'avoir été là pour répondre à mes interrogations en tout genre et merci de m'avoir appris les OPA qui, là aussi, m'ont permis d'obtenir de beaux résultats ! Merci pour ton amitié qui a été d'un grand soutien moral.

Merci à mes collègues mais avant tout amies Marêva, Héloïse et Servane pour leur soutien moral incontestable, merci d'être ma source de motivation à aller tous les jours au labo. Merci de m'avoir aidé dans mes manips et merci d'avoir été présentes dans la joie comme dans la détresse, surtout dans la détresse.

Un merci également à Victoria pour m'avoir aidé avec mes montagnes de géluses lors de mes OPA, pour nos longues discussions constructives sous la hotte lorsque nous faisons nos dilutions.

Un merci plus général aux membres des laboratoires Segura et Gottschalk pour chaque aide ou conseil qui m'ont permis d'avancer. Merci également d'avoir sorti mes géluses certains samedis ! Merci particulier à Annie pour m'avoir aidé avec les OPA. Dédicace à Dominic pour m'écouter me plaindre en me partageant son thé dans notre bureau.

Merci à Sylvie D'Allaire et Martine Denicourt d'avoir été présentes dans mon comité conseil.

Merci à Neda Barjesteh d'avoir accepté d'être jury dans l'évaluation de ce mémoire, merci aussi aux autres membres du jury que j'ai cité précédemment.

Un gros merci à Christine Blondin, Diane Rodier, Nancy Bisailon, Isabelle Flibotte et Cécile Crost pour leur remarquable travail et leur sens de l'implication pour les étudiants.

Merci aux organismes subventionnaires CRIPA, GREMIP, FESP et Zoétis.

Un énorme merci tout particulier à mon ami Julien Clain sans qui je n'aurai jamais survécu au Canada. Merci d'avoir toujours été présent pour moi de m'avoir soutenu jusqu'au bout de cette maîtrise et même au-delà, peu importe les circonstances, je suis reconnaissante de t'avoir près de moi depuis notre départ de la Réunion, je suis fière de nous ! 974 dan kèr.

Merci à mes amis, présents aux 4 coins de la Terre. Merci à mes colocos Emilie et Florence. Merci également à mes frères Ludovic, Romain et Ryan.

Enfin et surtout, un tendre merci à ma maman dont le soutien quotidien a permis ma réussite, c'est à toi que je dois tout ça et tout ce que je suis. Un grand merci pour m'avoir transmis ta force et ton courage, pour croire en moi et pour me pousser à réaliser mes ambitions et mes rêves. Encore plus à des milliers de kilomètres, ton soutien ne m'a jamais été aussi précieux.

Merci à la vie qui m'offre toutes ses belles aventures, toutes ces belles rencontres et toutes ses belles opportunités.

# **I. Introduction**

*Streptococcus suis* (*S. suis*) est un agent pathogène affectant mondialement l'industrie porcine. Il est responsable de pertes économiques considérables (1). Il représente également un agent zoonotique non négligeable. Chez le porc comme chez l'Homme, il est capable de causer des méningites et des septicémies. *S. suis* a d'abord été considéré uniquement comme une menace pour la santé et la sécurité des employés de l'industrie porcine. Ce n'est qu'après les deux épisodes majeurs d'épidémies humaines en Asie que ce pathogène a été considéré plus sérieusement comme une menace pour la santé publique (2). Il est donc important de trouver un moyen de contrôler ce pathogène à tous les niveaux. Le contrôle de *S. suis* est principalement fondé sur l'antibiothérapie, et, dans les pays où cela est encore permis, l'antibioprophylaxie et/ou metaphylaxie. Toutefois, plusieurs souches s'avèrent résistantes ou intermédiaires vis-à-vis des différents antibiotiques. De plus les nouvelles normes concernant la réduction de l'utilisation prophylactique des antibiotiques favorisent l'émergence des cas cliniques (3). Malgré la menace que *S. suis* représente, il n'y a toujours pas de vaccin commercial disponible au Canada. De nombreuses années ont été investies dans la recherche d'un vaccin universel mais la difficulté réside dans la diversité génétique et phénotypique des différents sérotypes de *S. suis* et de la diversité des souches et de leur virulence au sein d'un même sérotype. De plus, le manque de connaissance concernant les facteurs de virulence de *S. suis* ainsi que leur implication dans la pathogénèse complique le développement de vaccins efficaces. Plusieurs vaccins ont été développés, tel que les vaccins sous-unitaires, les vaccins vivants atténués ainsi que les vaccins à base de bactérines, mais la plupart sont encore au stade expérimental. A ce jour, les vaccins autogènes à base de bactérines sont très majoritairement utilisés sur le terrain mais leur efficacité est controversée et reste à être étudiée.

Les vaccins à base de bactérines autogènes sont préparés à partir de la ou des même(s) souche(s) ayant causé des problèmes cliniques dans la ferme où il sera utilisé. Bien que ces vaccins soient majoritairement utilisés sur le terrain pour contrôler des infections à *S. suis*, très peu d'études se sont penchées sur leur efficacité (4). Par la complexité génétique et phénotypique de *S. suis* (différentes souches, différents sérotypes et 'Sequence Types'), ces vaccins sont hautement spécifiques et ne permettent pas une protection universelle contre les différents sérotypes de *S. suis*, toutefois l'étude de leur efficacité, bien qu'homologue, est primordial.

Les porcelets en post-sevrage sont les plus à risque de contracter des infections à *S. suis*. Leur vulnérabilité serait probablement provoquée par l'affaiblissement du système immunitaire, les

conditions stressantes du sevrage et de la séparation de la mère. Ainsi, le but ultime est de protéger les porcelets. Leur immunisation à partir des vaccins autogènes peut se faire via deux voies : l'immunisation passive ou active. Ainsi, ces vaccins sont administrés aux truies en gestation ou aux porcelets, respectivement.

**L'objectif général** de ce mémoire est de réaliser pour la première fois une étude de terrain détaillée sur la réponse immunitaire induite par un vaccin autogène contre *S. suis*.

**Les objectifs spécifiques** sont :

- Étudier la réponse immunitaire à la suite d'un programme de vaccination à deux doses des porcelets :
  - Caractériser la magnitude et le profil de la réponse d'anticorps des porcelets vaccinés.
  - Caractériser le potentiel protecteur des anticorps de porcelets vaccinés.
  - Caractériser l'effet protecteur sur le terrain grâce au suivi clinique des porcelets vaccinés.
- Étudier la réponse immunitaire à la suite d'un programme de vaccination à deux doses des truies et la transmission passive d'anticorps vers les porcelets :
  - Caractériser la magnitude et le profil de la réponse anticorps de truies gestantes vaccinées.
  - Caractériser le potentiel protecteur des anticorps de truies gestantes vaccinées
  - Caractériser la magnitude, le profil et la durée de la réponse anticorps transmis aux porcelets nés de truies vaccinées.
  - Caractériser le potentiel protecteur des anticorps transmis aux porcelets nés de truies vaccinées.
  - Caractériser l'effet protecteur sur le terrain grâce au suivi clinique des porcelets nés de truies vaccinées.

**Les retombés scientifiques anticipées sont :**

Cette étude de terrain, détaillée, permettra d'apporter des réponses sur l'efficacité d'un vaccin à base de bactérines autogènes utilisé pour contrôler les infections à *S. suis*. Aussi, elle permettra de comparer la réponse immunitaire chez les porcelets à la suite de deux différentes stratégies vaccinales à savoir la vaccination directe des porcelets ou le transfert d'immunité maternelle à la suite de la vaccination des truies. Cette étude permettra également d'évaluer la transmission et la durée de l'immunité maternelle. Ces réponses vont être profitables aux producteurs de l'industrie porcine, ces derniers étant victime des pertes économiques provoquées par *S. suis*. Elles vont également permettre d'ouvrir des pistes sur l'amélioration de vaccins pour les rendre plus efficaces.



## **II. Revue de littérature**

# 1 *Streptococcus suis*

## 1.1 Caractéristiques générales

*S. suis* est le pathogène bactérien le plus important chez les jeunes porcelets, il est à l'origine de pertes économiques graves dans l'industrie porcine, au Canada comme dans le reste du monde. Chez le porc, il est à l'origine de septicémies, arthrites, pneumonie, méningites pouvant parfois mener à une mort subite. De plus, *S. suis* est un agent zoonotique en émergence qui touche la santé et la sécurité des employés de l'industrie porcine. Chez l'homme, des symptômes similaires peuvent être notés : *S. suis* est capable de provoquer des méningites et des septicémies pouvant mener à un choc septique. La réduction dans l'utilisation des antimicrobiens souligne l'importance et l'urgence de trouver des moyens de contrôle pour lutter contre cette bactérie.

D'un aspect microbiologique, *S. suis* est une bactérie encapsulée à Gram positif, anaérobie facultative se retrouvant seule, en paires ou en courtes chaînes de formes ovoïdes ou sphériques d'un diamètre inférieur à 2  $\mu\text{m}$ . *S. suis* est capable de croître à la fois en conditions aérobie et anaérobie. Toutefois, un environnement à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> sont des conditions favorables à sa croissance et constituent donc ses conditions d'incubation sur gélose agar au sang de mouton où elle forme des petites colonies  $\alpha$ -hémolytiques, grises et rondes. En présence de sang de cheval, certaines souches sont  $\beta$ -hémolytiques.

*S. suis* fait partie de la microflore naturelle de la cavité orale des porcs. De ce fait, il est difficile de l'identifier de manière biochimique car il se confond avec d'autres streptocoques également présents dans cette microflore et qui sont phénotypiquement similaires à *S. suis*. Plusieurs techniques moléculaires ont été mises au point pour permettre la détection et l'identification de *S. suis* tel que la PCR ciblant les gènes de ménage codant pour la glutamate déshydrogénase. *S. suis* est difficile à contrôler également à cause de sa diversité basée sur la classification par sérotypes et 'sequence types'.

### 1.1.1 Sérotypes et 'sequence types'

La diversité de *S. suis* s'exprime autant par sa génétique que par son phénotype. Ainsi, il existe deux principales classifications basées sur ces deux caractéristiques.

### 1.1.1.1 Sérotypes

Après l'identification de l'espèce, le sérotypage est un élément important pour une caractérisation complète de *S. suis*. Il existe 35 sérotypes décrits à ce jour, leur différenciation se base sur la description antigénique de la capsule polysaccharidique (CPS) (5). Une grande diversité génétique règne au sein de ces différents sérotypes de *S. suis* et cette diversité est d'ailleurs d'autant plus grande puisqu'il existe des variantes (souches) pour chaque sérotype, qui se base sur l'expression des facteurs et des gènes de virulence.

Pour comprendre comment la classification de *S. suis* est faite, il faut s'intéresser à son histoire. Au début des années 1950, Jansen et van Dorssen ont identifiés les premiers cas de méningo-encéphalites causés par des streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques chez des porcs et des porcelets aux Pays Bas puis au Royaume-Uni (6). Un peu plus tard, en 1963, De Moor a décrit des streptocoques similaires chez des porcs septicémiques et les a classés en 4 nouveaux groupes dans la classification de Lancefield, un système basé sur les antigènes de la paroi cellulaire, ces groupes étant nommés R, S, RS et T (7). Par la suite Windsor et Elliot ont réalisé que les polysaccharides impliqués dans cette classification provenaient de la CPS et non de la paroi cellulaire et ont redéfini les termes en classant les streptocoques des groupes S en sérotype 1 et les streptocoques des groupes R en sérotype 2 (8, 9). Les streptocoques du groupe RS montrant une réaction croisée ont été redéfinis en sérotype 1/2. Le sérotype T a été, quant à lui, reclassé comme sérotype 15 en 1989. En 1987, *S. suis* est officiellement reconnu comme nouvelle espèce de *Streptococcus*. Par la suite, de nouveaux sérotypes provenant de porcs sains (sérotypes 17, 18, 19 et 21) ou malades (sérotype 9, 22 et 7) ont été décrits. Certains ont été retrouvés dans des cas d'infections chez d'autres espèces : les sérotypes 20 et 31 ont été isolés de veaux malades, le sérotype 33 d'un agneau et le sérotype 14 d'un cas humain de méningite. On compte maintenant 35 sérotypes comprenant les sérotypes 1 à 34 et le sérotype 1/2 (10). Cependant, certains sérotypes sont encore sujet à des doutes concernant leur classification. En 1998, Chatellier *et al.* reportent que, selon l'analyse de l'ARNr 16S, six d'entre eux sont génétiquement éloignés de l'espèce de *S. suis* et pourraient faire partie d'une autre espèce de streptocoques (sérotypes 32, 34, 20, 22, 26 et 33) (11). Ils précisent d'ailleurs que les sérotypes 32 et 34, isolés chez des porcs, se rapprocheraient davantage des groupes de streptocoques pyogéniques incluant *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus porcinus* et *Streptococcus uberis*. Plus tard, ces deux sérotypes ont finalement été classés comme étant *Streptococcus orisratti*, un streptocoque  $\alpha$ -hémolytique fréquemment isolé des dents de rats (12).

Récemment, la taxonomie de *S. suis* a été révisée et il semblerait que les sérotypes 20, 22 et 26 puissent être considérés comme de nouvelles espèces qui se distinguent de *S. suis* par leur nouvelle appellation *Streptococcus parasuis sp. nov* (13).

Plusieurs méthodes permettent l'identification des sérotypes tel que la PCR, la co-agglutination, la précipitation capillaire ou encore de réaction capsulaire de Neufeld en utilisant des antisérums de référence. En Amérique du Nord, le test de co-agglutination reste le plus utilisé (14, 15). Dans certains cas, des réactions croisées peuvent avoir lieu durant ces tests d'identification, dues à des déterminants antigéniques communs comme c'est le cas notamment entre les sérotypes 1/2 et 2, 6 et 16, 2 et 22 et 1 et 14. Dans ce cas, l'absorption est recommandée dans le but d'obtenir des antisérums mono-spécifiques et écarter le risque de réaction croisée lors de test d'identification de sérotype (sérotypage) (16). La méthode de PCR pour l'identification de sérotype a pour avantage de ne pas utiliser d'antisérum, de ce fait les animaux ne sont pas utilisés pour la production de sérums. Cette technique est également avantageuse pour la confirmation d'un sérotype pour une souche autoagglutinante, qui n'exprime pas la capsule ou qui réagit avec plusieurs sérotypes lors des tests sérologiques. Toutefois, cette méthode basée sur l'analyse des gènes de CPS peut parfois s'avérer inefficace pour les sérotypes qui ne possèdent pas de gènes de CPS uniques comme c'est le cas pour les sérotypes ayant ces gènes en communs : 2 avec 1/2 et 14 avec 1 (17). La PCR n'est donc pas recommandée pour ces sérotypes d'autant plus que les sérotypes 1, 1/2, 2 et 14 sont fréquemment isolés de cas cliniques. Certaines souches sont « non-typables » si elles ont subi des modifications génétiques de délétions ou insertions ayant entraîné la perte de leur CPS, si une souche ne réagit avec aucun antisérum de référence ou si une souche ne s'apparente à aucune souche répertoriée. En effet, cette catégorie de souches a déjà été isolée de cas d'infection chez l'Homme au Japon (16).

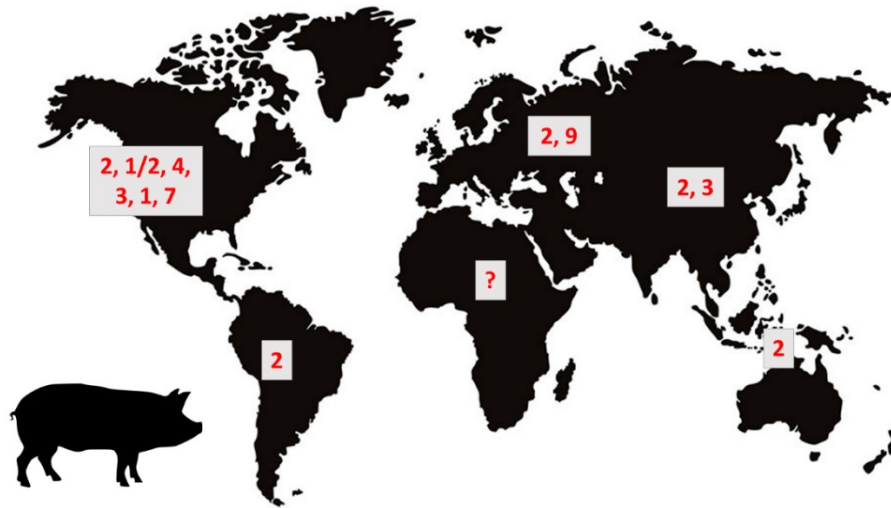
La majorité des sérotypes retrouvés chez des porcs malades regroupe les sérotypes 1 à 9 et le sérotype 14, ces derniers étant considérés comme les plus virulents (**Tableau 1**). Dans la plupart des pays, le sérotype 2 est la cause de la majorité des cas d'infections ce qui fait de lui le sérotype le plus virulent. Ce sérotype est d'autant plus à risque puisqu'il a été retrouvé dans de nombreux cas d'infections humaines (16). Cependant, le sérotype 9 a aussi été rapporté comme étant le plus fréquemment isolé de cas cliniques dans plusieurs pays de l'Europe (16).

**Tableau 1** : Distribution des sérotypes retrouvés au Canada dans 582 isolats de cas cliniques de juin 2015 à décembre 2018 [Données non publiées, Gottschalk M. *et al.* avec permission].

Sérotype	Cas cliniques (%)	Sérotype	Cas cliniques (%)	Sérotype	Cas cliniques (%)	Sérotype	Cas cliniques (%)
<b>1</b>	<b>4.6</b>	<b>10</b>	1	<b>20</b>	0%	<b>30</b>	<1
<b>2</b>	<b>10.8</b>	<b>11</b>	<1	<b>21</b>	<1 %	<b>31</b>	2.7
<b>1/2</b>	<b>11.0</b>	<b>12</b>	0	<b>22</b>	1.4	<b>32</b>	<1
<b>3</b>	<b>6.4</b>	<b>13</b>	0	<b>23</b>	2.1	<b>33</b>	0
<b>4</b>	<b>6.2</b>	<b>14</b>	<b>4,6</b>	<b>24</b>	<1	<b>34</b>	1.5
<b>5</b>	<b>5.8</b>	<b>15</b>	<1	<b>25</b>	<1	<b>2 or 1/2</b>	1,9
<b>6</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	1,7	<b>26</b>	0	<b>1 or 14</b>	<1
<b>7</b>	<b>7.2</b>	<b>17</b>	<1	<b>27</b>	<1	Non typable	8.3
<b>8</b>	<b>3.8</b>	<b>18</b>	<1	<b>28</b>	<1	Pas du <i>S. suis</i>	7.2
<b>9</b>	<b>4.6</b>	<b>19</b>	<1	<b>29</b>	1		

### Répartition géographique des sérotypes de *S. suis* affectant le porc

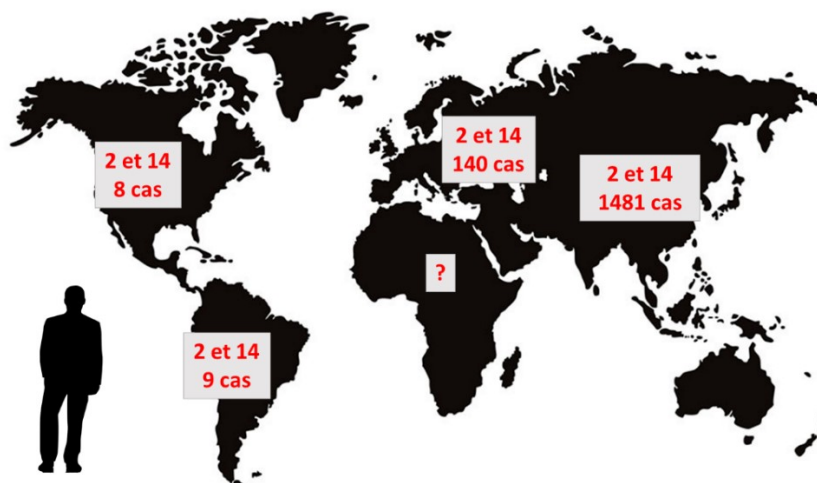
Bien que le sérotype 2 soit considéré comme le plus virulent, tel que mentionné précédemment, ce n'est pas le seul sérotype responsable des pertes économiques majeures dans l'industrie porcine. Globalement, les sérotypes prédominants ayant été isolés de cas cliniques sont, dans l'ordre décroissant, les sérotypes 2, 9, 3, 1/2 et 7 (16). En effet, d'autres sérotypes peuvent également être responsables de problèmes cliniques et leur importance varie géographiquement (**Figure 1**). Au Canada par exemple, tel qu'il a été présenté dans le **Tableau 1**, le sérotype 2 est responsable de cas cliniques à hauteur égale avec le sérotype 1/2. Aux Etats-Unis le sérotype 3 est particulièrement présent tandis qu'en Europe, c'est le sérotype 9 (16). En Asie, où la majorité des cas humains ont été reportés, les sérotypes fréquemment isolés sont, dans l'ordre décroissant, les sérotypes 2, 3, 4, 7 et 8 (16). Certains pays manquent cependant de données quant à la distribution des sérotypes dans leur pays comme c'est le cas pour l'Amérique du Sud ou l'Afrique ce qui peut biaiser les estimations. Ce manque d'informations complètes compromet les chances d'élaborer des stratégies de prévention comme les vaccins. Dans le cadre de ce projet de maîtrise réalisé sur une ferme d'Ontario (Canada), les sérotypes isolés de cas cliniques ont été les sérotypes 7 et 9.



**Figure 1.** Distribution mondiale des sérotypes de *S. suis* les plus fréquemment isolés de porcs malades de janvier 2002 à décembre 2013 (16) [© Lorelei Corsaut].

### Répartition géographique des sérotypes de *S. suis* affectant l'Homme

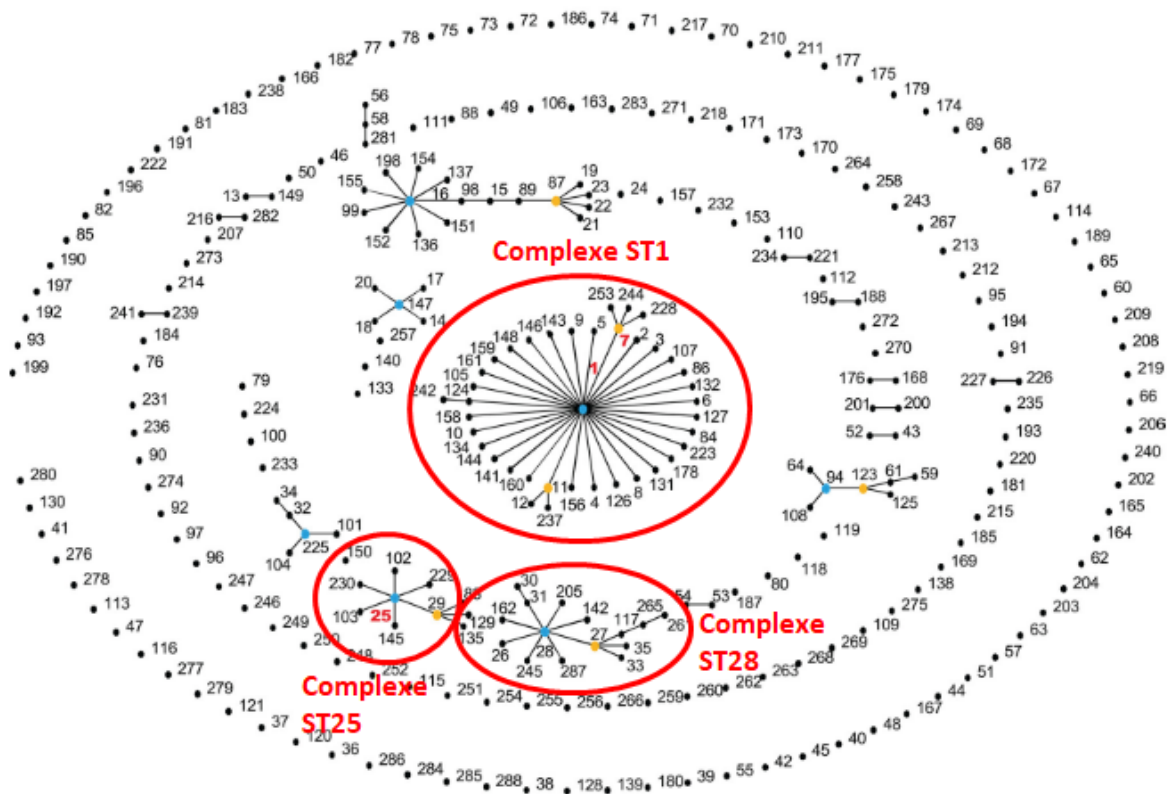
Comme l'illustre la **Figure 2**, la plupart des infections de zoonose à *S. suis* dans le monde ont été attribuées au sérotype 2 (62% des cas mondiaux), et au sérotype 14 (4% des cas mondiaux), dans de plus rares cas les sérotypes 4, 16, 24, 5 ou encore le sérotype 1 ont été retrouvés (2, 16). Enfin, dans certains cas d'infections causées par *S. suis*, le sérotype associé n'a pas pu être identifié. Il est important de remarquer que la majorité des cas cliniques humains ont été reportés en Asie, étant pour certains associés aux épidémies de 1998 et 2005, mais dans la majorité des cas, ils sont retrouvés au Vietnam et en Thaïlande (16).



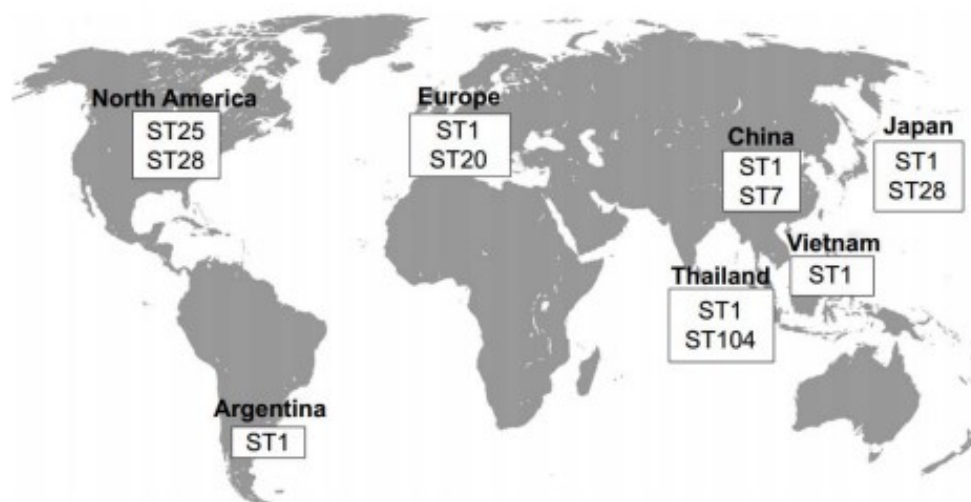
**Figure 2.** Distribution mondiale des sérotypes de *S. suis* les plus fréquemment isolés de zoonoses jusqu'à décembre 2013 (16) [© Lorelei Corsaut].

### 1.1.1.2 'Sequence type'

Des différences génétiques et phénotypiques peuvent également se dégager au sein même d'un sérotype, ce qui pourrait être aussi lié au potentiel de virulence d'une souche donnée. Ainsi, il existe une classification basée sur l'analyse de séquences de type multilocus (MLST : « multilocus sequence typing ») qui compare les gènes de ménages entre souches. Ces gènes contrôlent les fonctions cellulaires et leur similarité génétique entre souches va permettre de les répertorier en « sequence types » (ST). La MLST à l'avantage d'utiliser une technique identique et reproductible entre les différents laboratoires pour différencier efficacement les souches mais également pour pouvoir comparer les souches entre laboratoires étant donné que les séquences sont publiques et visibles via la banque de données internationales (ssuis.mlst.net). Contrairement au sérotypage, il n'y a pas de réactions croisées car les gènes de ménages sont très conservés et donc propres à chaque souche, cela évite les potentielles erreurs d'identification. Les sept gènes de ménage « housekeeping genes » utilisés et analysés pour établir cette classification ont été choisis pour leur habilité à pouvoir distinguer un grand nombre de génotypes tout en étant très conservés. Basés sur cette classification, il est possible de distinguer les STs de différents sérotypes (18). En octobre 2016, plus de 704 STs ont été identifiés chez *S. suis* (5). En ce qui concerne le sérotype 2, pour lequel les STs ont été le plus étudiés parmi ceux de *S. suis*, il n'existe pas moins de 288 STs (19). Les STs peuvent être regroupés en complexes clonaux (4, 19). Les complexes clonaux sont constitués de ST partageant 6 allèles sur 7 avec au moins un autre ST (20). Les complexes clonaux sont nommés d'après le ST qui a le plus grand nombre de variants à un seul locus (20). Parmi ces complexes, trois dominent : le complexe ST1, le complexe ST25 et le complexe ST28 (**Figure 3**) (18, 19). Les souches du complexe ST1 sont considérées comme étant les plus virulentes et représentent la majorité des isolats de cas de méningites, septicémies et arthrites chez des cas cliniques porcins et humains (**Figure 4**) (4, 16, 21). Parmi elles, au moins 165 souches ont été isolées provenant de six pays différents (18). Plusieurs STs du sérotype 2 ont été impliqués dans des cas cliniques humains tels que le ST25, le ST1 et le ST28 (**Figure 5**) (5, 19, 21).

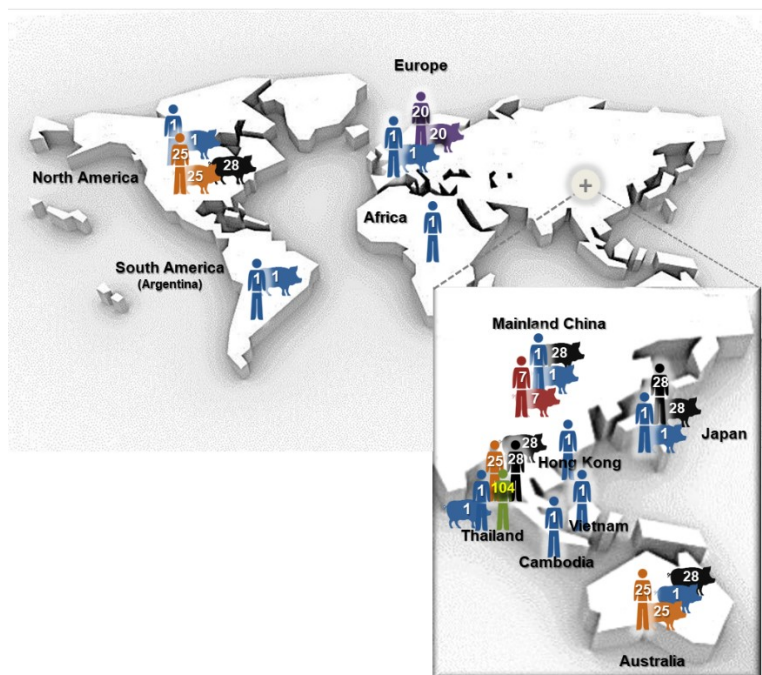


**Figure 3.** Les ST du sérotype 2 de *S. suis* et ses 3 principaux complexes clonaux (en rouge). Le complexe ST1 est considéré comme le plus virulent, la majorité des cas cliniques sont causés par des souches au sein de ce dernier (19) [avec permission].



**Figure 4.** Distribution mondiale des ST du sérotype 2 de *S. suis* les plus souvent isolés de cas cliniques chez le porc de janvier 2002 à décembre 2013 (4) [avec permission].





**Figure 5.** Distribution mondiale des ST du sérotype 2 de *S. suis* isolés de cas d'infection chez l'Homme jusqu'en 2017 (5) [avec permission].

## 1.2 Aspects épidémiologiques

### 1.2.1 Transmission

#### La transmission chez le porc

*S. suis* est présent naturellement chez le porc. Ce commensal occupe les voies respiratoires supérieures et se retrouve fréquemment au niveau des amygdales et des cavités nasales (22). Mais on peut également le retrouver au niveau des voies digestives étant capable de coloniser le système gastro-intestinal (5, 23, 24). De nombreux sérotypes de *S. suis* peuvent ainsi être présents chez le porc pendant de longues périodes de temps sans causer de maladie. Enfin, *S. suis* peut également se retrouver au niveau de l'appareil urogénital impliquant une transmission verticale des truies aux porcelets (25). De manière générale, la contamination se fait à tout âge mais les porcelets sont contaminés dès la naissance, à ce moment précis les porcelets entrent en contact avec la microflore bactérienne de la mère par contact avec les sécrétions vaginales contaminées, la transmission se fait alors de manière verticale (25). Toutefois, à la naissance les porcelets, bien que contaminés peuvent se défendre contre les souches pathogènes grâce à l'acquisition de l'immunité maternelle.

Cette immunité est cependant éphémère et les porcelets s'en retrouvent dépourvus à la période du sevrage. C'est donc au post-sevrage, entre 3 et 10 semaines d'âge, que les porcelets développent le plus souvent la maladie, bien que certains cas puissent également survenir durant la période de lactation. La fenêtre de sevrage représente la période à laquelle l'immunité maternelle décline, le système immunitaire du porcelet change alors. De plus, cette période représente un stress considérable causé par plusieurs facteurs comme la séparation des porcelets et de leur mère ou le transport vers d'autres sites appelés « pouponnières ». Cette partie est décrite plus en détail dans le **point 3.4 de la revue de littérature**. D'autres facteurs de risque peuvent occasionner ces infections mais ces facteurs favorisent une transmission horizontale par contact avec des porcs malades ou un environnement contaminé. En effet, la présence d'aérosols contenant du *S. suis* est une source de contamination non négligeable (22) et des sérotypes virulents ont d'ailleurs déjà été retrouvés dans ces aérosols (26, 27). La présence de vecteurs peut également causer des infections, par exemple les mouches de porcheries peuvent en être la cause (28). La présence d'autres pathogènes, tel que le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP), peuvent également compliquer les infections à *S. suis*. En effet, ces derniers peuvent fragiliser le système immunitaire, permettant à *S. suis* de causer plus facilement une infection faisant de lui un pathogène respiratoire opportuniste (29).

Les premiers signes observés à la suite d'une infection sont l'augmentation de la température corporelle (hyperthermie) et une rougeur au niveau des muqueuses (30). Lorsque *S. suis* atteint le système sanguin, il commence sa propagation dans le corps jusqu'aux organes, des signes cliniques d'infection systémique apparaissent témoignant des affections : septicémie, arthrites, endocardites, méningites, mort subite (21).

### **La transmission à l'Homme**

*S. suis* peut être transmis du porc à l'homme par contact avec des animaux malades ou de la viande de porc contaminée (31). Le premier cas a été décrit au Danemark en 1968 et depuis plus de 1600 cas d'infections ont été reportés jusqu'en 2014 (16, 32). Ces cas ont été reportés dans divers pays : la plupart des pays d'Europe de l'ouest (les Pays-Bas, l'Italie, l'Espagne, le Royaume-Uni, la Belgique, la Croatie, l'Autriche, la Nouvelle Zélande, la Suède, l'Allemagne, l'Irlande, la Hongrie, la France, la Grèce), mais aussi dans d'autres pays comme le Canada, les États-Unis,

l’Australie, l’Inde, le Chili, et l’Argentine. Le nombre de cas dans les pays d’Occident est toujours faible ; cependant, la situation est plus sérieuse dans plusieurs pays d’Asie de l’est et du sud-est (Hong Kong, Singapore, la Taïwan, le Japon, la Chine et la Thaïlande) (2, 5). La vision de la menace de *S. suis* sur la santé publique a pris une toute autre tournure à la suite des épidémies qui ont eu lieu en Asie en 1998 et 2005. Depuis ces dates, les cas humains d’infections n’ont fait qu’augmenter dans ces pays. Aujourd’hui, *S. suis* est la première cause de méningite chez les adultes au Vietnam, la seconde en Thaïlande et la troisième à Hong Kong ce qui en fait un pathogène des plus préoccupants (16). Les cas de méningites humaines, plus importants dans les pays d’Asie, s’expliquent entre autre par une culture dans laquelle il est courant de manger de la viande crue ou encore par la pratique de l’abattage de porc à domicile manquant de précautions d’hygiène (16). De manière plus générale les personnes travaillant avec les porcs ou avec de la viande de porc sont les plus à risque de développer une infection à *S. suis*. En Amérique du Nord, comprenant les États-Unis et le Canada, jusqu’en 2017 seuls 8 cas sporadiques ont été relevés sans mortalité associée alors qu’ils forment ensemble le second plus gros producteur de porcs au monde (33). La différence du nombre de cas, surtout en comparaison avec l’Europe, pourrait s’expliquer par la virulence des souches qui varie d’un pays à l’autre, comme décrits précédemment car les souches de *S. suis* n’ont pas toutes le même niveau de virulence et ne sont pas toutes autant dangereuses pour l’Homme. Il semblerait que les souches présentes en Amérique du Nord soient moins virulentes que celles présentes en Europe (16). Tel que décrits précédemment, les STs n’ont pas tous le même niveau de virulence et varient entre pays. Les cas humains en Europe ont été causés surtout par des souches ST1 (tout comme en Asie, où le ST7 est aussi présent) tandis qu’en Amérique du Nord ils ont été causés par les ST25 principalement (notamment au Canada). Ce dernier ST n’exprime pas certains marqueurs de virulence présents chez les souches ST1, ce qui pourrait expliquer leur niveau de virulence plus faible (34, 35).

Les premières descriptions d’infection de cas humains suggèreraient une infection via la voie épidermique : *S. suis* serait capable de s’introduire dans l’organisme par des lésions cutanées ; cependant, les études montrent que cette source d’infection se retrouve chez seulement 20% des patients, suggérant d’autres voies d’infection (36). La voie respiratoire peut être impliquée mais les cas de pneumonies humaines causés par *S. suis* restent rares et peu décrits (37). Il est maintenant décrit que dans les pays d’Asie du sud-est, la principale cause d’infection se fait par voie gastrointestinale et majoritairement par l’ingestion de viande de porc crue ou mal cuite (22, 38).

Les symptômes de l'infection chez l'Homme peuvent se manifester par de la fièvre, des malaises, des nausées, des vomissements, de la diarrhée suivis de symptômes nerveux, une hémorragie sous-cutanée et dans de plus sévères cas des septicémies, des méningites, des comas voire des chocs septiques. Ces symptômes ont été reportés lors des épidémies qui ont eu lieu en Chine en 1998 et en 2005 (2). Aucune infection d'humain à humain n'a cependant été reportée jusqu'à ce jour (21). L'état de santé initial de la personne infectée peut également influencer le risque de développement de la maladie. Parmi les conditions favorisant le risque, on compte le diabète, l'alcoolisme, le cancer, les maladies cardiaques, les maladies immunodéficientes, l'immunodépression ou autres conditions fragilisant l'état de santé général (39, 40).

### 1.2.2 Pathogénèse

*S. suis* possède un arsenal de facteurs qui pourraient lui permettre d'envahir son hôte et d'échapper au système immunitaire. Malgré le fait que de nombreuses études se soient penchées sur ces facteurs, ils restent encore peu connus et leur implication est encore sujet à un important travail de recherche, tout comme c'est le cas pour les mécanismes impliqués dans la pathogénèse de manière générale (21). Les voies respiratoires supérieures sont la principale voie d'entrée du pathogène chez le porc, bien qu'il se retrouve ensuite également présent au niveau du tractus intestinal et génital (22). *S. suis* est capable de rester longtemps logé dans les amygdales avant d'induire une infection. En se logeant au niveau des cryptes des amygdales palatines, *S. suis* échappe ainsi à la première barrière de défense immunitaire constituée des muqueuses. Il parvient ensuite à traverser les cellules épithéliales pour atteindre la circulation sanguine et se disséminer dans le sang, créant une infection systémique. La pathogénèse de l'infection a surtout été étudié chez le sérotype 2 étant le sérotype le plus souvent rencontré lors d'infections (41).

Sans pour autant dresser une liste exhaustive de tous les facteurs de virulence de *S. suis*, le portrait qui suit dresse les principaux facteurs impliqués dans la pathogénèse qui ont été étudiés dans la littérature bien que ce sujet soit encore peu connu (5).

### **Phase de colonisation**

Les mécanismes d'infection par les voies respiratoires ont été peu étudiés. Lorsque *S. suis* se cache au niveau des cryptes des amygdales, il peut avoir directement accès aux tissus lymphoïdes (42). Plusieurs adhésines ont été identifiées comme étant impliquées dans l'adhérence aux cellules épithéliales, aux composants de la matrice extracellulaire ou à d'autres composants de l'hôte. Les adhésines feraient partie de la paroi cellulaire et seraient partiellement masquées par la CPS suggérant que *S. suis* est capable de réguler l'épaisseur de sa CPS en réponse à des signaux environnementaux pour permettre d'optimiser l'expression de ses adhésines (41). Ce mécanisme est toutefois encore controversé. Aussi, il a pu être mis en évidence que le recrutement du facteur H permettrait d'améliorer l'adhérence de *S. suis* aux cellules épithéliales et endothéliales de l'hôte (43).

Les porcs sont capables de vivre de manière asymptomatique avec *S. suis*, étant une bactérie commensale, faisant naturellement partie de leur microbiote. Pour que la pathologie se développe *S. suis* doit être capable de traverser la barrière épithéliale pour se disséminer dans le sang et induire une infection se manifestant par une septicémie, de l'arthrite ou encore une méningite. L'un des facteurs décrit comme étant principalement impliqués dans la traversée de la barrière épithéliale est la suilysine, une hémolyse à activité cytotoxique qui serait capable de détruire les jonctions cellulaires pour atteindre la matrice extracellulaire (22). Cependant certaines souches n'expriment pas cette toxine sont tout de même capables de se disséminer dans le sang par des mécanismes qui restent encore méconnus (25). Une étude sur 10 souches du sérotype 2 a toutefois mis en évidence que *S. suis* serait capable d'envahir les cellules épithéliales par endocytose démontrant bien que les facteurs exprimés lors de l'invasion de *S. suis* dépendent des variations au niveau de l'expression génétique (44).

### **Phase systémique**

Une fois la barrière épithéliale traversée, *S. suis* est capable de survivre à haute concentration dans la circulation sanguine et d'échapper au système immunitaire grâce, entre autres, à la résistance à la phagocytose par les cellules du système immunitaire inné (45). En effet, comme de nombreuses bactéries encapsulées, des anticorps spécifiques (contre la CPS ou autres composantes de surface) et opsonisants sont nécessaires pour permettre la phagocytose de la

bactérie ; mais ces anticorps ne sont que peu produits (46). Ainsi, la CPS intervient à plusieurs niveaux dans la pathogénèse : elle possède un rôle de bouclier face à l'effet bactéricide des neutrophiles et monocytes/macrophages (47). Grâce à cela *S. suis* parvient à échapper à la phagocytose, cette constatation a été faite autant lors d'expériences réalisées chez la souris que chez le porc (48, 49). De nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo* ont démontré que des mutants non-encapsulés n'échappaient pas à la phagocytose et étaient rapidement éliminés de la circulation sanguine comparativement aux souches sauvages encapsulées (48, 50, 51). La CPS permettrait également d'interférer dans l'action du complément, montrant son implication dans la résistance à la phagocytose dépendante du complément par les cellules dendritiques (49). De plus, il semblerait selon certaines études que la CPS purifiée seule serait capable d'inhiber la phagocytose en déstabilisant les microdomaines lipidiques présents à la surface des cellules et empêchant ainsi l'internalisation via les radeaux lipidiques (51). L'acide sialique, présent dans la structure de la CPS jouerait également un rôle dans la pathogénèse, elle modulerait l'attachement aux cellules phagocytaires (41, 52). En plus de son implication dans la phase de colonisation, la suilysine, comme la CPS, interfèrerait également dans l'action du complément mais serait également toxique pour les phagocytes.

À forte concentration dans le sang, *S. suis* est capable d'induire la mort subite par choc septique, étant la conséquence d'une réponse immunitaire excessive. Les études chez la souris révèlent une forte production de médiateurs de l'inflammation en parallèle d'une forte bactériémie lors de la phase systémique, avec des niveaux élevés de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  et de chimiokines CCL2, CXCL1 et CCL5 dans le sang (53).

Si le choc septique n'a pas lieu, *S. suis* continue de se disséminer et provoque des arthrites au niveau des articulations. Lorsque la bactérie se rend jusqu'aux organes, elle induit d'autres pathologies qui résultent en un dysfonctionnement tel que l'endocardite ; en tant qu'agent secondaire *S. suis* peut également induire des pneumonies. Si la bactérie parvient à se rendre jusqu'au système nerveux central (SNC) elles provoquent alors une méningite. Peu importe la destination finale et la pathologie, l'inflammation au niveau de ces sites joue un rôle déterminant.

## Phase cérébrale

La barrière hématoencéphalique, constituée de cellules endothéliales microvasculaires (BMECs), ainsi que la barrière séparant le sang du liquide céphalo-rachidien (CSF) ou barrière hémato-CSF, constituée des cellules épithéliales du plexus choroïdien (CEPC) sont les principales portes d'entrée de *S. suis* dans le SNC. La barrière hématoencéphalique est la seule barrière anatomique et fonctionnelle séparant le cerveau du compartiment intravasculaire, elle maintient l'homéostasie de l'environnement du SNC. Cependant les mécanismes par lesquels *S. suis* parvient à traverser ces barrières restent incertains. Une étude a montré l'implication de *S. suis* dans l'adhésion des BMECs et de leurs dommages provoqués par l'activité cytotoxique de la suilysine (54). Comme il a été décrit pour les cellules épithéliales, la CPS serait également impliquée dans la modulation de l'invasion des BMECs (41). En ce qui concerne la traversée de la barrière hémato-CSF, une étude *in vitro* a révélé que *S. suis* était capable d'envahir les CEPCs du côté basolatéral de la membrane, de se faire transporter par endocytose dans des vacuoles jusqu'au côté apical, suivi de l'exocytose du côté apical de la membrane qui compose la barrière (55). Finalement il semblerait que *S. suis* puisse induire une nécrose des CEPCs (41). Lorsque *S. suis* parvient à traverser ces barrières, cela déclenche une forte réponse inflammatoire qui entraîne la mort des cellules neuronales et conséquemment la méningite (41, 53).

### 1.2.3 Signes cliniques

Lorsque *S. suis* provoque une infection chez son hôte, il induit des signes cliniques permettant de détecter que l'animal a été infecté. Ces signes cliniques avertissent d'une infection systémique et se manifestent de plusieurs façons. La plupart des animaux présentent des signes cliniques entre 3 et 24 semaines d'âge avec un pic entre 5 et 12 semaines d'âge (30, 56, 57). *S. suis* peut causer un grand nombre d'infections chez le porc, tel que des arthrites, des méningites, des pneumonies, des endocardites, et dans certains cas provoquer la mort subite de l'animal (58, 59). Un des premiers signes observés chez les animaux malades est une hyperthermie qui sera dans la plupart des cas accompagnée d'une importante perte de poids et de signes de dépression (22). *S. suis* peut également être retrouvé dans la circulation sanguine où il pourra causer une importante septicémie, pouvant perdurer quelques semaines si les animaux infectés ne sont pas traités (22). Différents signes cliniques neurologiques peuvent être observés chez les animaux atteints de

méningites, parmi lesquels il est possible de retrouver de l'ataxie, de l'opisthotonos, des convulsions et du nystagmus. Pour leur part, les animaux atteints d'autres affections, tels que des endocardites ou des pneumonies, présenteront plutôt des signes de dyspnée respiratoire, de cyanose et de dépression (22). Les lésions observées dans des animaux atteints d'une infection par *S. suis* se caractérisent majoritairement par des infiltrations neutrophiliques qui peuvent être accompagnées ou non de dépôts de fibrines, d'œdème et de congestion (22).

#### 1.2.4 Traitements antimicrobiens

Les traitements utilisés pour contrôler les infections à *S. suis* relèvent principalement de l'utilisation d'antibiotiques. L'utilisation d'antibiotiques peut se faire en traitement curatif. Toutefois, dans certains cas ils sont utilisés de manière prophylactique, c'est-à-dire en prévention de la maladie. La problématique associée à cette stratégie de traitement est la contribution à l'émergence de la résistance, comme c'est le cas en Thaïlande (60). La majorité des souches de *S. suis* semblent être sensibles aux  $\beta$ -lactamines (comme la pénicilline ou l'amoxicilline). Toutefois une résistance à certains antibiotiques tels que la tétracycline, l'érythromycine ou le chloramphénicol est souvent rapportée (56). Certaines souches sont maintenant des réservoirs de gènes de résistance et sont dangereuses puisqu'elles sont capables de transmettre ces gènes, par transfert horizontal, à d'autres streptocoques qui affectent les animaux et même les humains (60, 61). Les antibiotiques sont majoritairement administrés directement dans la nourriture ou la boisson des animaux lorsque le traitement est préventif, voire dans de plus rares cas par voie intranasale (57). Lorsque le traitement est curatif, ils sont administrés par voie intramusculaire.

Plusieurs antimicrobiens ont été testés pour éliminer les souches virulentes. Une étude faite sur l'efficacité de différents antibiotiques à éliminer les souches virulentes à leur stade de colonisation et d'invasion des muqueuses au niveau des amygdales a démontré leur inefficacité (57). Mais cela peut s'expliquer par la diversité des souches ayant une sensibilité variable. Une étude a ainsi pu constater une sensibilité différente à la pénicilline de trois isolats provenant de trois porcelets différents (sains et malades) (62). Récemment, une étude intéressante proposait que certains antibiotiques seraient capables de renforcer la formation de biofilm de *S. suis* ce qui témoigne du risque de persistance et de survie des souches virulentes au niveau du tractus respiratoire des animaux (63). De plus, de nouvelles normes entrent en vigueur quant à la diminution de l'utilisation



prophylactique des antibiotiques. En particulier au Québec, l'Equipe Québécoise de Santé Porcine cible une réduction de l'utilisation des antibiotiques dans le secteur porcin (64). *S. suis* est justement vu comme un agent émergent résultant de la diminution de l'usage des antibiotiques.

Dans le but de réduire l'utilisation des antibiotiques pour limiter les antibiorésistances, il est important de trouver des alternatives thérapeutiques. Les vaccins sont encore au stade expérimental et aucun vaccin commercial contre *S. suis* n'est disponible au Canada. Les vaccins les plus utilisés sont ceux à base de bactérines composés de bactéries tuées, ce point sera décrit plus en détail dans la **section 3**.

## **2 Réponses immunitaires contre les infections**

Les réponses immunitaires correspondent aux mécanismes de défense de l'organisme face à la reconnaissance d'un corps étranger. Ces réponses se mettent en place à la suite de la reconnaissance d'un antigène qui peut être exprimé lors d'une infection ou d'une immunisation. En effet, elles sont souvent associées à la reconnaissance de pathogènes qui peuvent être des virus, des bactéries ou des parasites. Aussi, la réponse immunitaire intervient de manière essentielle lors de l'administration d'un vaccin qui peut être basé sur la reconnaissance d'antigène et la mise en place d'une réponse mémoire. Cependant elles peuvent aussi être causées par d'autres facteurs, par exemple, par la présence de cellules tumorales, de greffes ou par des maladies auto-immunes.

### **2.1 La réponse immunitaire innée**

Cette réponse est la première défense du système immunitaire, elle est immédiate, non spécifique à l'antigène et de courte durée. Elle fait intervenir plusieurs constituants. Les premières lignes de défense sont les barrières épithéliales et mucosales. Si le corps étranger parvient à traverser ces barrières, d'autres acteurs interviennent, responsables de la réponse innée qui comprend la réponse inflammatoire ou la phagocytose, par exemple (65). Ces acteurs peuvent être des anticorps polyréactifs (majoritairement des IgM), le système du complément ou les cellules phagocytaires et lymphocytaires spécialisées. Les cytokines vont permettre la communication entre ces cellules (65).

La réponse immunitaire est induite à la suite d'une interaction spécifique entre les récepteurs des cellules immunitaires, tels les « PRR » (« Pattern Recognition Receptors ») et les molécules du

non-soi « PAMP » (« Pathogen-Associated Molecular Patterns »). Les PAMPs sont présents chez les microorganismes qu'ils soient pathogènes ou non tandis que les PRRs sont exprimés dans plusieurs types de cellules immunitaires : les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les cellules NK (« natural killer »), les cellules polynucléaires (ou granulocytes), et les cellules résidentes (fibroblastes, cellules musculaires, cellules épithéliales, par exemple) (65).

Lorsqu'un corps étranger d'échelle micrométrique est présent dans l'organisme (agent pathogène, débris cellulaires, etc.) une première réaction de défense est mise en place par le système immunitaire. Des cellules sentinelles résidentes ou recrutées au site de l'inflammation éliminent ces corps en les internalisant, par endocytose/phagocytose. Les cellules responsables de la phagocytose sont localisées plus souvent au niveau des tissus conjonctifs et du sang et expriment le PRR (65).

Ces cellules peuvent être de deux sortes :

- Les neutrophiles faisant partis de la famille des polymorphonucléaires (composée de cellules polymorphonucléaires (PMNs), aussi appelés granulocytes) sont considérés comme des cellules phagocytaires professionnelles. Ils ont un noyau polylobé et sont remplis de granules. Les éosinophiles et les basophiles font aussi partie de la famille de PMNs mais ne sont pas considérés comme des cellules phagocytaires professionnelles.
- Les cellules mononucléaires comprennent les cellules dendritiques ainsi que les monocytes qui vont devenir des macrophages après maturation. Ces cellules sont aussi capables de présenter l'antigène à la suite de la phagocytose après un traitement appelé également « processing ». Elles sont appelées cellules présentatrices d'antigène (CPA) et vont initier la réponse immunitaire adaptative (65).

## **2.2 La réponse immunitaire adaptative**

La réponse immunitaire adaptative est induite et spécifique à l'antigène. Elle se met en place plus tardivement et fait largement intervenir les lymphocytes. Cette réponse génère la mémoire immunologique, de ce fait la réponse est plus rapide au deuxième contact avec l'antigène.

Les CPA vont présenter l'antigène aux lymphocytes T (LT) dans le but d'activer leurs fonctions. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> aussi appelés lymphocytes T 'helpers' (LTh) vont participer à l'activation

des lymphocytes T CD8+ aussi appelés lymphocytes T cytotoxiques et à celle des lymphocytes B (LB).

Les LT sont responsables de l'immunité cellulaire et les LB de l'immunité humorale. En effet, l'activation des LB va permettre la production d'anticorps spécifiques à l'antigène qui vont permettre une élimination plus efficace du pathogène.

### **Les complexes majeurs d'histocompatibilité**

Les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) sont essentiels à la présentation d'antigène puisqu'ils vont permettre l'activation des lymphocytes (65). Les CMH sont des molécules du « soi » et sont propres à chaque individu. Il existe 2 classes de CMH :

- Le CMH de classe I est exprimé à la surface de toutes les cellules nucléées. Le CMH-I va présenter les antigènes endogènes, notamment dans le cas de pathogènes intracellulaires, et il sera ensuite reconnu par les LT CD8+ qui vont éliminer les cellules infectées.
- Le CMH de classe II est exprimé principalement à la surface des cellules du système immunitaire et notamment des CPAs (cellules dendritiques, macrophages, LB). Le CMH-II va présenter les antigènes exogènes à la suite de l'assimilation (phagocytose par exemple) puis du traitement (« processing ») par les CPAs, il sera ensuite reconnu par les LT CD4+ (65).

Ces CMH sont reconnus par les récepteurs des LT ou « T cell receptor » (TCR). Ces récepteurs ne sont capables de reconnaître qu'un seul ligand, en effet, un lymphocyte ne peut répondre qu'à un seul « épitope » dérivé de l'antigène. Pour cette raison, les LT nécessitent d'être activés par des CPAs; déterminant la mise en place de la réponse immunitaire adaptative au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Cette activation entraîne la différenciation des lymphocytes matures naïfs en lymphocytes matures activés donnant lieu à des LT cytotoxiques (CD8+), des LTh, mais aussi des cellules mémoires.

## Les lymphocytes T

Il existe 2 types de LT :

- Les LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires (ou « helper ») : ces derniers sont activés par le CMH-II des CPA tels que décrit précédemment. Le devenir des LT CD4<sup>+</sup> varie en fonction des cytokines produites par la CPA qui l'a activé. Si la CPA produit plus d'IL-12, la différenciation des LT sera orientée vers une réponse immunitaire de type 1 : les LT se différencieront en LTh de type 1 (LTh1). Si la CPA produit plus d'IL-4, la différenciation sera dirigée vers une réponse de type 2 produisant des LTh de type 2 (LTh2). Ces sous-types de LTh1 et LTh2 influenceront le développement de la réponse immunitaire de type 1 et 2, respectivement, et donc les isotypes des anticorps produits par les LB (décrit plus bas). En effet, Les LTh sécrètent des cytokines de type 1 (LTh1) tels que l'IL-2 (interleukine) et l'IFN- $\gamma$  (interféron) ou de type 2 (LTh2) tels l'IL-4, l'IL-6 ou l'IL-13 qui influenceront la commutation de classe des anticorps produits par les LB. En effet, les LT CD4<sup>+</sup> sont responsable de l'activation des LB au travers de la voie thymo-dépendante (voir ci-après).
  - Les LTh1 stimulent la phagocytose et la destruction du pathogène dans le phagolysosome car l'IFN- $\gamma$  produit par ces cellules est un puissant activateur de macrophages et cellules dendritiques. Cette cytokine libérée en même temps que l'IL-2 par les LTh1 stimule également la production d'isotypes d'anticorps de type 1 (tels que les IgG2) par les LB. Les anticorps de type 1 favorisant la phagocytose des pathogènes puisque ces anticorps se lient directement aux récepteurs Fc des phagocytes et activent le complément par la voie classique. Les LTh1 sont donc efficaces autant contre les pathogènes intracellulaires qu'extracellulaires (66). Ces LTh1 sont connus pour induire une plus grande protection contre *S. suis*.
  - Les LTh2 impliqués dans la réponse immunitaire de type 2 possèdent des mécanismes moins connus que ceux décrit pour la réponse de type 1. Les cytokines sécrétées par ces cellules influencent l'activation des LB ainsi que la commutation isotypique des anticorps de type 2 (tels que les IgG1) (66). Ces anticorps jouent un rôle dans la réponse immunitaire des muqueuses ainsi que dans les allergies et sont

donc moins protecteurs contre une bactérie extracellulaire et encapsulée comme *S. suis*.

- Les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques : ces derniers sont activés par les fragments antigéniques présentés par le CMH-I des CPAs (surtout les cellules dendritiques) (66). Une fois activés, suivront une expansion clonale et migration vers les sites d'infection où ils pourront éliminer les cellules infectées grâce à la libération du contenu des granules cytotoxiques. Cette réponse est principalement, mais non-exclusivement, impliquée dans le contrôle des infections virales.

### **Les lymphocytes B**

Les LB expriment à leur surface des anticorps membranaires appelés immunoglobulines (Ig) faisant partie du récepteur du LB, ce sont les récepteurs des cellules B (BCR) et capable de reconnaître un antigène spécifique. Lorsque les BCRs du LB reconnaissent un antigène pour la première fois, cela entraîne une division rapide du LB permettant l'obtention de LB matures appelés plasmocytes ou de LB mémoires. Les plasmocytes sont des cellules capables de sécréter une grande quantité d'anticorps (66). Suite à cette activation, les plasmocytes secrèteront une grande quantité d'IgM mais ces derniers ont une basse affinité pour l'antigène. L'augmentation de l'affinité avec l'antigène se fait au travers d'hypermutations somatiques dans le centre germinatif durant la maturation (voir ci-après) (66).

Selon l'implication des LT, l'activation des LB se fait par deux voies différentes : la voie thymo-dépendante (TD) et la voie thymo-indépendante (TI). L'activation par la voie TD est la plus couramment empruntée. Cette dernière nécessite un contact direct avec les LTh tandis que ce contact direct n'est pas nécessaire pour la voie TI (65).

### **L'activation par la voie thymo-dépendante**

Les antigènes de nature protéinique sont reconnus par les LB et LT dans les organes lymphoïdes secondaires. Le complexe antigène-BCR obtenu après reconnaissance par le LB est ensuite endocyté puis dégradé pour exprimer les fragments peptidiques antigéniques au niveau du CMH-II faisant du LB une CPA. Le LB présente ensuite son complexe CMH-II/peptide aux LTh

(préalablement activés par une CPA) entraînant son activation ainsi que la mise en place de la réponse immunitaire humorale (65). La première réponse anticorps des LB est une réponse extra-folliculaire donnant lieu à la production d'anticorps de faible affinité mais capables de limiter l'infection le temps que se met en place une réponse anticorps plus spécifique et de plus longue durée (65). Cette seconde étape a lieu dans le centre germinatif et permet la sélection génétique de LB ayant une plus grande affinité avec l'antigène au travers de processus caractéristiques de la voie TD qui incluent la maturation d'affinité, la commutation de classe et la mise en place d'une réponse mémoire spécifique. Le centre germinatif se met en place au bout de 4 à 7 jours après le début de l'activation TD des LB.

Les LB prolifèrent dans la zone sombre du centre germinatif. Durant cette prolifération, les cellules subissent des hypermutations somatiques au niveau de leur récepteurs membranaires (ou Ig) avant de migrer vers la zone claire. Des cellules dendritiques et des LT sont présents dans la zone claire pour sélectionner les LB avec la plus grande affinité avec l'antigène. Ces dernières seront les seules à survivre durant ce processus et deviendront des plasmocytes ou des LB mémoires (65).

La commutation de classe a lieu lors de la présentation de l'antigène aux LB par les LTh, qui, tel que décrit précédemment peuvent être de type 1 (LTh1) ou de type 2 (LTh2) (66). La nature du LTh va influencer les sous-classes d'Ig produit durant la commutation de classe. Dépendamment des sous classes d'Ig produits, l'effet sur le pathogène peut être variable. Cette différenciation se fait en fonction des cytokines sécrétées. En effet, les LTh1 secrèteront préférentiellement de l'IL-2 et du IFN- $\gamma$  menant à la différenciation des IgM en IgG2, connus pour être plus opsonisants. A l'inverse, les LTh2 secrèteront préférentiellement de l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-13 menant à la différenciation des IgM en IgG1, qui serait moins protecteurs dans le contexte de notre pathogène à l'étude (4).

### **L'activation par la voie thymo-indépendante**

Cette voie est moins couramment empruntée et son mécanisme est moins bien connu que la voie TD. Elle ne nécessite pas la présence des LTh pour permettre l'activation des LB, ou au moins une reconnaissance CMH-dépendante. De nombreux antigènes non protéiniques tels que des polysaccharides ou des lipides stimulent la production d'anticorps en l'absence des LTh (65). Ainsi, la reconnaissance de ce type d'antigènes (Ex. polysaccharides) se fait par le BCR, suivi

d'endocytose. Mais contrairement aux protéines, les polysaccharides ne pourront pas être traités (« processing ») et apprêtés aux molécules du CMH-II et donc l'activation conséquente des LTh ne sera pas possible. Puisque l'activation des LB n'est pas CMH-dépendante, la commutation isotypique des Ig est limitée, voire absente. Les anticorps essentiellement produits par la voie TI sont des IgM, ils sont moins spécifiques et la réponse mémoire est également absente (66). De ce fait, *S. suis* étant une bactérie encapsulée, la nature polysaccharidique de sa capsule en fait un antigène TI. L'activation optimale et la commutation de classe sont donc compromises par la présence de cette CPS et peu d'anticorps ciblant la capsule peuvent être produits (46). Or ces anticorps, fortement opsonisants si produits, sont essentiels puisque les bactéries encapsulées, tel que *S. suis*, sont résistantes à la phagocytose (52).

### 2.3 La production d'anticorps

Les LB naïfs expriment à leur surface des IgM qui, après reconnaissance avec l'antigène et maturation, seront sécrétés par les plasmocytes sous forme circulants et non plus membranaires. Les IgM peuvent ainsi se présenter sous la forme monomérique lorsqu'ils sont sous forme membranaire et sous la forme pentamérique lorsqu'ils sont circulants. Les IgM étant la première classe d'anticorps produits, ils sont moins spécifiques à l'antigène mais possèdent une forte efficacité pour activer le complément (66, 67). Leur demi-vie est également plus courte, environ 5 jours. À la suite de la commutation de classe, les LB subissent des mutations produisant des Ig plus spécifiques tels que les IgG, les IgA, les IgE et les IgD chez le porc. Les plasmocytes et les LB mémoires exprimeront ensuite principalement ces classes d'Ig.

L'IgA joue un rôle dans l'immunité des muqueuses, il est très présent dans les sécrétions (salive, mucus, larmes, colostrum, lait) et elle empêche la pénétration et la colonisation des pathogènes. Les IgE sont impliqués dans la défense contre les parasites et dans les réponses allergiques. Les IgG sont très présents dans le sérum et, selon les sous-classes (IgG1, IgG2) possèdent un atout dans la neutralisation des virus et dans l'opsonisation et la phagocytose des agents pathogènes ce qui en fait des acteurs importants dans la protection contre des bactéries extracellulaires et encapsulées, telle que *S. suis* (68). Le porc possède 6 sous-classes d'IgG allant de IgG1 à IgG6. Leur demi-vie est plus longue et estimée à environ 21 jours (66). Leur rôle chez le porc a cependant été très peu étudié par manque d'outils ; mais il s'avère que les IgG2 seraient plus opsonisants que les IgG1 et donc plus efficaces dans l'élimination des bactéries encapsulées (69).

### 3 Vaccination

L'utilisation d'un vaccin contre *S. suis* a pour objectif de trouver une méthode alternative aux antibiotiques. Cependant la recherche d'un vaccin est un défi de taille étant donné la complexité et la diversité des souches de *S. suis* (**voir le point 1.1 de la revue de littérature**). À ce jour, aucun vaccin permettant une protection croisée contre plusieurs sérotypes n'existe. Cela peut s'expliquer par le manque de connaissances sur les mécanismes et les acteurs moléculaires impliqués dans l'immuno-pathogénèse de *S. suis* tout comme la complexité de la bactérie par sa diversité génétique et phénotypique. Les vaccins majoritairement utilisés sur le terrain sont des vaccins à base de bactérines autogènes. Ces vaccins sont formulés à partir de la souche causant des problèmes cliniques dans la ferme où le vaccin est administré. Cependant, ces vaccins sont très spécifiques et ne ciblent que la(les) souche(s) responsable(s) des problèmes cliniques dans la ferme. De plus leur efficacité est controversée et les études complètes sur leur efficacité sont très rares (4). Certaines études se sont intéressées à l'utilisation de bactériocines, qui sont des peptides antimicrobiens (70) ; et d'autres à l'utilisation de prophages (71-73) comme méthodes de prévention. Au niveau des vaccins, le défi reste de trouver un vaccin qui puisse protéger contre plusieurs sérotypes. Les vaccins sous-unitaires, par exemple, ont pour but de trouver des composés structuraux communs aux différents sérotypes, telles que des protéines antigéniques, pour permettre une protection croisée. Ces vaccins sont encore au stade expérimental. De manière générale les résultats de la recherche sur les vaccins contre *S. suis* sont mitigés, ce qui peut s'expliquer par des protocoles qui diffèrent à plusieurs niveaux: le modèle animal et le nombre d'animaux soumis à l'étude, l'utilisation d'un groupe contrôle, le nombre de doses injectées et leur concentration, la voie d'administration, les adjuvants utilisés, la souche utilisée ainsi que le manque de données complètes sur la réponse immunologique induite par la vaccination (**Figure 6**) (4).

Le but ultime est de trouver un vaccin efficace, universel dans le but de protéger contre tous les sérotypes de *S. suis*, sécuritaire, non toxique et peu coûteux car il doit être rentable pour les producteurs. Malheureusement, les insuccès sont courants et les recherches sont encore loin de cette réalité (74, 75).

#### 3.1 Vaccins vivants atténués (expérimental)

Les vaccins vivants utilisent des souches atténuées (souches mutantes non virulentes) ou bien de souches naturellement non pathogènes. Ces vaccins vivants ont montré des résultats



controversés. Plusieurs mutants ont été produits, notamment des mutants non-encapsulés. Il a été prouvé que la capsule jouait un rôle majeur dans la pathogénèse de l'infection et que les mutants non-encapsulés étaient non-virulents. Après avoir constaté la faible réponse obtenue à la suite de la vaccination, ces études ont souvent suggéré la nécessité d'avoir des anticorps anti-CPS pour induire une protection plus efficace (45, 76-78). De ce fait, certaines études ont testé des vaccins composés de mutants qui exprimaient la CPS mais qui n'exprimeraient pas certains facteurs putatifs de virulence pour permettre la production d'une réponse contre la CPS tout en réduisant le pouvoir pathogène de la bactérie, offrant malheureusement des résultats mitigés (79-81).

Certaines études ont utilisé des souches naturellement avirulentes telles que la souche 05HAS68 du sérotype 2 isolé des amygdales d'un porc sain (82, 83) ou la souche 1330 du sérotype 2 isolé à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal d'un porc ayant une pneumonie (84-86). Ces souches avirulentes ont été testés chez la souris et le porc avec des résultats variables (87). D'autres études ont testé la protection croisée en utilisant des bactéries vivantes. Concernant les sérotypes 2 et 9, deux essais de vaccination ont tenté de produire des vaccins vivants qui puissent protéger contre ces deux sérotypes, toujours en utilisant une souche peu virulente, celle du sérotype 5. Selon la première étude, le sérotype 5 serait capable d'induire une protection croisée contre le sérotype 2 et 9 (88). La deuxième étude a utilisé une immunisation intranasale dans le but de protéger l'animal durant la colonisation des amygdales mais cet essai a rapporté des résultats non concluants (89). Les études sur les sérotypes 2 et 9 sont particulièrement nécessaires pour l'Europe où ces sérotypes sont fréquemment isolés de cas cliniques.

Enfin, une autre étude mentionnerait qu'un double mutant sans SspepO : « secreted *S. suis* putative endopeptidase O » et SspepC « secreted *S. suis* putative endopeptidase C », décrit dans cet article comme étant des facteurs de virulence, induirait une protection croisée contre le sérotype 7 et 2 (90). Des études intéressantes ont toutefois révélé qu'un vaccin composé de *S. suis* sérotype 1/2 est capable d'induire une protection efficace lors d'un challenge avec le sérotype 1/2, 1 et 2 ce qui permet de mettre en évidence la proximité génétique de ces souches et la protection hétérologue possible (91, 92).

Les vaccins vivants atténués sont cependant à risque pour la santé animale et humaine car ces souches pourraient être capables d'acquérir/réacquérir des gènes de virulence par transfert horizontal avec des souches pathogènes. Certaines études ont même mentionné que les souches

utilisées dans leur vaccin ont présenté des effets pathologiques, ce qui confirme le risque pour les animaux et l'Homme (93). Le défi d'utiliser des vaccins vivants réside dans le fait d'obtenir des souches complètement non-virulentes et qui soient sécuritaires tout en induisant une réponse protectrice. Or des effets secondaires ont été observés, comme une boiterie, de la fièvre, soulignant le risque d'altérer finalement la santé de l'animal en voulant le protéger. De plus, il ne faut pas négliger le risque de zoonose car une souche peut être non pathogène pour le porc mais l'être pour l'Homme (4).

### 3.2 Vaccins sous-unitaires (expérimental)

Les vaccins sous-unitaires sont composés de molécules antigéniques conservées entre les souches. Contrairement aux vaccins à base de bactérines (voir plus bas) ou vivants atténués, le fait d'être composés de molécules conservées entre les souches permettrait de conférer une protection croisée et se rapprocherait de la protection universelle visée par un vaccin contre *S. suis* (4). En effet, ils sont composés de sous-unités de la bactérie telles que la CPS, une protéine, un fragment de la paroi cellulaire et ont pour particularité d'être des éléments communs à plusieurs sérotypes. De ce fait, ces vaccins sont aussi plus sécuritaires. Les anticorps devraient être capables de reconnaître les molécules antigéniques sélectionnées, ces molécules devraient donc être accessibles et se trouver à la surface de la bactérie. Des protéines candidates ont ainsi été recherchées, utilisant par exemple des essais immunoprotéomiques, un criblage de génomique fonctionnelle ou la technologie IVIAT (« *In vivo*-Induced Antigen Technology ») (94-97). Une étude a d'ailleurs répertorié 113 protéines de surface communes à 39 souches de 19 sérotypes les plus prévalents des dernières années. Basée sur leur accessibilité aux anticorps et la réponse à la vaccination, la protéine SsnA : « secreted *S. suis* nuclease A » a été sélectionnée comme étant le meilleur candidat de cette étude (98). Cependant, dans la littérature, la plupart des molécules antigéniques, potentiellement candidates, ont été choisies par leur expression commune entre souches/sérotypes ou leur particularité à être des protéines très conservées, avant même de tester leur capacité à induire une protection croisée. D'ailleurs, de nombreuses études se sont penchées sur des molécules conservées uniquement chez le sérotype 2, sans étudier la protection croisée avec d'autres sérotypes (99-111). En comparaison, très peu d'études ont adressé la sélection de protéines candidates sur d'autres sérotypes, alors que le sérotype 2 n'est pas le seul responsable des pertes majeures causées par *S. suis* dans l'industrie porcine (112-114).

Les protéines de surface sont particulièrement ciblées dans les vaccins sous-unitaires. Leur caractéristique principalement recherchée est leur ancrage à la paroi bactérienne, ce qui les rend plus accessibles aux anticorps, offrant ainsi de meilleures chances d'induire une forte réponse immunitaire (98, 115, 116). De nombreuses protéines ont fait l'objet d'essais de vaccination incluant SAO : « surface antigen one » (117, 118), une lipoprotéine liant les cations divalents (119, 120), SAT : « surface antigen two » (121), une protéine auxiliaire du pilus (122), l'adhésine galactosyl-( $\alpha$  1-4) (123, 124), les facteurs EF : « extracellular factor » et MRP : « murimidase released protein » (125) ou encore la suilysine (126-130). Cependant ces protéines ont souvent montré une protection potentielle contre le sérotype 2 mais pas contre d'autres sérotypes (98). Tel qu'indiqué dans la **section 3.1**, une étude ayant utilisé un double mutant sans SspePO et SspePC comme vaccin vivant atténué a décrit ces facteurs comme étant importants dans la virulence (90). La protéine SspePO a été donc utilisée dans une étude comme vaccin sous-unitaire chez le porc et la souris (131). Cette étude a montré que le vaccin induisait une forte réponse humorale et pourrait être protecteur. Toutefois, il n'a été testé que sur le sérotype 2 alors que le mutant vivant décrit précédemment montrait une protection croisée avec les sérotypes 7 et 2 (90, 131). Il est important de mentionner que des modèles d'infection expérimentale existent surtout pour le sérotype 2, mais pas pour les autres sérotypes, ce qui rend difficile l'évaluation de la protection hétérologue.

La protéine SAO a été identifiée dans de nombreux sérotypes pathogènes de *S. suis*. Ainsi SAO a été la cible de recherches pour identifier son rôle dans la virulence de *S. suis* et a même été choisie comme candidate pour un vaccin sous-unitaire dans quelques études (117, 118, 132, 133). Son implication comme facteur de virulence est toutefois remise en question et une étude révèle même que ce n'est pas un facteur critique dans la virulence de *S. suis* (134).

La protéine SsEno : « *S. suis* enolase » a également été étudiée dans quelques articles comme candidate à un vaccin sous-unitaire. Cette protéine de surface de *S. suis*, liant la fibronectine, est présente dans tous les sérotypes décrits de *S. suis* faisant d'elle une bonne candidate pour ce type de vaccin. Cependant, cette protéine a montré des résultats contradictoires entre les articles, pouvant s'expliquer par les différents adjuvants utilisés (135-137).

Un autre type de vaccin sous-unitaire ayant été étudié est celui composé de la CPS qui induit une réponse immunitaire très spécifique à la capsule, excluant l'objectif d'un vaccin procurant une protection croisée entre sérotypes (138). De plus, cette réponse immunitaire est relativement faible

puisque'il n'a été reporté qu'une faible production d'IgM et pas d'IgG, ce qui signifie l'absence de commutation isotypique, (139) par la nature carbohydate de la CPS (140). En effet, la nature polysaccharidique de la CPS en fait un antigène TI, donc peu immunogénique (**voir la section 2.2**). Par conséquent, peu d'anticorps sont produits contre la CPS, ces derniers étant essentiels à la phagocytose, la bactérie parvient donc à y échapper (140). Une étude sur les vaccins à base de bactéries a d'ailleurs comparé l'efficacité de ces vaccins à partir d'une souche encapsulée vs. une souche non-encapsulée, révélant que la capsule reste essentielle à l'obtention d'une bonne réponse protectrice (50). D'autre part, la CPS étant l'antigène de référence lorsqu'on effectue le sérotypage, il serait un candidat intéressant pour la protection de plusieurs souches au sein d'un même sérotype. Toutefois, pour en faire un bon vaccin il faudrait pouvoir améliorer son immunogénicité. Un vaccin glycoconjugué a donc été testé en couplant la CPS de sérotype 2 avec une protéine porteuse immunogénique : le toxoïde tétanique, démontrant une bonne capacité à induire la production d'anticorps protecteurs chez la souris et une protection significative chez le porc (140).

En conclusion, le manque de connaissance sur les facteurs impliqués dans la pathogénèse de *S. suis* retarde cependant la découverte du candidat idéal pour ce type de vaccination (41, 49).

De nombreux vaccins expérimentaux ont aussi testé l'associations de molécules antigéniques avec des bactéries dans le but de conférer une meilleure protection, mais les résultats sont encore une fois mitigés (141, 142).

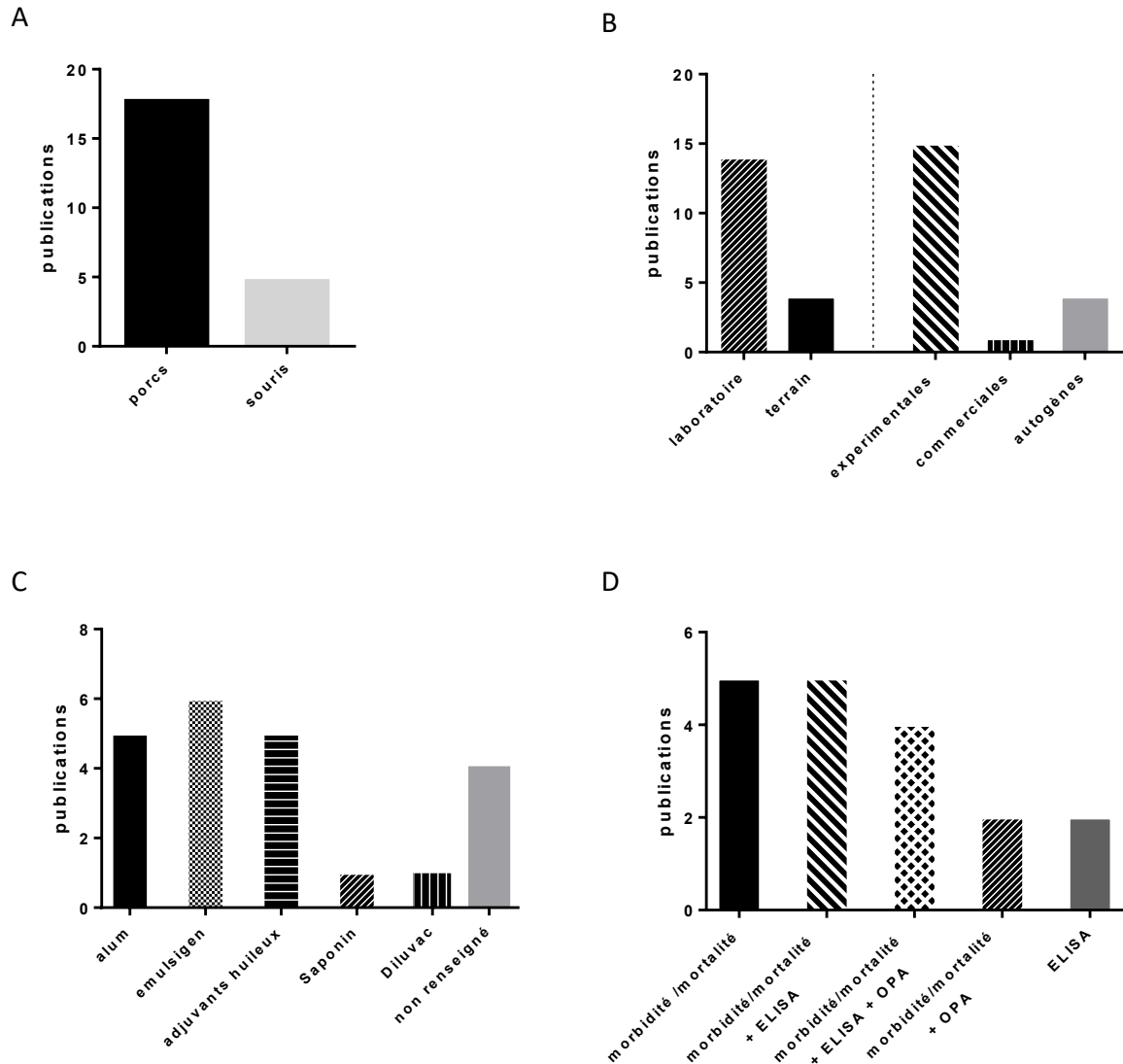
### **3.3 Bactéries**

Les bactéries sont des cellules bactériennes entières ayant été inactivées par chaleur, par traitements chimiques (au formaldéhyde, par exemple) ou parfois même par traitements antibiotiques (ceftiofur, par exemple) (4). Lorsque les producteurs cherchent à immuniser un troupeau, l'utilisation des bactéries reste la première et principale option possible (140). À ce jour, les seules disponibles sur le terrain sont les bactéries commerciales ou les bactéries autogènes. Cependant, un seul vaccin commercial existe à ce jour mais ce dernier n'est pas disponible au Canada et son utilisation est très limitée. Les bactéries autogènes restent donc les plus utilisées. Les bactéries expérimentales sont néanmoins sujet à quelques recherches dans le but d'améliorer les vaccins déjà existants en testant plusieurs paramètres (adjuvants, méthode pour tuer les

bactéries, voie d'administration, etc.) (4). Une réponse faible a souvent été reportée pour les vaccins à base de bactérines, que ce soit sur le terrain ou lors d'essais expérimentaux, dû possiblement à la perte de l'antigénicité par le mode d'inactivation des bactéries, la production d'anticorps non protecteurs et/ou le manque de protection croisée (4). Les résultats contrastants quant à l'efficacité de la vaccination par les bactérines peuvent s'expliquer par plusieurs paramètres qui diffèrent entre articles. Le traitement d'inactivation des bactéries peut endommager les épitopes immunogéniques (143). Pour contrer ces dommages, une étude a testé le ceftiofur, un antibiotique, comme méthode d'inactivation de la bactérie, mais les résultats étaient, là encore, non concluants (144). Le nombre de doses et leur concentration peut également influencer l'efficacité (143). L'adjuvant choisi peut-être une variable non négligeable à considérer, ce point sera décrit plus en précision **dans la partie 3.5** (144). Récemment une étude faite en utilisant un modèle souris a comparé la voie d'administration sur l'effet protecteur du vaccin en révélant que l'injection par microaiguilles semblait plus efficace que l'injection par voie intramusculaire couramment utilisée (145). Il reste à voir si une telle méthode serait applicable au porc. Le sérotype choisi pour préparer le vaccin peut influencer la protection selon qu'on vise une protection dirigée contre le même sérotype (homologue) ou contre un sérotype différent (hétérologue) que celui avec lequel le vaccin a été formulé. La littérature a souvent reporté une protection hétérologue absente ou partielle (141, 142, 146).

Sur le terrain, les co-infections avec le virus du SRRP et *S. suis* sont fréquentes et causent de sévères infections. De ce fait, une étude s'est penchée sur l'efficacité des traitements fréquemment utilisés pour contrôler ces co-infections et a comparé les traitements antibiotiques aux vaccins à base de bactérine révélant que les traitements au ceftiofur sont plus efficaces que les vaccins à base de bactérines (147).

Dans certains cas, des bactérines sont utilisées comme contrôle ou point de comparaison pour le test de vaccins sous-unitaires (111, 148). Un recensement des données de la littérature sur les vaccins à base de bactérines est présenté dans la **Figure 6**.



**Figure 6.** Recensement des données sur les vaccins à base de bactéries depuis 1994. (A) Comparaison des études faites sur les porcs et les souris. (B) Comparaison des études faites chez le porc sur le terrain ou en laboratoire (à gauche du graphique) et les types de bactéries utilisées pour ces études (à droite du graphique). (C) Comparaison des différents adjuvants utilisés dans les études de vaccin à base de bactéries chez le porc. (D) Comparaison des données mesurées dans les études de vaccin à base de bactéries chez le porc. [© Lorelei Corsaut].

### 3.3.1 Expérimentales

Une étude semble indiquer que deux doses de vaccin à concentration de bactéries élevée (de  $10^9$  à  $10^{11}$ ) avec l'utilisation d'un adjuvant puissant sont nécessaires pour induire une protection (149). La plupart des études ont été menées avec le sérotype 2 mais quelques études ont étudié les effets des bactéries avec d'autres sérotypes comme le sérotype 9 ou 7, menant, une fois de plus,

à des résultats contradictoires (74, 150, 151). Certaines études n'ont pas mesuré la réponse immunitaire suite à la vaccination mais seulement le recensement de cas cliniques (144, 149, 152). Ces études rapportent d'ailleurs une faible réponse au vaccin. En ce qui concernent les études qui ont mesuré les paramètres sérologiques de la réponse au vaccin (mesure du taux d'anticorps, etc.) on remarque que dans certains cas les anticorps mesurés sont uniquement ceux dirigés contre la capsule (142), dans d'autres cas contre des protéines (74, 125) et dans d'autres cas les deux (75, 142), mais rarement contre la bactérie entière. D'autres études ont évalué l'effet du vaccin sur des porcs exempts de pathogène, en conditions de laboratoire (50, 144). Halbur *et al.* ont montré que 2 doses de bactérines formolées ne permettent pas le contrôle de *S. suis* lors d'un challenge avec la souche homologue de *S. suis* en coinfection avec PRRSV (147). De plus, certaines études n'ont pas utilisé de groupe contrôle non vacciné pour comparer l'effet du vaccin de manière objective.

Il a été décrit que la CPS serait capable de masquer certaines protéines de surface selon son épaisseur. Une expérience a donc utilisé des bactéries dépourvues de CPS dans le cadre d'une immunisation de porcs. Une plus faible protection a été reportée chez les porcs immunisés avec la bactérie non-encapsulée comparativement à la bactérie encapsulée et les anticorps anti-CPS ont été retrouvés uniquement chez les porcs immunisés avec la bactérie encapsulée. Cela suggérerait que les anticorps dirigés contre la CPS seraient essentiels à l'élimination de la bactérie et que probablement, les protéines de surface seraient inatteignables pour les anticorps dirigés contre ces protéines à cause de la présence de la CPS (76, 140, 153).

Les résultats mitigés observés dans l'étude des bactérines expérimentales peuvent s'expliquer par la variabilité du matériel et des méthodes utilisées. Ces études manquent souvent de précision et d'informations complètes pour mesurer l'effet du vaccin (4).

Face à la faible protection souvent observée dans les études, certaines ont cherché à comparer deux stratégies vaccinales : celle qui consiste à vacciner les truies gestantes de celle qui consiste à vacciner activement les porcelets. Ces études reportent souvent un manque de protection à 8 semaines d'âge à la suite de la vaccination active mais une protection efficace à 2 semaines d'âge principalement liée à l'immunité maternelle. Cependant, cette protection n'étant pas durable, les porcelets en croissance sont des individus hautement à risque de contracter la maladie sans pouvoir en être protégés (75, 154, 155).

### 3.3.2 Commerciales

En ce qui concerne les bactérines commerciales, un seul vaccin existe à ce jour. Il n'y a pas beaucoup d'information à son sujet. On sait cependant que la bactérine présente dans ce vaccin est un sérotype 2 et que conséquemment le vaccin ne protégerait pas contre d'autres sérotypes. Aussi, il n'existe qu'une étude dans la littérature ayant mesuré l'efficacité de ce vaccin (**Figure 6**) (156). Ce vaccin a été testé chez les porcelets au sevrage et il a été reporté une réponse faible du vaccin basé sur la sévérité de la maladie clinique (156), ou un effet mineur sur la colonisation de porcelets avec *S. suis* sérotype 2 (sans évaluation de l'effet clinique du vaccin) (155). Ce vaccin n'est plus commercialisé en Amérique du Nord.

### 3.3.3 Autogènes

Très peu de recherches se sont penchées sur l'efficacité de ces vaccins et leurs effets sont très controversés. Il a souvent été reporté une réponse limitée. Pourtant ces vaccins sont les plus utilisés sur le terrain. Le terme « Autogène » signifie que la souche de *S. suis* causant des problèmes cliniques de mortalité/morbidité dans la ferme a été isolée de cas cliniques puis identifiée par sérotypage avant d'être inactivée dans le but de formuler un vaccin. Ce vaccin est ensuite administré aux animaux de la même ferme où la souche infectieuse a été identifiée. Dans l'idéal, l'immunité maternelle naturelle ne devrait pas interférer avec la réponse au vaccin, et devrait conférer une protection efficace des porcelets. Cependant, très peu d'études ont été menés pour caractériser la réponse induite par un vaccin autogène contre *S. suis* (**Figure 6**).

Le terme de vaccin « autogène » est à prendre avec précaution. Il est utilisé sur le terrain et par définition, si le vaccin est composé de la souche causant des problèmes cliniques dans la ferme il est dit autogène. Cependant, certains articles utilisent cette appellation à tort. Par exemple l'article de Halbur *et al.* utilise le terme de bactérine autogène pour désigner que la souche présente dans le vaccin est identique à celle utilisée pour le challenge expérimental (147). On devrait dans ce cas parler de souche homologue et cette bactérine est expérimentale. Malgré le fait que ces vaccins autogènes soient majoritairement utilisés sur le terrain à ce jour, seulement 4 études sur le terrain ont été mené pour mesurer l'efficacité de ces vaccins, offrant des résultats mitigés (150, 152, 156, 157). Parmi ces 4 articles, un est en allemand et n'a pas été traduit ce qui rend son analyse impossible (150).



L'article de Lapointe *et al.* (157) décrit avoir vacciné 100 porcelets à 3 semaines (2 semaines après le sevrage, le sevrage étant fait entre 7 et 10 jours d'âge) et 5 semaines d'âge avec un vaccin autogène du sérotype 1/2 et en utilisant l'hydroxyde d'aluminium (« Alum ») et « Emulsigen » (émulsion huile dans l'eau) comme adjuvants. Un groupe contrôle de 100 porcelets était inclus dans l'étude. Le suivi clinique a été réalisé sur l'ensemble de ces 200 porcelets tandis que le suivi sérologique a été réalisé sur 36 porcelets de chaque groupe. Avant le début du projet, les porcelets de cette ferme montraient des signes cliniques entre 6 et 8 semaines d'âge. Le suivi sérologique a été fait par prise de sang à 1, 3, 5, 7, 9, 11 et 13 semaines d'âge. Un taux d'anticorps élevé a été observé à une semaine d'âge tandis qu'une importante baisse a été observée entre 3 et 6 semaines d'âge correspondant à la baisse d'immunité maternelle. Le taux d'anticorps a augmenté dans le groupe vacciné à partir de 7 semaines d'âge et est resté élevé jusqu'à 13 semaines d'âge tandis que cette augmentation n'a été visible qu'à 13 semaines d'âge pour le groupe non vacciné. L'étude clinique n'a reporté aucune mortalité dans le groupe vacciné ou contrôle et aucun signe clinique d'infection à *S. suis*. Il semblerait que les problèmes cliniques au sérotype 1/2 étaient présents lors de l'étude préliminaire mais ont disparu lors de l'étude de terrain. En effet, aucune éclosion n'a été reportée lors de cette étude, ne permettant pas une conclusion fiable de l'efficacité du vaccin. Cependant, cet article a utilisé la sonication comme technique pour tuer les bactéries dans le but d'obtenir une forte concentration de protéines antigéniques. La sonication induit la lyse de la bactérie tout en permettant de conserver les protéines intactes (157). Or, par définition, une bactérine est une bactérie ayant été inactivée mais qui garde sa structure entière, ainsi elles sont généralement inactivées au formol ou à la chaleur. La méthode de sonication ne conservant pas la bactérie dans sa structure complète ne respecte pas la définition de vaccin à base de bactérine et ne permet pas de reproduire les conditions réelles de ces vaccins utilisés sur le terrain.

Dans l'article de Torremorell *et al.* (156) 90 porcelets ont été vaccinés avec une bactérine autogène du sérotype 2 préparée par une compagnie accréditée avec hydroxyde d'aluminium comme adjuvant. Les porcelets ont été vaccinés à 15 jours (au sevrage) et 25 jours d'âge. Pour évaluer la réponse au vaccin, la morbidité et la mortalité ont été mesurées mais la réponse sérologique n'a pas été étudiée. Le groupe vacciné présentait 13 % de porcelets malades contre 13 % dans le groupe contrôle non-vacciné. Le taux de mortalité était de 5% dans le groupe vacciné contre 6% dans le groupe non vacciné. Globalement, cette étude montre une inefficacité du vaccin autogène utilisé dans cette expérience. Les auteurs remettent en cause l'adjuvant utilisé et suggèrent qu'un adjuvant

huile-dans-eau de type Imugen® serait plus efficace. Cet adjuvant a été utilisé dans leur vaccin expérimental et montrait un meilleur taux de survie.

L'article de Hopkins *et al.* (152) mentionne que la souche de *S. suis* choisie pour le vaccin était difficilement contrôlable puisque le traitement préventif avec pénicilline était inefficace étant donné que la souche était résistante à cet antibiotique (confirmé par un test de sensibilité aux antibiotiques). De plus, le traitement curatif ne permettait pas de protéger les porcelets malades car ces derniers n'étaient pas identifiés assez tôt pour être traités à temps. Dans cette ferme, la majorité des cas cliniques se manifestaient entre 6 et 9 semaines d'âge. Au total 540 porcelets séparés en 5 cohortes ont fait partie de cette étude. Chaque cohorte comportait environ 8 à 13 portées dont 75% des porcelets étaient vaccinés et 25% ne l'étaient pas, exceptée une cohorte utilisée comme contrôle qui n'a pas été vaccinée. Les porcelets vaccinés ont reçu une première dose de bactérine autogène de sérotype 2 à leur entrée en pouponnière et 3 semaines après. Le vaccin a été préparé par une compagnie accréditée, l'adjuvant n'est pas mentionné. Cette étude mesure l'efficacité totale, directe et indirecte du vaccin par calcul de mortalité du groupe vacciné comparativement au groupe non vacciné. L'étude reporte que l'effet direct du vaccin n'est pas significatif.

En conclusion, seuls 2 articles publiés en anglais ont traité de l'efficacité de cette approche préventive sur le terrain en incluant des groupes de contrôle et en utilisant un vaccin respectant la définition de bactérines autogènes (152, 156). Les études sur l'efficacité des bactérines autogènes utilisées sur le terrain reportent une faible protection voire parfois une absence de protection et des données complètes manquent aux études pour permettre une conclusion étoffée.

### **3.4 Les stratégies vaccinales**

À leur naissance, les porcelets possèdent un système immunitaire peu développé qui n'est pas en mesure de produire activement des anticorps qui puissent les protéger contre une infection. De plus, ils ne possèdent aucun anticorps dans leur circulation sanguine puisque ces derniers ne sont pas capables de traverser la barrière placentaire durant la gestation. Pour être protégés, les porcelets ne peuvent donc compter que sur l'immunité maternelle transmise par leur mère, principalement via le colostrum, en attendant de développer leur propre immunité. Il est donc important que les porcelets acquièrent une immunité via cette prise colostrale.

Les porcelets sont les premiers individus à protéger, étant les individus les plus fragiles et les plus susceptibles de développer la maladie. Tel que mentionné dans **le point 1.2** la période durant laquelle *S. suis* est responsable de la majorité des infections cliniques se situe entre 3 et 10 semaines d'âge, soit au post-sevrage. Il a d'ailleurs été reporté que la colonisation par *S. suis* se faisait très tôt dans la vie des porcelets et qu'ils étaient tous colonisés en bas âge (avant le sevrage) (4). Les souches de *S. suis* qui colonisent les porcelets à cet âge peuvent parfois être virulentes et susceptibles de causer des pathologies. Cependant, avant le sevrage (3 semaines d'âge), les porcelets sont protégés par les anticorps maternels, majoritairement acquis lors de la prise de colostrum. Ces anticorps parviennent à protéger les porcelets des infections durant les premières semaines de vie mais ont une durée de vie limitée. Ceci explique le manque de protection au moment du sevrage (155). En effet, le risque d'infections par les souches virulentes est limité par la présence de ces anticorps; lorsque ces anticorps se dégradent les porcelets deviennent plus vulnérables aux infections, s'en suit alors une augmentation du risque d'infection avec *S. suis*. La majorité des vaccins utilisés sur le terrain sont ceux composés de bactérines autogènes, décrites dans **le point 3.3**, ces derniers peuvent être administrés aux truies gestantes ou aux porcelets (4).

### 3.4.1 Immunisation des porcelets

Les porcelets sont souvent vaccinés avec deux doses à 2 ou 3 semaines d'intervalle. La deuxième dose devrait normalement être donnée au moins 10 jours avant le début de la période à risque, temps nécessaire pour atteindre la séroconversion (158). Cela représente un défi puisque la période à risque débute à 3 semaines d'âge avec une majorité de cas cliniques reportés vers 6 semaines d'âge (30). Il faut donc parvenir à induire des anticorps protecteurs à la suite de la vaccination durant la période à risque, dépendante des fermes, et que cette réponse vaccinale ne soit pas affectée par l'interférence avec l'immunité maternelle. En effet, il est difficile de mesurer l'effet protecteur chez les porcelets car une interférence est possible entre les anticorps maternels circulants et ceux potentiellement produits en réponse à la vaccination (4). Il est à noter qu'un taux d'anticorps élevé est présent chez les porcelets avant le sevrage, correspondant au transfert d'immunité maternel qui se perd par la suite. Cependant une augmentation naturelle des anticorps après 10 semaines d'âge a pu être observée en réponse à la présence de cas cliniques causés par *S. suis* chez les porcs (157). La difficulté réside donc dans le fait que la présence de ces anticorps maternels puisse diminuer l'efficacité du vaccin. L'existence d'une telle interférence avec

l'immunité maternelle naturelle (et si c'est le cas, sa durée) est très peu connue mais la protection induite par celle-ci n'excéderait pas 6 semaines d'âge (4). En présence d'une interférence, les anticorps maternels bloquent les antigènes du vaccin ce qui réduit la stimulation antigénique et ralentit le développement de l'immunité acquise. Ainsi, pour limiter cette interférence, il est souvent conseillé de vacciner les porcelets pendant ou après le sevrage à 3 ou 4 semaines d'âge. Cependant, le sevrage joue un rôle critique puisque le stress occasionné modifie la production d'hormones immunomodulatrices pouvant affecter l'efficacité de la réponse immunitaire systémique et mucoale. Ce stress peut ainsi influencer négativement la réponse lors d'une vaccination active des porcelets (158). De plus, tel que mentionné plus haut, une première vaccination après le sevrage ne donnerait pas le temps à une séroconversion et protection si les cas cliniques ont lieu tôt après le sevrage (5-6 semaines d'âge).

### **3.4.2 Immunisation des truies (transfert de l'immunité maternelle)**

Il est possible de vacciner les truies durant leur période de gestation permettant la transmission d'une immunité maternelle passive aux porcelets, majoritairement acquise par la prise de colostrum. Cette stratégie permet ainsi de protéger les porcelets le plus tôt possible. Elle est moins coûteuse et plus facile à pratiquer, représentant une alternative économique à la vaccination des porcelets (4). La vaccination se fait généralement en deux doses de 2 à 4 semaines d'intervalle dont la dernière dose est donnée à 3 semaines avant parturition, ce qui permettrait une meilleure immunité colostrale (4, 158). En effet, les anticorps sont incapables de traverser la barrière placentaire, ces derniers ne peuvent donc s'acquérir que par la lactation. De ce fait, la quantité d'anticorps retrouvée ensuite chez les porcelets est très variable s'expliquant surtout par le niveau variable d'anticorps présents dans l'immunité maternelle colostrale des truies, dépendant de plusieurs facteurs : l'âge, la multiparité, la nutrition, la vaccination, les facteurs de stress environnementaux et l'exposition à la bactérie. En effet, les primipares peuvent présenter une moins bonne immunité colostrale que les truies multipares et les truies naïves possèdent également moins d'anticorps que celles ayant été exposées à *S. suis*, ayant une meilleure immunité adaptative. La variabilité d'anticorps retrouvés chez les porcelets dépend également de la quantité de colostrum ingérée par les porcelets. Cependant, comme il a été reporté que l'immunité maternelle est de courte durée, cette stratégie permettrait de protéger les porcelets très tôt dans leur vie mais pas durant toute la période à risque du post-sevrage (4, 75).

Le colostrum et le lait ont des fonctions différentes :

### **L'immunité colostrale**

Protection systémique. A la naissance, les porcelets ont une perméabilité intestinale complète permettant l'absorption des anticorps maternels (IgG, IgM et IgA) dans le sang mais aussi de cellules immunitaires (phagocytes et lymphocytes, par exemple). Les IgG sont les principaux isotypes du colostrum, ils seront absorbés jusqu'à atteindre un titre similaire à ceux des truies. Le colostrum contient également des hormones (prolactine et cortisol) jouant un rôle dans la régulation de la croissance des cellules épithéliales de l'intestin. Ainsi, durant les premières 24 heures, les muqueuses intestinales des porcelets n'étant pas complètement refermées, ces derniers sont capables d'absorber le colostrum permettant l'acquisition de ces composants immunitaires de manière systémique. Les muqueuses intestinales se referment progressivement après la prise de colostrum grâce aux hormones contenus dans celui-ci (159). L'immunité lactogénique prend ensuite la relève.

### **L'immunité lactogénique**

Jusqu'au sevrage, la protection locale est assurée par l'ingestion du lait. Après l'absorption du colostrum, les muqueuses intestinales se referment ne permettant plus le passage des cellules et des anticorps dans le sang. Cependant, les lymphocytes et des IgA, principalement présents dans le lait vont permettre la protection contre des pathogènes locaux. Il permet donc la neutralisation des bactéries dans le système digestif évitant des infections avec des bactéries qui pourraient pénétrer la barrière mucoale du tractus gastro-intestinal (159). Cependant, cette immunité étant locale, elle n'intervient pas dans la protection contre *S. suis* étant donné que ce pathogène est présent au niveau des voies respiratoires supérieures.

## **3.5 Les adjuvants utilisés en médecine vétérinaire**

Un adjuvant permet d'augmenter l'intensité et la qualité de la réponse immunitaire dirigée contre un antigène, il est ajouté à un vaccin pour permettre une meilleure efficacité de ce dernier. En effet, le pouvoir immunogène des vaccins non-adjuvantés est souvent trop faible. Les adjuvants permettent également d'orienter la réponse immune vers une réponse spécifique en fonction du type de réponse (type 1 ou 2) qu'on souhaite obtenir en favorisant la production d'isotypes préférentiels. Il existe plusieurs types d'adjuvants qui sont généralement soit immunostimulants ou « véhicules ». Les immunostimulants se lient à des récepteurs des cellules immunitaires, tels que

les TLRs (« Toll-like receptors »), pour activer la réponse immunitaire de type 1 ou 2 (voir **section 2.2**). Les « véhicules » contiennent eux-mêmes l'antigène et déterminent la façon dont il sera présenté aux cellules immunitaires mais possèdent aussi une capacité immunostimulante puisqu'ils sont constitués de corps étrangers (160). Le choix de l'adjuvant est crucial dans la formulation d'un vaccin puisqu'il influence la magnitude et la qualité de la réponse adaptative en agissant directement ou indirectement sur la commutation de classe des LB en favorisant par exemple plutôt la réponse de type 1 ou 2, décrites précédemment (161). En effet, Martelet *et al.* (161) ont étudié l'effet de l'adjuvant sur la polarisation immunitaire en utilisant comme modèle une culture *in vitro* de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse. Différentes structures de *S. suis* ont été testées comme antigène (énolase ou CPS) ainsi qu'une protéine fortement immunogénique (l'anatoxine tétanique). Cette étude montre que l'adjuvant joue un rôle essentiel dans le type de réponse immunitaire dépendamment de l'antigène utilisé. Il n'existe pas d'adjuvant universel à ce jour et leur choix dépend de différents critères : l'espèce ciblée, l'antigène, le type de réponse immunitaire attendue, la voie d'inoculation et la durée de l'immunité (160). Avant de choisir l'adjuvant, il faut s'assurer qu'il soit stable, sécuritaire et qu'il permette une diminution de l'utilisation de l'antigène. Dans le contexte de ce mémoire, nous nous concentrerons sur les adjuvants utilisés dans les vaccins à base de bactérines chez *S. suis*.

Les principales catégories d'adjuvants utilisés dans des vaccins à base de bactérines sont peu connues puisque les adjuvants ne sont pas toujours renseignés dans les études. Lorsque l'information est disponible, les adjuvants les plus utilisés sont l'hydroxyde d'aluminium (généralement connu comme « Alum ») (125, 143, 145, 147, 156) et « Emulsigen » (une émulsion huile dans l'eau) : (74, 75, 142, 147, 157) (**Figure 6**). Ces deux catégories d'adjuvants sont décrites ci-dessous.

Les composants à base d'aluminium, particulièrement l'aluminium phosphate et l'hydroxyde d'aluminium (généralement nommés « Alum ») sont communément utilisés dans les préparations vaccinales pour la médecine humaine et vétérinaire. Les vaccins composés d'aluminium sont sécuritaires et efficaces, et sont utilisés depuis plus de 60 ans. Ils sont d'ailleurs communément utilisés dans les vaccins à base de bactérines (4). Ils ont l'avantage de ne pas être toxiques et peuvent donc être administrés chez les truies gestantes sans risque d'avortement. Ces adjuvants

stimuleraient la réponse immunitaire de type 2 mais leur efficacité reste modérée et des rappels sont souvent nécessaires (162). L'intérêt de l'Alum réside donc dans sa sécurité.

L'adjuvant Emulsigen® est composé d'une huile minérale. Il contient des micro-gouttelettes d'huiles dispersées de façon uniforme qui assurent la stabilité de l'émulsion et réduit la viscosité. Il induit une réponse immunitaire forte et rapide (163). Cet adjuvant a fait l'objet de nombreux essais de vaccination contre *S. suis* chez le porc, notamment en combinaison avec des bactérines du sérotype 2 et du sérotype 9 (donnant des résultats contradictoires) (4).

Plus rarement, des études expérimentales à base de bactérines ont utilisé comme adjuvant des saponines (144), des émulsions huile-dans-eau (144, 155, 156), eau-dans-huile (50, 125), eau-dans-huile-dans-eau (141) l'adjuvant incomplet de Freud (143) ou Diluvac® (151) (**Figure 6**). Dans plusieurs études de vaccins à base de bactérines de *S. suis*, le choix de l'adjuvant n'est pas clairement mentionné mais il serait essentiel pour induire une protection (74, 76, 125, 142, 149, 164). Une seule étude a comparé plusieurs adjuvants dans l'efficacité des vaccins à base de bactérines. Cette étude de terrain a rapporté que, comparativement aux porcelets non vaccinés, il n'y avait pas de différences significatives dans la mortalité des porcelets vaccinés avec un vaccin autogène expérimental et ceux vaccinés avec un vaccin autogène standard (156). La bactérine autogène expérimentale a été préparée à partir d'un isolat de *S. suis* de sérotype 2 d'un cas clinique au sein de la ferme avec un adjuvant huile-dans-eau (Imugen®). Le vaccin autogène standard a été préparé commercialement avec un isolat du sérotype 2 également retrouvé dans le même troupeau, 10 mois avant l'étude. Ce vaccin avait pour adjuvant l'hydroxyde d'aluminium. Malgré les différentes formulations, les deux vaccins à base de bactérines autogènes n'ont pas réussi à protéger le troupeau. Toutefois, puisque le vaccin expérimental a montré un taux de mortalité un peu moindre que le vaccin standard ou commercial, les auteurs s'accordent à dire que l'adjuvant Imugen® serait plus efficace que l'hydroxyde d'aluminium.

L'effet de l'adjuvant dans la formulation du vaccin reste donc encore à être étudié.

### **III. Article scientifique**



**Field study on the immunological response and protective effect of a commercial autogenous vaccine to control *Streptococcus suis* infections in post-weaned piglets**

Lorelei Corsaut<sup>1</sup>, Marty Misener<sup>2</sup>, Paisley Canning<sup>2</sup>, Guy Beauchamp<sup>3</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>1</sup> and Mariela Segura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Group on Infectious Diseases in Production Animals (GREMIP) and Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre (CRIPA), Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

<sup>2</sup>South West Ontario Veterinary Services, Stratford, Ontario, Canada

<sup>3</sup>Biostatistics Office, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

#Address correspondence to Mariela Segura, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, J2S 2M2, Canada.

Tel:+1 450 773-8521 ext. 0080. Fax: +1 450 778-8108. E-mail: [mariela.segura@umontreal.ca](mailto:mariela.segura@umontreal.ca)

Article en préparation pour soumission dans le journal « Vaccine »

**Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :**

Je suis le premier auteur de l'article. J'ai participé activement aux expériences, à l'analyse des résultats et à l'écriture de l'article.

## ABSTRACT

*Streptococcus suis* is one of the most important bacterial pathogens in weaned piglets and responsible for serious economic losses to the swine industry. Currently, mostly autogenous vaccines composed of killed bacteria (bacterins) are available. However, immunological and protective data from field studies are missing. We report for the first time a comparative field study on the immunological response induced by an autogenous vaccine applied to either piglets or sows. Using a farm with recurrent *S. suis* problems, the study was divided in two parts: I) Piglets from non-vaccinated sows received an autogenous bacterin during the first week and 3 weeks of age. II) Sows received the vaccine at 5 and 3 weeks pre-farrowing and piglets were non-vaccinated. Sera were collected to analyze levels, isotype profile and functionality (opsonophagocytosis capacity) of the antibody response induced by vaccination. Vaccination of piglets failed to induce an active immune response even after two vaccine doses. Vaccination of sows induced a significant increase in anti-*S. suis* antibodies, which were mainly composed of IgG1. Yet, isotype switching induced by the vaccine was modulated upon the *S. suis* serotype included in the formulation. In spite of this increase, antibody response in vaccinated sows and transfer of maternal immunity to piglets was not different than in the control group. Notably, levels of maternal antibodies in piglets were already very high with marked opsonophagocytosis capacity at 1 week of age, independently of the vaccination program. Yet, this maternal immunity has already decreased by 3 weeks of age, indicating possible absence of antibodies in the post-weaning high-risk period. These observations correlate with the lack of clinical protection observed in the farm. Overall, a piglet or a sow vaccination program herein mostly failed to induce lasting protection in nursery piglets. An improvement of vaccine formulation or an optimized program may be required.

**KEYWORDS :** *Streptococcus suis*, infection, field, autogenous bacterin, vaccine, pigs

## INTRODUCTION

*Streptococcus suis* is responsible for important economic losses to the porcine industry worldwide (1). It is also one of the most important complications of infections caused by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (1). Clinical features associated with *S. suis* infection in pigs are meningitis, arthritis, endocarditis, polyserositis and septicemia with sudden death. There are 35 serotypes that have been described, although six of them have been re-classified within other streptococcal species (2). Usually, few virulent serotypes (mostly serotypes 2 and 9) are recovered from diseased animals in Europe (3). However, the situation is much complicated in North America, where a large number of serotypes are routinely isolated from diseased pigs, without a clear predominance of a single serotype across the countries (4). In addition, *S. suis* has been reported to be an emerging zoonotic pathogen with the greatest risk for people who have close contact with pigs or unprocessed pork such as, in Western countries, pig farmers and workers, butchers, meat inspectors and swine veterinarians (5).

As the complexity of *S. suis* epidemiology in swine increases (multiple strains, multiple serotypes), field reports describing difficulties in disease control and management are common (6). Early medicated weaning and segregated early weaning practices do not eliminate *S. suis* infection, since piglets are infected very early in life or even during farrowing (1). Indeed, control of *S. suis* disease is frustrating. Antibiotics can prevent clinical outbreaks, but those that have efficacy are products that the industry is trying to use as little as possible, given their importance in both human and veterinary medicine (1). Recent data on antimicrobial susceptibility of *S. suis* are alarming (7). Very high rates of resistance to macrolides/lincosamides and tetracyclines are observed and attributed to the intensive use of antimicrobials in pigs (7). Indeed, *S. suis* is considered a niche for antibiotic resistance and it represents a high risk of transmission of such resistance to other veterinary and human pathogens due to the presence of mobile genetic elements carrying resistance genes transferable at high frequency within the species and, even more alarming, between bacterial species (8).

Hence, prevention of *S. suis* disease should be concentrated on management of predisposing factors and, mainly, vaccines. Universal efficacious commercial vaccines could not be developed so far, probably due to the presence of a high number of serotypes (with no cross-protection against each

other) and a high variation of strains (6). The reduction in the use of antimicrobials and the presence of a high variety of serotypes, led to an increased popularity of autogenous vaccines. These vaccines are bacterins (whole cell killed bacteria with a complex antigen charge) based on the predominant strain(s) recovered from diseased pigs in the affected farm and produced by accredited laboratories. Most studies evaluating the protective capacity of bacterins have been carried out under laboratory conditions with vaccines produced with reference strains and presented contradictory results (6). The limited protective response obtained with experimental bacterins has been attributed to failure of the whole-bacterial antigens to elicit an immune response due to loss of antigenicity caused by the killing procedure, to production of antibodies to antigens not associated with protection, and/or the use of inappropriate adjuvants (6). However, the exact causes are so far unknown and it is difficult to compare studies with different vaccine production procedures.

There are almost no published field scientific studies, using control groups, demonstrating that autogenous vaccines, as routinely produced by companies, are able to induce an immune antibody response and whether or not their use is correlated with a clear reduction in both mortality and antibiotic use. In fact, it is unknown if this practice, as presently used, is economically profitable for producers. In addition, there is no clear information on how these vaccines should be applied. In the field, even in the absence of scientific studies, autogenous vaccines are sometimes given to young piglets without any data about their capacity to induce an immune response, most likely in the presence of maternal antibodies. On the other hand, many producers prefer vaccination of sows before farrowing which, in theory, would elicit passive maternal immunity. The latter protocol is less costly, and thus represents an attractive economical alternative to piglet vaccination. However, it is also unknown how long this maternal immunity lasts in piglets.

In the present study, the humoral immune response (levels, isotypes, and killing capacity of generated antibodies) and protective effect of an autogenous vaccine produced by a licenced company and given to either piglets or sows was scientifically evaluated in the field.

## MATERIALS AND METHODS

### Selected farm and clinical history

A 3700 sow farrow to finish system in Canada with internal gilt replacement and no commingling was selected. Piglets were weaned at 3 weeks of age into different single source sites. The farm had recurrent *S. suis* problems in all nursery sites, with clinical cases beginning mostly at 5 weeks of age, with spikes between 6 and 10 weeks of age. No *S. suis*-like clinical signs were observed in suckling piglets. Total mortality in nursery varied between 2.5 to 4%, and those *S. suis*-related accounted for approximately 1.5%. The latter was kept lower than expected due to preventive and curative use of antibiotics. Samples (meningeal swabs, joint swabs, spleen) from different nursery piglets were submitted at multiple occasions for complete diagnosis. Serotyping of *S. suis* isolates was carried out by the licenced laboratory responsible for the autogenous vaccine production as previously described (9). Final diagnosis of *S. suis* serotype 7-related diseases was given. During the project, a second serotype (serotype 9) was also identified as being responsible for several clinical cases (see below). Piglets were vaccinated against circovirus, *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (CircoFlex/MycoFlex/PRRS<sup>®</sup>) at weaning and again 3 weeks later against *M. hyopneumoniae* (Respisure One<sup>®</sup>).

### Vaccine preparation

Autogenous vaccine was prepared by a licenced company. It was composed by *S. suis* serotype 7 strain 1718 for the first experiment (piglet vaccination) and an additional *S. suis* serotype 9 strain 117827-21 (isolated from the spleen of a clinical case of sudden death during the first experiment) was added for the second experiment (sow vaccination). Both vaccines were combined with a strain of *Staphylococcus hyicus* and another strain of *Haemophilus parasuis*. An oil-in-water emulsion adjuvant was used to prepare the autogenous vaccine. No ethical statement was required for this study as the protocol used was part of normal interventions in the farm and performed by the veterinarian in charge, as stated by the Animal Welfare Committee of the University of Montreal.

### Immunization protocol

For the first experiment (Figure 1), piglets from non-vaccinated sows were selected (n = 1494). During the first week, at 4 days  $\pm$ 2, farm staff randomly divided each litter into two groups. Group 1 received the autogenous vaccine intramuscularly in the neck plus an ear notch (“vaccinated

group”; n = 583) and group 2 was processed normally as per farm procedures (“non-vaccinated group”; n = 911). Within this latter group, 20 randomly selected animals were injected with a placebo solution, with adjuvant only. All animals used in our experiments were identified with an ear tag. Each litter was roughly divided equally into each group. Piglets from group 1 received a second dose vaccine at weaning (3 weeks of age). Group 2 did not receive any injection at weaning; except for the 20 piglets injected with the placebo. Farrowing over the course of 1 week were enrolled in the trial as described above. All piglets were randomly weaned into three nursery rooms in the same barn, with pigs from group 1 and 2 mixed in each pen.

For the second experiment (Figure 1), vaccinated and non-vaccinated parity 0 sows were randomly selected (n = 20/group). Sows received two doses of the autogenous vaccine intramuscularly at 5 and 3 weeks before farrowing. A total of 207 piglets from vaccinated sows and 183 piglets from non-vaccinated sows were enrolled in the trial. All piglets were weaned into one nursery room, with mixed vaccinated and non-vaccinated animals in each pen.

### **Blood sampling**

For the first experiment (Figure 1), blood samples were collected from randomly chosen tagged piglets at 1, 3, 5 and 8 weeks of age from 50 vaccinated and 70 non-vaccinated animals, including the 20 that received a placebo, to follow the immune response.

For the second experiment (Figure 1), blood samples were taken from all enrolled sows at 5 weeks (just before 1<sup>st</sup> dose of the vaccine) and 1 week (two weeks after the 2<sup>nd</sup> dose of the vaccine) before farrowing. A total of 120 of randomly selected and tagged piglets (3 piglets/sow, for a total of 60 piglets/group) from vaccinated and non-vaccinated sows were originally included in the serological study. However, nine piglets from three different non-vaccinated sows could not be identified resulting in 51 piglets being sampled in this group. Piglets were sampled at 1, 3 weeks, and 5 weeks of age.

Collected sera from both experiments were stored at -20°C until analyzed by ELISA and for the opsonophagocytosis assay (described below).

### **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Strains used in the autogenous vaccine were also used for the coating of ELISA Polysorb plates (Nunc-Immuno; Thermo Scientific, Mississauga, ON, Canada). Bacteria were grown overnight onto 5% sheep blood agar plates at 37°C, and isolated colonies were cultured in 5 ml of Todd-Hewitt broth (THB) (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) for 8 h at 37°C with agitation at 120 rpm. Then, 10 µl of 1/1000 dilution of 8 h-cultures were transferred into 30 ml of THB and incubated for 16 h at 37°C with agitation at 120 rpm. Stationary-phase bacteria were washed in phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.3. Bacterial pellet was then suspended in ddH<sub>2</sub>O and adjusted to a concentration equivalent at 10<sup>8</sup> CFU/ml. Plates were coated with 100 µl/well of the whole bacterial suspension, air-dried during two days at room-temperature (RT), and finally fixed with 50 µl/well of 100% methanol. After evaporation of methanol, plates were stored at room temperature until use. For titration of antibodies, plates were washed with PBS-tween (PBS-T) containing 0.05% Tween 20 and blocked for 1 h with 2% skim milk in PBS-T at RT. After washing, 100 µl of different 2-fold based dilutions of pig sera (in PBS-T) were added to each well and incubated for 1 h at RT. For titration of porcine total Ig [IgG + IgM] or IgM, plates were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-pig total Ig [IgG + IgM] (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) or IgM (BioRad, Mississauga, ON, Canada) antibodies for 1 h at RT. For porcine IgG1 or IgG2 detection, mouse anti-porcine IgG1 or IgG2 (BioRad) was added for 1 h at RT. After washing, peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) was added for 1 h at RT. Plates were developed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; InvitroGen, Burlington, ON, Canada) substrate, and the enzyme reaction was stopped by addition of 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance was read at 450 nm with an ELISA plate reader. The reciprocal of the last serum dilution that resulted in an optical density at 450 nm (OD<sub>450</sub>) of ≤ 0.2 (cutoff) was considered the titer of that serum. To control inter-plate variations, an internal reference positive control was added to each plate. This positive control was composed by a pool of serum of six sows randomly selected in the farm that showed high ELISA values against *S. suis* serotype 7 and serotype 9 because of their natural exposition to these serotypes in the farm. Reaction in TMB was stopped when an OD<sub>450</sub> of 1.0 was obtained for the positive internal control. Optimal dilutions of the positive internal control sera and anti-porcine antibodies or conjugates were determined during preliminary standardizations.

### **Opsonophagocytosis assay (OPA)**

The OPA test was based on that described for mice (10) but adapted to swine sera. Whole blood, as a source of whole phagocytic cells, was obtained from young naïve piglets originating from a farm without *S. suis* endemic infection and intravenously collected in vacutainer sodium heparin tubes (Becton Dickinson) and kept at RT. Using washed bacterial cultures grown as described above, final bacterial suspensions were prepared in complete cell culture medium (RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, and 50 µM 2-mercaptoethanol; Invitrogen) to obtain a concentration of  $2 \times 10^6$  CFU/ml. The number of CFU/ml in the final suspension was determined by plating samples onto THB agar (THA). Whole blood (containing approximately  $1 \times 10^8$  leukocytes/ml) was mixed with the *S. suis* suspension to obtain a multiplicity of infection [MOI] of 0.01. Control and sample sera from immunized animals were added to a concentration of 40% v/v in microtubes to a final volume of 200 µl. Control sera came from naïve pigs (absorbed against *S. suis* serotype 7 and presenting negative ELISA values), and positive sera were obtained and pooled from sows (originated from the same farm and presenting high ELISA values). The tube tops were pierced using a sterile needle and were incubated for 4 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, with gentle agitation. After incubation, viable bacterial counts were performed on THA using an Autoplate 4000 automated spiral plater. The percentage of bacterial killing was determined using the following formula:

% Bacteria killed =  $[1 - (\text{bacteria recovered from sample tubes} / \text{bacteria recovered from negative control tube with control serum})] \times 100$ .

### **Clinical evaluation of animals**

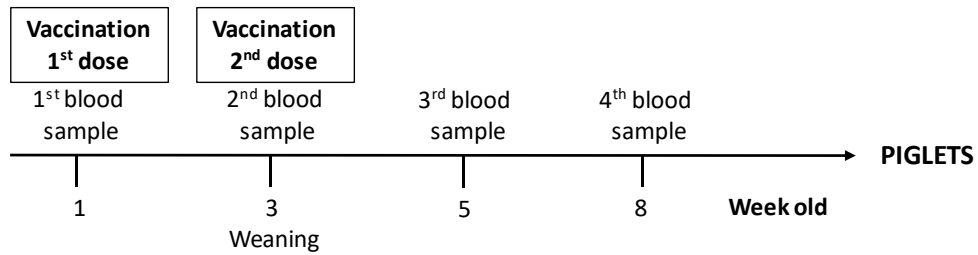
For both experiments, clinical signs, mortality and injectable treatments were recorded from all enrolled piglets by farm staff daily by room. Pigs were identified as notched or not notched, and there were no individual pig identifiers. As such, an individual pig could be represented more than once in the data set for treatments. Pigs were followed until the end of the nursery period (10 weeks of age). When possible, meningeal swabs or other tissue samples were collected from pig mortalities and submitted for culture and *S. suis* serotyping. Isolation was performed by culture in blood agar and identification of *S. suis*-like colonies by PCR (11). Identified *S. suis* isolates were further serotyped by PCR (12).



## **Statistical analyses**

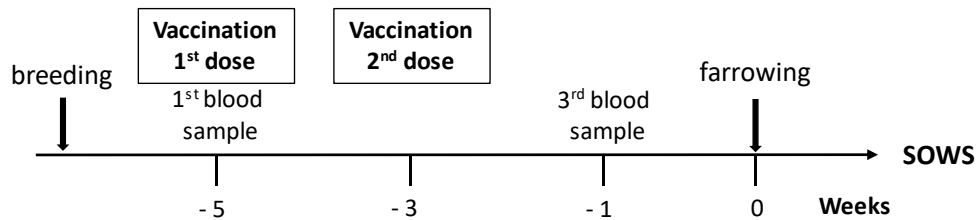
Data of ELISA were log-10 transformed to normalize distributions. A linear mixed model was used with sampling time as the within-subject fixed effect, group (vaccinated or not vaccinated) as the between-subject fixed effect, and identification (id) as random effect. For Experiment 1, piglet id was used. For Experiment 2, sow id was used for sow serology analyses; in the case of piglets, sow id and piglet id nested within sow were used as random effect. The model also took into account unequal variances in the two groups. A priori contrasts were performed to compare pairs of means adjusting the alpha level for each comparison with the sequential Benjamini-Hochberg procedure. In the analysis of IgG1 and IgG2 subclasses in sow sera, equal variance *t*-test was used to compare means according to status. For OPA analyses, data were arcsine square-root transformed to normalize distributions. Statistical analyses were performed using SAS 9.4 (Cary, NC). The level of statistical significance was set at 0.05.

### Experiment 1:

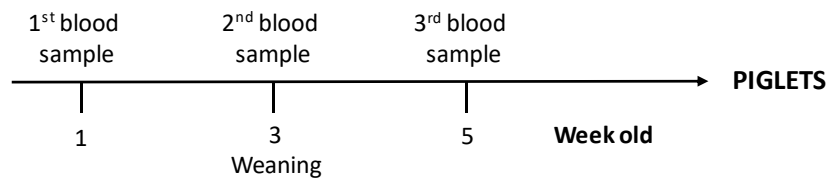


### Experiment 2:

**A**



**B**



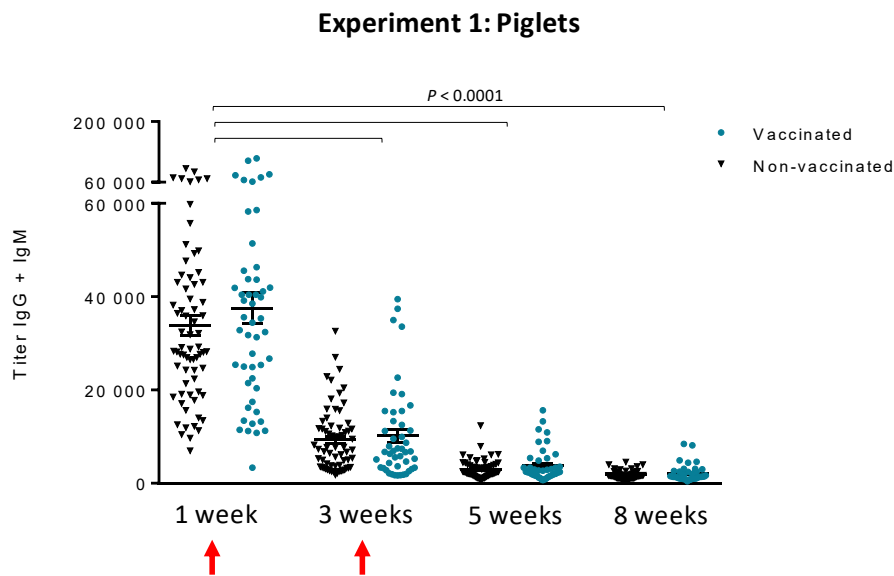
**Figure 1. Experimental design of the field study. Experiment 1:** Piglets were from non-vaccinated sows and were vaccinated during the first week at 4 days  $\pm$ 2 and at weaning with the autogenous vaccine. Blood samples were collected from randomly chosen piglets at 1, 3, 5 and 8 weeks of age. Control (including placebo animals) were also included. **Experiment 2: (A)** Sows were at their parity 0 and received two doses of autogenous vaccine intramuscularly at 5 and 3 weeks before farrowing. Blood samples were taken from all enrolled sows prior to vaccination at 5 weeks before farrowing and at 1 week before farrowing, 2 weeks after the 2<sup>nd</sup> dose. **(B)** Randomly selected piglets from vaccinated and non-vaccinated sows were sampled at 1, 3, and 5 weeks of age.

## RESULTS

### EXPERIMENT 1: PIGLET VACCINATION

**An active vaccination program of piglets with an autogenous bacterin fails to increase antibody levels post-weaning.**

The kinetics of total Ig [IgG + IgM] using *S. suis* serotype 7 whole bacteria as antigen induced by a 2-dose vaccination program applied to piglets was quantitatively evaluated (Figure 2). No differences were observed between animals that received adjuvant only and other non-vaccinated animals (data not shown). Therefore, results from these animals were grouped together for all subsequent analyses. No statistically significant differences were observed between vaccinated and non-vaccinated animals at any time point evaluated (Figure 2).



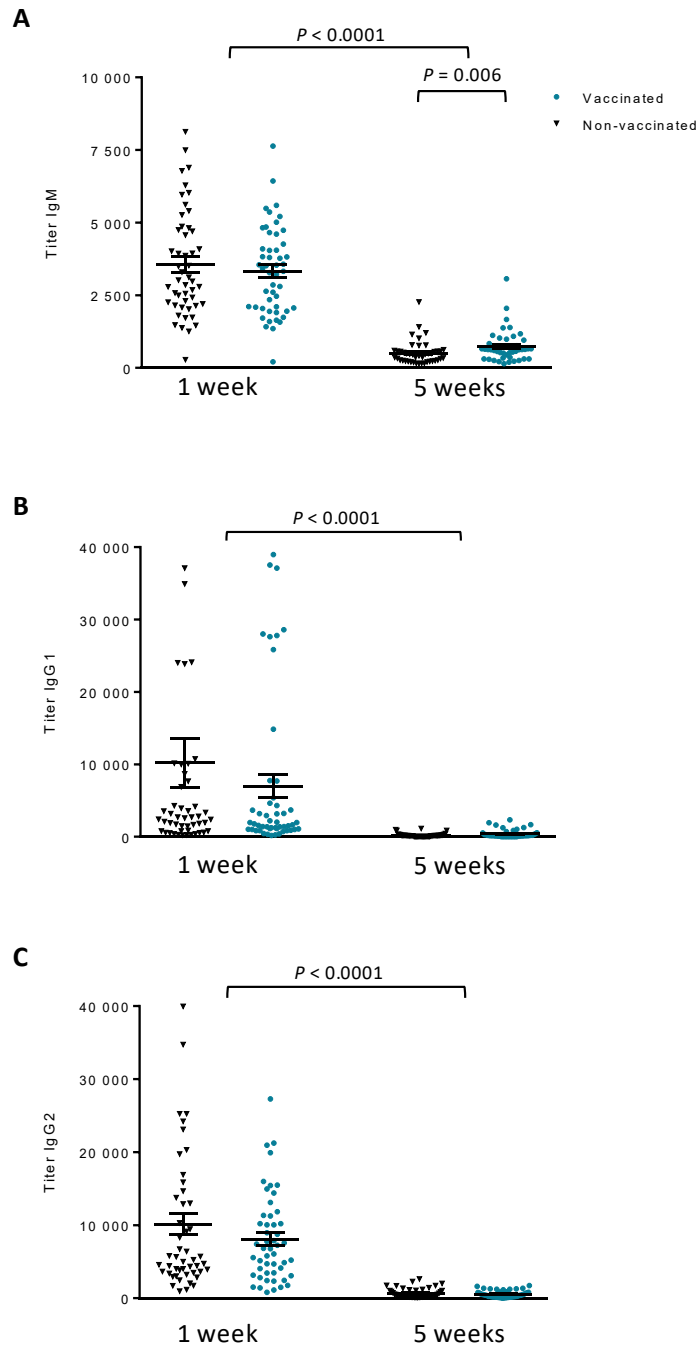
**Figure 2. Experiment 1: Kinetics of total Ig against *S. suis* serotype 7 in piglets.** Blood samples were collected from randomly chosen (and tagged) piglets at 1, 3, 5 and 8 weeks of age from 50 vaccinated and 70 non-vaccinated (including the 20 placebos) animals to follow the immune response. The vaccination protocol is shown in Figure 1. Total Ig [IgG + IgM] titers were determined by ELISA. Antibody titers for individual piglets are shown with horizontal bars representing mean  $\pm$  SEM. Values significantly different are shown in the graph with corresponding  $P$  value. Arrows indicate 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> vaccination doses.

Interestingly, antibody levels were very high before vaccination in the 1<sup>st</sup> week, probably of maternal origin. However, levels were significantly ( $P < 0.0001$ ) lower at 3 weeks of age and continued to decrease (average of  $3284 \pm 258$ ) until 5 weeks of age, at the moment of the onset of *S. suis*-related clinical signs (see [Figure 5](#)). Vaccination of piglets failed to increase their antibody levels or duration.

**The isotype profile of the antibody response in piglets was unchanged by vaccination with the autogenous bacterin.**

Analysis of total Ig [IgG + IgM] antibodies detected (using the vaccine strain of *S. suis* serotype 7) might not accurately discriminate differences in individual Ig isotypes. To this aim, serum samples obtained before vaccination and at 5 weeks of age (after the 2<sup>nd</sup> vaccination) were used to quantify levels of IgM, IgG1 and IgG2 ([Figure 3](#)). Before vaccination, the antibody response present in the sera, probably of maternal origin, was mainly composed of IgG1 and IgG2 isotypes, with lower levels of IgM. At 5 weeks of age, the level of all isotypes dropped independently of vaccination, when compared to levels at 1 week ( $P < 0.0001$ ). Overall, no differences were observed in the Ig isotype profile between vaccinated and non-vaccinated piglets. Only titers of IgM were slightly, but significantly, higher in vaccinated than in non-vaccinated animals at 5 weeks of age ( $P = 0.006$ ).

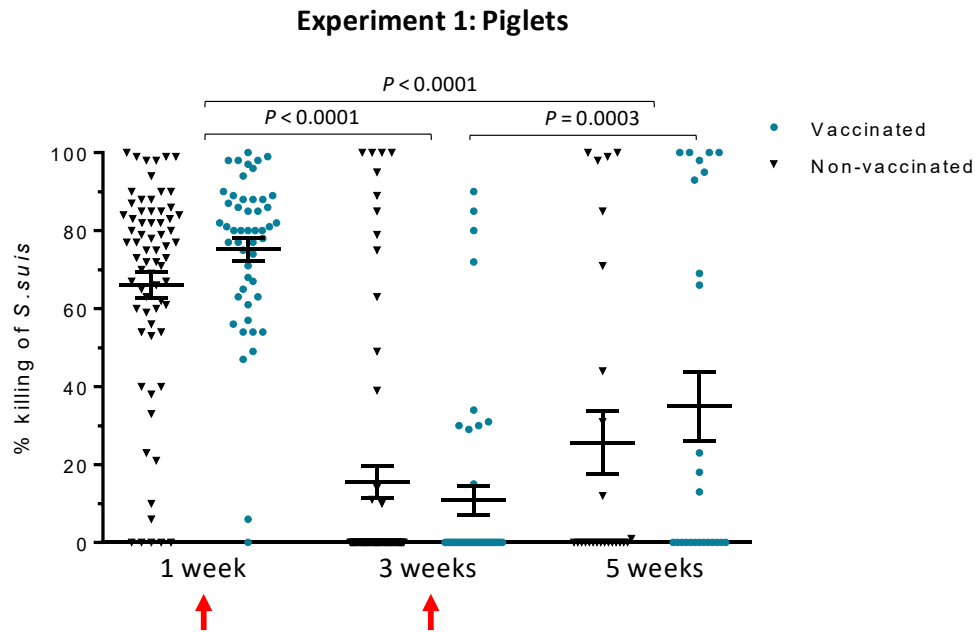
### Experiment 1: Piglets



**Figure 3. Experiment 1: Isotype profile of antibodies against *S. suis* serotype 7 in piglets.** Blood samples were collected from randomly chosen (and tagged) piglets at 1 and 5 weeks of age from 50 vaccinated and 50 non-vaccinated (including the 20 placebos) animals to evaluate (A) IgM titers, (B) IgG1 titers, and (C) IgG2 titers by ELISA. The vaccination protocol is shown in Figure 1. Antibody titers for individual piglets are shown with horizontal bars representing mean  $\pm$  SEM. Values significantly different are shown in the graph with corresponding *P* value.

**An active vaccination program of piglets with an autogenous bacterin fails to improve the killing capacity of antibodies.**

In vaccine studies, *in vitro* functional assays, such as the opsonophagocytosis assay (OPA test), complement ELISA titers for evaluating protection are largely used in human medicine as a correlate of immunity. The OPA test evaluates the capacity of vaccine-induced antibodies to kill bacteria in the presence of phagocytic cells. Such assays are normally performed using phagocytic cell lines or purified cell types, which underestimates the complexity of blood bactericidal activity. In this study, we standardized an OPA test using swine whole-blood as effector cells, in a format that requires small serum quantities. After incubation, viable bacterial counts are performed. The percent of bacterial killing is determined by comparing bacterial numbers in sample tubes with those in negative control tubes. As such, the positive control used was considered showing 100% of killing (data not shown). Sera at 1 week, 2 weeks after the first vaccine dose (3 weeks of age) and 2 weeks after the second vaccine dose (5 weeks of age) were evaluated in the OPA test. Results showed no statistically significant differences between vaccinated and non-vaccinated animals at any time point evaluated (Figure 4). Nevertheless, within the vaccinated group, animals having received their 2<sup>nd</sup> dose (5 weeks of age) showed a slightly higher OPA activity than those having their first dose (3 weeks of age) ( $P = 0.0003$ ). Noticeably, before vaccination, maternal-derived antibodies were already highly opsonizing and thus able to induce bacterial elimination by phagocytic cells. Yet, the OPA activity of these antibodies was significantly reduced at 3 and 5 weeks of age ( $P < 0.0001$ ), with no differences between vaccinated and control animals.



**Figure 4. Experiment 1: Opsonophagocytosis killing of *S. suis* serotype 7 induced by serum antibodies from piglets.** Blood samples were collected from randomly chosen piglets at 1, 3, and 5 weeks of age. Blood samples from 50 vaccinated and 70 non-vaccinated (including the 20 placebos) at 1 and 3 weeks of age, and from 25 vaccinated and 25 non-vaccinated (including the 20 placebos) at 5 weeks of age have been tested in an opsonophagocytosis assay (OPA) to evaluate their functionality. For OPA, blood leukocytes were mixed with *S. suis* serotype 7 (vaccine strain) at a multiplicity of infection of 0.01. Control sera or sample sera from vaccinated piglets or non-vaccinated piglets were added to a final concentration of 40% v/v in microtubes which were incubated for 4 h. After incubation, viable bacterial counts were performed and the percentage of bacterial killing were determined. Results are expressed as % of bacterial killing for individual sera, with horizontal bars representing mean  $\pm$  SEM. Values significantly different are shown in the graph with corresponding *P* value. Arrows indicate 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> vaccination doses.

**Clinical outcome was not improved by an active vaccination program of piglets with an autogenous bacterin.**

Mortality and injectable treatments were recorded by farm staff daily in the three nursery rooms (total of 1494 piglets; 583 vaccinated and 911 non-vaccinated). As shown in [Table 1](#), overall mortality rate was 6%; with a rate of 5.3% in the vaccinated group and of the 6.5 % in the non-vaccinated group. The incidence rate of total injectable treatments was 0.73% in vaccinated animals and of the 0.89% in non-vaccinated ones ([Table 2](#)).

**Table 1**

Distribution of mortality among vaccinated and non-vaccinated piglets.

<b>Experiment 1<sup>a</sup></b>	All dead		<i>S. suis</i> related death		Alive	Total pigs
Vaccinated	31	5.32%	28	4.80%	552	583
Non vaccinated	59	6.48%	50	5.50%	852	911
Total Pigs	90	6.02%	78	5.22%	1404	1494

<sup>a</sup> Vaccinated (n = 583) and non-vaccinated (n = 911) piglets were followed clinically. *S. suis* related death rate was calculated recognizing limits without autopsy.

**Table 2**

Distribution of treatment data among vaccinated and non-vaccinated piglets in the post weaning period.

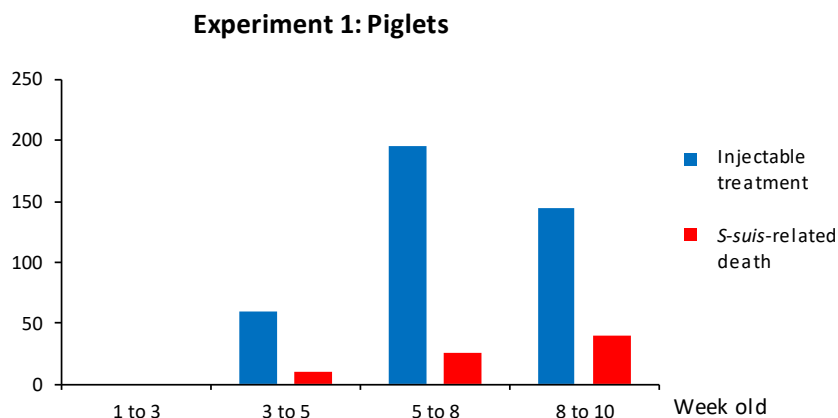
<b>Experiment 1<sup>a</sup></b>	Number of injectable treatments	Time in pig weeks (N pigs in each group x N days in nursery)	Incidence rate of treatments
Vaccinated	208	28567	0.73%
Non-vaccinated	398	44639	0.89%
Total treatments	606	73206	0.83%

N = number

<sup>a</sup> Vaccinated (n = 583) and non-vaccinated (n = 911) piglets were followed clinically. The number of injectable treatments given to sick pigs was recorded. One pig could have received more than one injection.

Other than mortality due to sudden death, clinical signs related to *S. suis* were mostly associated to arthritis and meningitis. The kinetics of *S. suis*-related mortality and *S. suis*-related injectable treatments (such as penicillin G) showed that evidence clinical disease started at 5 weeks of age (Figure 5). Mortality gradually increased over 8 weeks of age. *S. suis*-related mortality was 4.8 % in vaccinated animals and 5.5 % in non-vaccinated animals (Table 1). When bacterial isolation and serotyping was possible, serotype 7 was found as expected. Surprisingly, *S. suis* serotype 9 was also recovered in pure culture for several clinical samples. Nevertheless, a systematic epidemiological survey could not be performed to determine the relative frequencies of these serotypes in clinical cases, since samples from all cases were not sent to the laboratory.



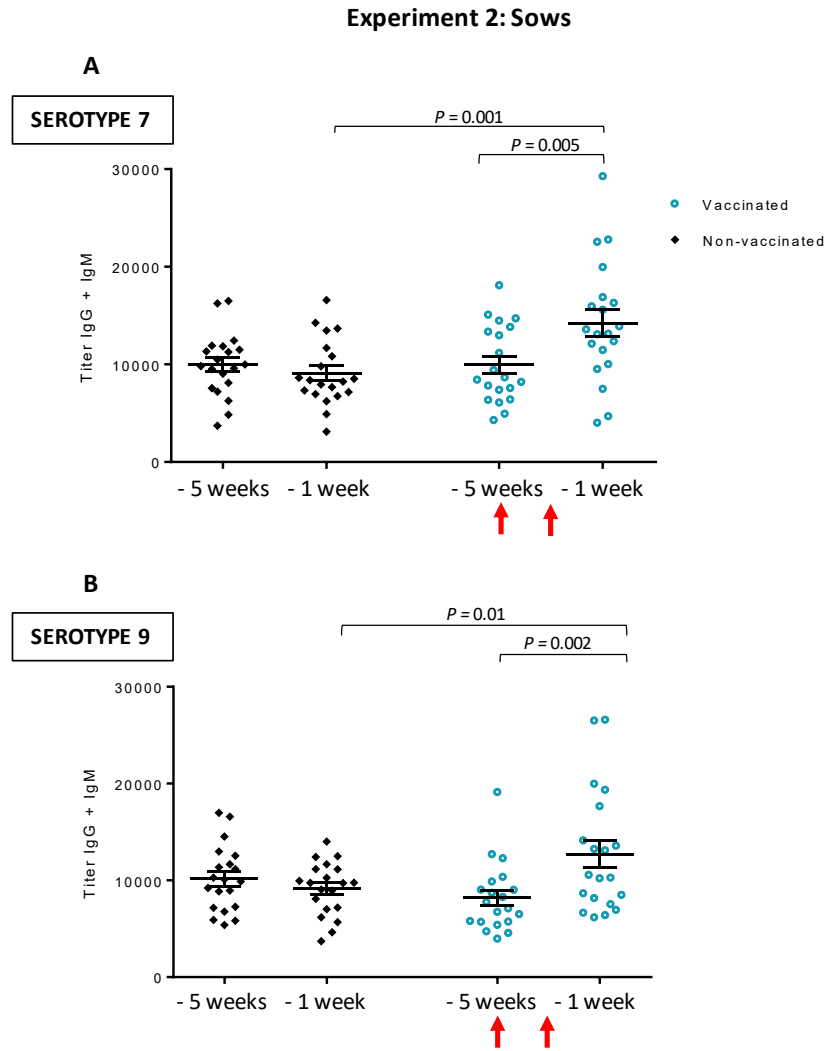


**Figure 5. Experiment 1: Number of *S. suis*-related injectable treatments and *S. suis*-induced number of deaths in piglets over time.** Piglets from non-vaccinated sows were selected (n = 1494). During the 1<sup>st</sup> week, at 4 days  $\pm$ 2, each litter was randomly divided into two groups. Group 1 (“vaccinated group”; n = 583) received the autogenous vaccine (as shown in Figure 1) and group 2 was processed normally (“non-vaccinated group”; n = 911). Each litter was roughly divided equally into each group. All farrowings over the course of 1 week were enrolled in the trial. All piglets were randomly weaned into three nursery rooms, with pigs from group 1 and 2 mixed in each pen. *S. suis*-related mortality and injectable treatments were recorded from all enrolled piglets by farm staff daily by room. Pigs were identified as ear notched or not, and there were no individual pig identifiers. As such, an individual pig could be represented more than once in the data set for treatments. Pigs were followed until the end of the nursery period at approximately 10 weeks of age. In this graph, only *S. suis*-related mortality and injectable treatments are displayed.

## EXPERIMENT 2: SOW VACCINATION

### Antibody levels against the autogenous vaccine are increased in vaccinated sows, yet the Ig isotype profile differs between the serotypes.

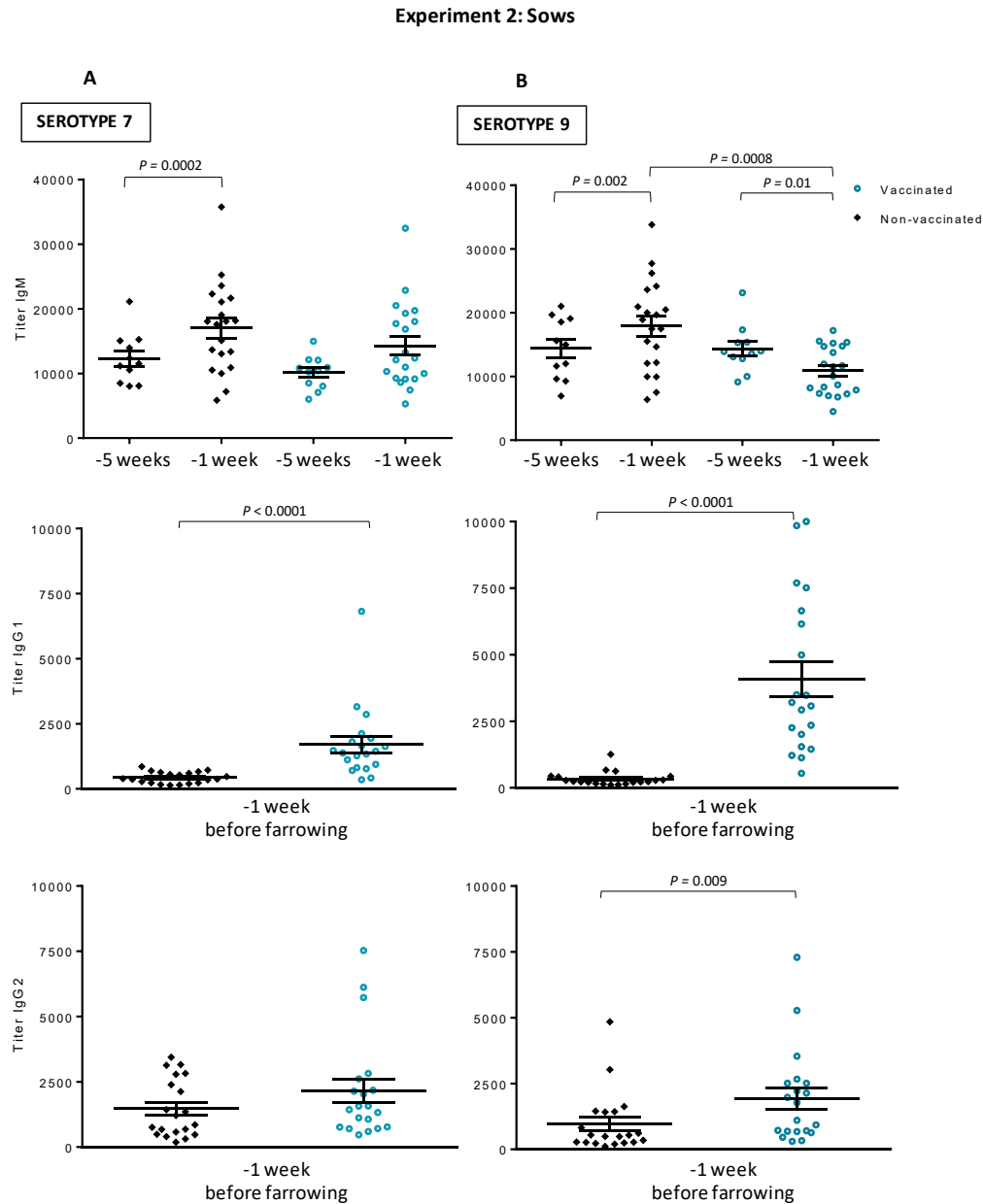
Due to the finding showing that *S. suis* serotype 9 was also clinically important in the herd, the producer decided to include both, serotype 7 and serotype 9 strains in the *S. suis* autogenous bacterin used for the 2-dose vaccination program of sows (Experiment 2, Figure 1). Levels of total Ig [IgG + IgM] against *S. suis* serotype 7 or *S. suis* serotype 9 were already very high before vaccination (Figure 6). Interestingly, titers significantly increased after the 2<sup>nd</sup> vaccine dose as measured one week before farrowing (Figure 6).



**Figure 6. Experiment 2: Total Ig levels against *S. suis* serotype 7 (A) or serotype 9 (B) in sows.** Blood samples were collected 5 weeks and 1 week before farrowing from 20 vaccinated and 20 non-vaccinated sows to follow the immune response. The vaccine was administered at 5 and 3 weeks before farrowing. Total Ig [IgG + IgM] titers were determined by ELISA. Antibody titers for individual sows are shown with horizontal bars representing mean  $\pm$  SEM. Values significantly different are shown in the graph with corresponding  $P$  value. Arrows indicate 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> vaccination doses.

A vaccination that works supposed to induce not only a higher anti-*S. suis* Ig levels but also isotype switching from IgM to IgG, as normally evidenced by a reduction in IgM and an increase in IgG subclasses during a secondary immune response (Figure 7). This was clearly observed for serotype 9 (Figure 7B), as vaccinated sows presented a reduced titer of IgM and increased levels of IgG. Both, IgG1 and IgG2 subclasses against serotype 9 were higher in vaccinated sows compared to non-vaccinated controls; however, IgG1 was the most dominant antibody subclass. Isotype

switching against serotype 7 was less evident, with only a significant increase in IgG1 observed in vaccinated animals compared to controls (Figure 7A). In the control group, IgM levels were significantly higher at -1 week than at -5 weeks before farrowing.

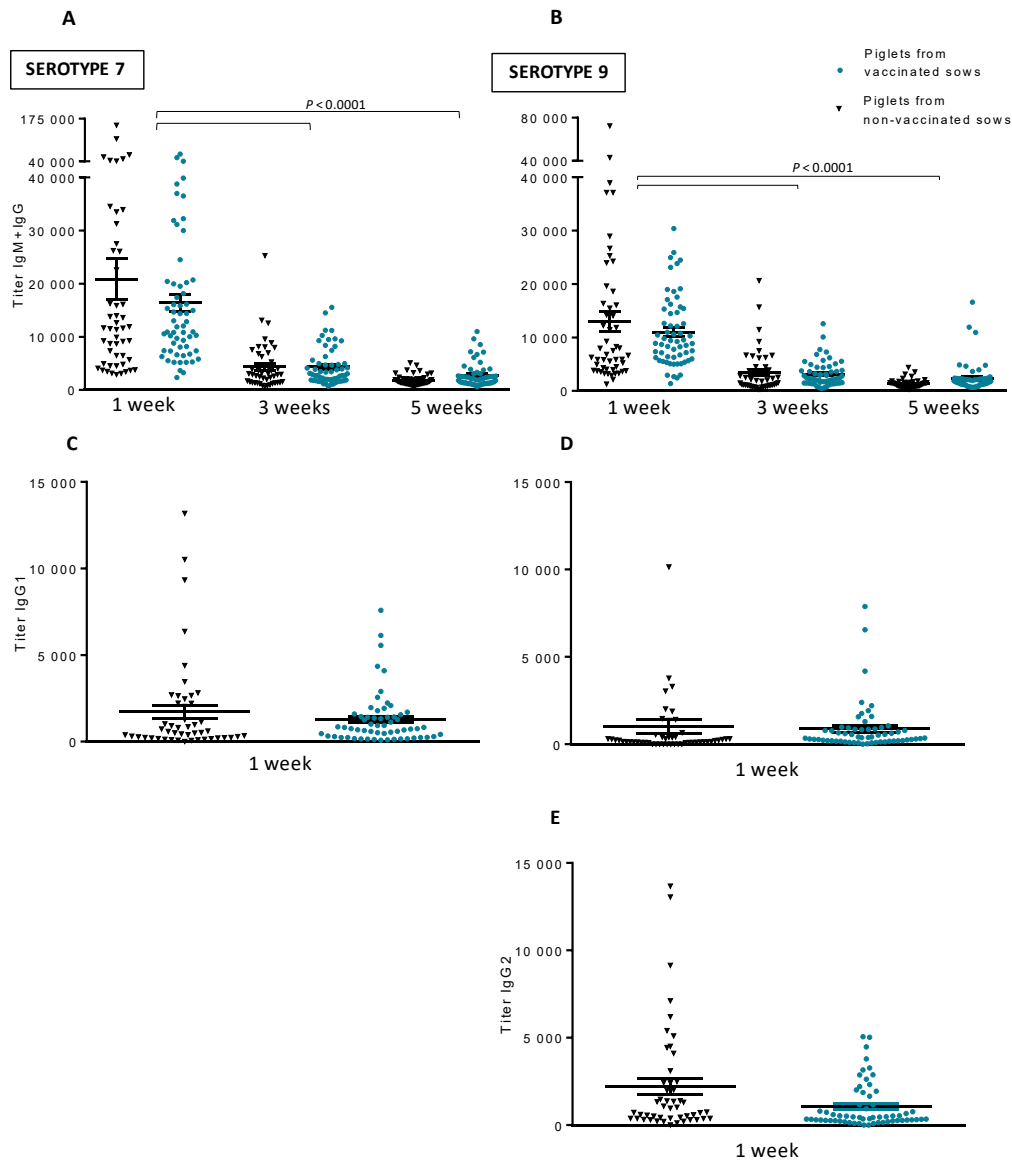


**Figure 7. Experiment 2: Isotype profile of antibodies against *S. suis* serotype 7 (A) or serotype 9 (B) in sows.** Blood samples were collected 5 weeks and 1 week before farrowing from 20 vaccinated and 20 non-vaccinated sows to follow the immune response. The vaccination protocol is shown in Figure 1. IgM, IgG1 and IgG2 titers were determined by ELISA. Antibody titers for individual sows are shown with horizontal bars representing mean  $\pm$  SEM. Values significantly different are shown in the graph with corresponding  $P$  value.

### **Maternal antibody transfer to piglets is not increased after sow vaccination.**

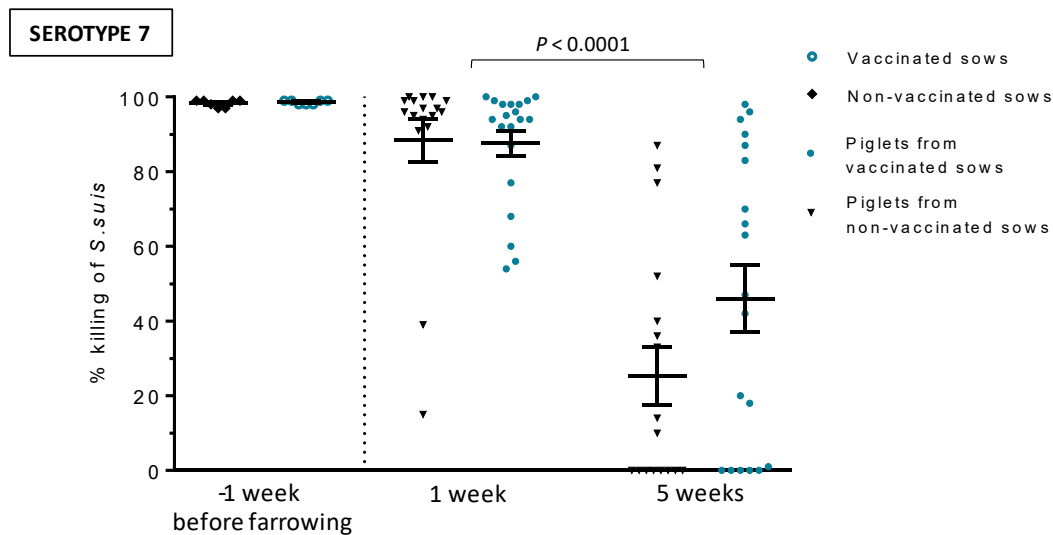
The goal of sow vaccination is to induce an increase of maternal antibody transfer to piglets through colostrum intake. In spite of higher levels of anti-*S. suis* Ig [IgG + IgM] induced in sows by the autogenous bacterin, piglets from vaccinated sows showed similar levels of antibodies either against serotype 7 or serotype 9 than piglets from non-vaccinated sows at 1 week (Figures 8A and 8B). Vaccination of sows did not improve duration of maternal antibodies in piglets, titers were already low at weaning. Since IgG1 and IgG2 subclasses against serotype 9 and IgG1 subclass against serotype 7 were significantly increased in vaccinated sows, we analyzed if these particular IgG subclasses were also predominantly transferred to piglets. However, isotype profile of piglets from vaccinated sows was similar to that of piglets from non-vaccinated sows (Figures 8C-E). Finally, the functional ability of the antibodies was also evaluated using serotype 7 as a model and for comparative purposes with the first part of the study. As show in Figure 9, the OPA activity of antibodies in sows 1 week before farrowing was 100% in both groups. Due to maternal transfer of these functionally active antibodies, OPA capacity was also high in the sera of piglets at 1 week, with no differences between piglets derived from vaccinated vs. non-vaccinated sows (Figure 9;  $P = 0.76$ ). As observed in Experiment 1 (Figure 4), OPA activity of antibodies was significantly lower at 5 weeks of age. At this age, levels are similar in both groups ( $P = 0.041$ ; considered as non-significant).

Experiment 2: Piglets



**Figure 8. Experiment 2: Kinetics of total Ig and isotype profile of antibodies against *S. suis* serotype 7 or serotype 9 in piglets from either vaccinated or non-vaccinated sows.** Randomly selected 120 piglets (3 piglets/sow, for a total of 60 piglets/group) from vaccinated and non-vaccinated sows were originally included in the serological study. Nevertheless, 9 piglets from 3 different non vaccinated sows could not be identified, for a total of 51 piglets finally enrolled for serology in this group. Piglets were sampled at 1, 3, and 5 weeks of age and total Ig [IgG + IgM] titers were determined by ELISA against *S. suis* serotype 7 (A) or serotype 9 (B). Piglets were sampled at 1 week to evaluate titers of IgG1 against *S. suis* serotype 7 (C) or serotype 9 (D) and titers of IgG2 against *S. suis* serotype 9 (E). Antibody titers for individual piglets are shown with horizontal bars representing mean  $\pm$  SEM. Values significantly different are shown in the graph with corresponding  $P$  value.

## Experiment 2: Sows and piglets



**Figure 9. Experiment 2: Opsonophagocytosis killing of *S. suis* serotype 7 induced by serum antibodies from sows and from their piglets.** Blood samples were collected 1 week before farrowing from seven vaccinated and seven non-vaccinated sows and from randomly chosen piglets (1 per sow) at 1 and 5 weeks of age ( $n = 20$  per group) to evaluate their functionality in an opsonophagocytosis assay (OPA). For OPA, blood leukocytes were mixed with *S. suis* serotype 7 (vaccine strain) at a multiplicity of infection of 0.01. Control sera or sample sera from vaccinated or non-vaccinated animals were added to a final concentration of 40% v/v in microtubes which were incubated for 4 h. After incubation, viable bacterial counts were performed and the percentage of bacterial killing determined. Results are expressed as % of bacterial killing for individual sera, with horizontal bars representing mean  $\pm$  SEM. Values significantly different are shown in the graph with corresponding  $P$  value.

### **Weaned piglets are not clinically protected after a sow vaccination program with two doses of the *S. suis* autogenous bacterin.**

A total of 207 piglets from vaccinated sows and 183 piglets from non-vaccinated sows were followed for clinical outcomes and injectable treatments were recorded. The overall mortality rate related to *S. suis* disease was 3.3%; with a rate of 3.4% in the vaccinated group and of the 3.3% in the non-vaccinated group (Table 3). Mortality and clinical signs related to *S. suis* were similar to those described above (Figure 5). The kinetics of *S. suis*-related mortality and *S. suis*-related injectable treatments (such as penicillin G) showed that clinical disease peaking between 3 and 5

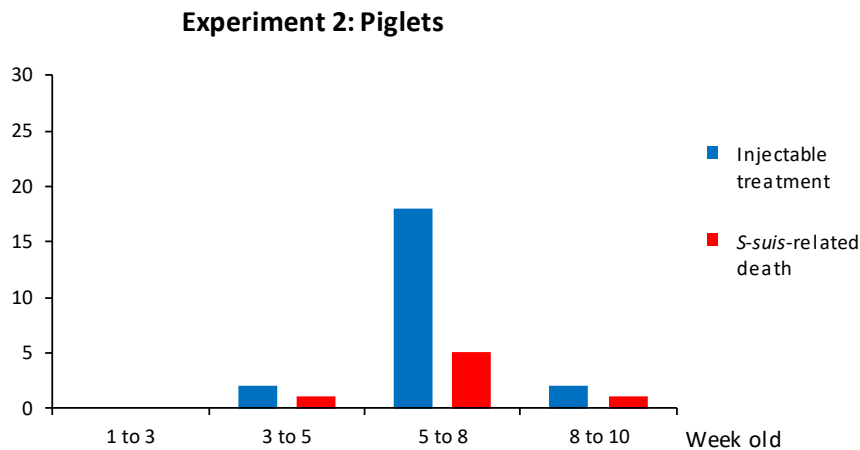
weeks of age (Figure 10). When bacterial isolation and serotyping was possible, either serotype 7 or serotype 9 were found in brain and joint swabs of clinically affected animals.

**Table 3**

Distribution of mortality among piglets from vaccinated and non-vaccinated sows.

Experiment 2 <sup>a</sup>	All dead		<i>S. suis</i> related death		Alive	Total pigs
Vaccinated	7	3.38%	7	3.38%	200	207
Non vaccinated	6	3.28%	6	3.28%	177	183
Total Pigs	13	3.33%	13	3.33%	377	390

<sup>a</sup> Piglets from vaccinated sows (n = 207) and piglets from non-vaccinated sows (n = 183) were followed clinically. *S. suis* related death rate was calculated recognizing limits without autopsy.



**Figure 10. Experiment 2: Number of *S. suis*-related injectable treatments and *S. suis*-induced number of deaths in piglets over time.** A total of 207 piglets from vaccinated sows and 183 piglets from non-vaccinated sows were enrolled in the trial. All piglets were weaned into one nursery room, with mixed vaccinated and non-vaccinated groups in each pen. Total and *S. suis*-related mortality and injectable treatments were recorded from all enrolled piglets by farm staff daily by room. Pigs were identified as notched or not notched, and there were no individual pig identifiers. As such, an individual pig could be represented more than once in the data set for treatments. Pigs were followed until the end of the nursery period. In this graph, only *S. suis*-related mortality and injectable treatments are displayed.

## DISCUSSION

In the era of antibiotic restrictions, new social consumption trends and lack of efficacious commercial vaccines, autogenous bacterins dominate the market with the intention to control *S. suis* infection in pigs. However, and to the best of our knowledge, only two published articles have addressed the efficacy of this preventive approach in the field with inclusion of control groups and using a licensed (and not experimental) vaccine. In the recent study of Hopkins *et al.* (13), vaccine effectiveness was evaluated on a farrow-to-finish farm experiencing mortality due to *S. suis*. Direct, indirect, total, and overall vaccine effectiveness were analyzed by vaccinating 75% of pigs in each litter. The selected pigs received the autogenous *S. suis* serotype 2 vaccine, at weaning and a booster 3 weeks after entering the nursery. The direct effect of vaccination (mortality due to *S. suis*) was not statistically significant. However, the calculated total and overall vaccine effectiveness (complete herd-level mortality) showed potential protective effects; yet mortality due to any cause was considered here. In the study of Torremorel *et al.* (14), piglets were vaccinated at weaning and boosted 10 days later and mortality and morbidity rates in nursery pigs fluctuate regardless of treatment. These results are in agreement with our clinical data and suggest that successful control of *S. suis*-related disease by an autogenous vaccination program remains to be more carefully assessed. The vaccination strategy might have an impact on vaccine effectiveness, including the time of piglet prime and boost vaccination or the number of required doses in sows accordingly to parity. The dynamics of *S. suis* infection in the herd might also affect the conclusions that can be driven from field studies as suggested in previous published works (13,14). In our study, the emergence or misplacing of serotype 9 in the piglet vaccination program could have affected the vaccine capacity to reduce *S. suis*-related clinical signs in the farm. Indeed, the serotype 9 could possibly have been in the farm since the beginning but was not detected earlier. Another important confounding factor is the assessment of total mortality or total treatments instead of those directly related to *S. suis* disease. If an outbreak of an unrelated disease was present in the farm and further controlled during the vaccination trial, the improvement in health may not be directly linked to the vaccine effect. The opposite, such as a concomitant infection with causing piglet mortality, may also negatively affect the evaluation of the autogenous vaccine. Finally, the use of preventive medication which differs from farm to farm also complicates the analysis of clinical data; by masking the real effect of the vaccine and/or keeping *S. suis*-related mortality levels very low which compromises statistical power. Another important aspect of vaccine evaluation is the study of the



underlying immunological responses induced by the vaccine that can be scientifically and directly linked to vaccine effectiveness. Indeed, our study is the first to characterize the antibody response in terms of magnitude, kinetics, isotype profiling and functionality; all key aspects in vaccinology. *S. suis* is an encapsulated pathogen and its thick capsular polysaccharide protects the bacterium against immune system clearance by phagocytic cells, thus allowing *S. suis* systemic dissemination (15). This natural resistance of *S. suis* is overcome if highly opsonic antibodies recognizing surface-exposed bacterial components are present. These antibodies will induce rapid bacterial uptake by phagocytic cells and consequent destruction (16). As such, when evaluating the efficacy of a *S. suis* vaccination program it is also vital to analyze the OPA activity of vaccine-induced antibodies.

In this study, an active vaccination program of piglets failed to induce a significant increase in anti-*S. suis* antibody levels, or changes in the isotype profile as evaluated by ELISA, or functionality as measured by the OPA test. Only a small increase in IgM levels was observed after boost vaccination of piglets. At this time point (5 weeks of age) an increase in OPA activity was also observed compared to that observed after prime vaccination. Yet, overall no differences with the placebo group were observed in the OPA test. Albeit promising, the biological implication of an increase in these parameters was limited as no clinical protection was observed at this time point, which coincided with an increase of *S. suis*-related disease in the nursery.

The immunological characterization of the antibody response at approximately 1 week of age (before piglet vaccination) also revealed impressively high levels of antibodies, most probably of maternal origin, and this independently of sow vaccination. This response was mainly composed, as expected for maternal antibodies, of IgG1 and IgG2 and lower levels of IgM. This maternal antibody response was highly opsonic, yet not lasting enough to confer protection in the postweaning period. Indeed, at the moment of appearance of *S. suis* clinical signs, antibody levels in piglets were already very low, independently of the vaccination program used. Similarly to our findings, an experimental study showed that neither application of *S. suis* bacterin to preparturient sows nor that to suckling piglets or both elicited protection in 8-week-old piglets, which was explained by the lack of opsonizing antibodies. Serum half-life for maternal IgG in suckling piglets was estimated around 6 to 10 days (17, 18). A previously published serological cross-sectional profile of unvaccinated piglets also showed a significant decrease in anti-*S. suis* antibody levels after 2 weeks of age, with the lowest values occurring between 6 and 8 weeks.

Based on these observations, it could be expected a high maternal interference when vaccinating piglets during the first two weeks of age. In a previous field study using an experimental bacterin (19), the response to the vaccine varied considerably among pigs and was attributed, at least in part, to the levels of maternal antibodies at the time of vaccination. In the experimental study of Baums *et al.* (18), the missing or weak immune responses observed with regard to suckling piglet vaccination (two-doses at 2 and 4 weeks of age) was potentially related to either inhibition by maternal antibodies and other colostrum components or immature adaptive immunity in suckling piglets. Therefore, more research is needed to evaluate the perfect age window for piglet vaccination in order to avoid maternal interference but confer protection at the moment of *S. suis* clinical signs onset.

The immunological characterization of the antibody response during the sow vaccination experiment notably revealed that basal antibody levels against *S. suis* in sows are already very high. This was also noticed in previous studies (18, 19). These antibodies are generated by either natural exposition of animals to *S. suis* in the farm, especially taking into account that this bacterial species is part of the normal microflora of pigs, or by cross-reactions with other commensal bacterial species, including other streptococci. A two-dose vaccination program of sows before farrowing significantly increased anti-*S. suis* antibody levels, with isotype switching towards IgG1 mainly. However, this increased response in sows was not sufficient to significantly improve maternal antibody transfer to piglets and thus their clinical protection over time. Interestingly, although levels of maternal antibodies of piglets from either vaccinated or non-vaccinated sows were very high during the first week of age, an important variation in the antibody titers (with a few piglets presenting very low values) was observed. This was also previously noticed in another study (19). Possible explanations may include lack of sufficient colostrum intake or intestinal absorption problems in those piglets.

The OPA activity of sow antibodies was already 100% before vaccination and thus no changes can be expected by a vaccination program of sows. The high levels of sow antibodies as detected by ELISA and high level of opsonic antibodies as measured by the OPA test may explain the usual lack of clinical disease in adult animals (1). In addition, in spite of increased titer levels in sows, OPA activity of maternal-derived antibodies in piglets from vaccinated sows was similar to that

observed in the control group. Overall, the vaccination program applied to sows in our study failed to improve pre-existing natural protective immunity and its functionality in piglets. Sow vaccination programs are highly variable, this can affect the vaccine response and remains to be fully evaluated in a field comparative study.

The isotype profile of vaccine-induced antibodies is important in the fight against *S. suis*, as this is linked to the capacity of certain isotypes to induce opsonophagocytosis while other isotypes are known to be poorly opsonic (20, 21). In this study, results showed that IgM naturally increased, probably as the result of continuous exposition of animals to *S. suis* or cross-reacting bacteria from microflora, including other streptococci. Regarding isotype switching, the adjuvant is the main component of the vaccine formulation driving isotype switch and this aspect has not been scientifically evaluated in field vaccination with autogenous bacterins. This may be explained by the use of vaccines prepared by licensed private companies, which do not usually disclose the formulation. The vaccine formulation used in this study seems to favor, at least in sows, production of IgG1 subclass, which has been previously suggested to be poorly protective in the context of *S. suis* infections (20). The vaccine antigen itself can also influence the isotype switching and/or antibody functionality (22, 23). In this study, isotype switching was less efficiently induced by serotype 7 compared to serotype 9 vaccine-component. As such, the impact of autogenous vaccine formulation on its efficacy needs to be carefully studied, including the effect of the adjuvant and the possible interference by inclusion of multiple *S. suis* serotypes and strains, as is commonly used in the field.

In conclusion, autogenous bacterins are presently the only preventive tool available for swine producers, as an alternative to antimicrobials, to control *S. suis* infections. This promising approach requires extensive and comparative scientifically-sound studies to evaluate the most efficacious way to prepare the vaccine, the adjuvant to be included, the number of doses, age of piglet vaccination and the real benefit of vaccinating sows, or piglets or both.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sonia Lacouture and Guillaume Goyette-Desjardins for their technical assistance. This work was mainly supported by the Programme Innov'Action agroalimentaire of the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ) grant (no. IA119059) to MG and MS. Partial support was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through grants to M.S. (no. 342150) and to M.G. (no. 04435). LC is the recipient of a Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre scholarship supported by the Fonds de recherche du Québec—Nature et technologies (grant no. RS-170946) and of a Zoetis graduate student scholarship.

## REFERENCES

1. Gottschalk M, and Segura, M. . Streptococcosis. In: Zimmerman JJ, Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., Stevenson, G. W. and Zhang, J., editor. Diseases of swine. 11th ed. West Sussex, UK. : Wiley-Blackwell; 2019.
2. Nomoto R, Maruyama F, Ishida S, Tohya M, Sekizaki T, Osawa R. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22 and 26: *Streptococcus parasuis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2015;65(Pt 2):438-43.
3. Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent - an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. Emerg Microbes Infect. 2014;3(6):e45.
4. Gottschalk M, Lacouture S. Canada: Distribution of *Streptococcus suis* (from 2012 to 2014) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (from 2011 to 2014) serotypes isolated from diseased pigs. Can Vet J. 2015;56(10):1093-4.
5. Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? Future Microbiol. 2010;5(3):371-91.
6. Segura M. *Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress. Expert Review of Vaccines. 2015;14(12):1587-608.

7. Seitz M, Valentin-Weigand P, Willenborg J. Use of antibiotics and antimicrobial resistance in veterinary medicine as exemplified by the swine pathogen *Streptococcus suis*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016;398:103-21.
8. Huang J, Ma J, Shang K, Hu X, Liang Y, Li D, et al. Evolution and diversity of the antimicrobial resistance Associated mobilome in *Streptococcus suis*: a probable mobile genetic elements reservoir for other *Streptococci*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:118.
9. Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*. 1993;31(8):2192-4.
10. Goyette-Desjardins G, Calzas C, Shiao TC, Neubauer A, Kempker J, Roy R, et al. Protection against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a capsular polysaccharide glycoconjugate vaccine. *Infect Immun*. 2016;84(7):2059-75.
11. Ishida S, Tien le HT, Osawa R, Tohya M, Nomoto R, Kawamura Y, et al. Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis*. *J Microbiol Methods*. 2014;107:66-70.
12. Okura M, Lachance C, Osaki M, Sekizaki T, Maruyama F, Nozawa T, et al. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1714-9.
13. Hopkins D, Poljak Z, Farzan A, Friendship R. Field studies evaluating the direct, indirect, total, and overall efficacy of *Streptococcus suis* autogenous vaccine in nursery pigs. *Can Vet J*. 2019;60(4):386-90.
14. Torremorell M, Pijoan C, Trigo E. Vaccination against *Streptococcus suis*: Effect on nursery mortality. *Swine Health Prod*. 1997;5(4):139-43.
15. 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 Microbiol*. 2012;7(2):259-79.
16. Segura M, Calzas C, Grenier D, Gottschalk M. Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses. *FEBS Lett*. 2016;590(21):3772-99.
17. Butler JE, Zhao Y, Sinkora M, Wertz N, Kacs Kovics I. Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. *Dev Comp Immunol*. 2009;33(3):321-33.

18. Baums CG, Bruggemann C, Kock C, Beineke A, Waldmann KH, Valentin-Weigand P. Immunogenicity of an autogenous *Streptococcus suis* bacterin in preparturient sows and their piglets in relation to protection after weaning. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(10):1589-97.
19. Lapointe L, D'Allaire S, Lebrun A, Lacouture S, Gottschalk M. Antibody response to an autogenous vaccine and serologic profile for *Streptococcus suis* capsular type 1/2. *Can J Vet Res.* 2002;66(1):8-14.
20. Li Y, Gottschalk M, Esgleas M, Lacouture S, Dubreuil JD, Willson P, et al. Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(8):937-43.
21. Schreiber JR, Cooper LJ, Diehn S, Dahlhauser PA, Tosi MF, Glass DD, et al. Variable region-identical monoclonal antibodies of different IgG subclass directed to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide O-specific side chain function differently. *J Infect Dis.* 1993;167(1):221-6.
22. Martelet L, Lacouture S, Goyette-Desjardins G, Beauchamp G, Surprenant C, Gottschalk M, et al. Porcine dendritic cells as an *in vitro* model to assess the immunological behaviour of *Streptococcus suis* subunit vaccine formulations and the polarizing effect of adjuvants. *Pathogens.* 2017;6(1).
23. Sela-Culang I, Kunik V, Ofran Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. *Front Immunol.* 2013;4:302.

## **IV. Discussion**

À l'ère des restrictions dans l'utilisation des antibiotiques, des nouvelles tendances de consommation et du manque de vaccins commerciaux efficaces, les bactéries autogènes dominent le marché pour contrôler les infections à *S. suis* chez les porcs. Cependant, et à notre connaissance, seuls 2 articles publiés ont traité de l'efficacité de cette approche préventive sur le terrain en incluant des groupes de contrôle et en utilisant un vaccin produit par une compagnie accréditée (152, 156). Dans la récente étude de Hopkins *et al.* (152), l'efficacité vaccinale directe, indirecte, totale et globale du vaccin a été évaluée par une méthode statistique en vaccinant 75% des porcs dans chaque portée. La réponse immunologique n'a pas été mesurée. Les porcs sélectionnés ont reçu le vaccin autogène *S. suis* de sérotype 2 au sevrage et un rappel 3 semaines après leur entrée en pouponnière. L'effet direct de la vaccination (mortalité due à *S. suis*) n'était pas statistiquement significatif; cependant, l'efficacité totale et globale du vaccin calculée à partir de la mortalité totale du troupeau a montré des effets protecteurs potentiels. La mortalité due à une cause autre que celle de *S. suis* a par ailleurs été considérée dans cette étude. Dans l'étude de Torremorel *et al.* (156), les porcelets ont été vaccinés au sevrage et rappelés 10 jours plus tard. Le taux de mortalité et de morbidité chez les porcs en pouponnière a fluctué quel que soit le traitement. Ces résultats sont en accord avec nos données cliniques et suggèrent que le contrôle de la maladie liée à *S. suis* par un programme de vaccination autogène reste à être évalué plus attentivement. La stratégie de vaccination pourrait avoir un impact sur l'efficacité du vaccin, comme le moment de la première dose de vaccination des porcelets et du rappel ou encore le nombre de doses requises chez les truies en fonction de la parité. La dynamique de l'infection à *S. suis* dans le troupeau pourrait également influencer les conclusions tirées des études sur le terrain, comme suggéré dans les précédents travaux publiés (152, 156). Dans notre étude, la non-détection du sérotype 9 lors du premier diagnostic ou son émergence tardive dans le programme de vaccination des porcelets aurait pu affecter la capacité du vaccin à réduire les signes cliniques liés à *S. suis* dans la ferme (**Annexe 1**). Un autre facteur confondant important est l'évaluation de la mortalité totale ou des traitements totaux au lieu de ceux directement liés à la maladie de *S. suis*. Si l'éclosion d'une maladie non liée à *S. suis*, mais entraînant des mortalités, était présente dans la ferme et qu'elle était traitée au cours de l'essai de vaccination, le contrôle de cette éclosion, au moyen d'autres interventions, pourrait améliorer la situation sanitaire sans être directement lié à l'effet du vaccin. Enfin, l'utilisation de traitements préventifs (qui diffèrent d'une ferme à l'autre) complique également l'analyse des données cliniques; en masquant l'effet réel du vaccin et / ou en maintenant très bas les taux de mortalité liés à *S. suis*, ce qui compromet le pouvoir statistique.



Un autre aspect important de l'évaluation d'un vaccin est l'étude de la réponse immunologique induite par le vaccin, qui peut être scientifiquement et directement liée à l'efficacité du vaccin. Malgré cela, notre étude est la première à caractériser la réponse anticorps en termes de magnitude, de cinétique, de profil isotypique et de fonctionnalité; tous les aspects clés de la vaccinologie. *S. suis* est un agent pathogène encapsulé et sa CPS épaisse protège la bactérie de son élimination par les cellules phagocytaires du système immunitaire, permettant ainsi sa dissémination systémique (41). La résistance naturelle de *S. suis* est vaincue si des anticorps hautement opsonisants, reconnaissant des composants bactériens exposés en surface, sont présents. Ces anticorps vont induire une internalisation rapide des bactéries par les cellules phagocytaires suivi de leur destruction (22). De ce fait, lors de l'évaluation de l'efficacité d'un programme de vaccination contre *S. suis*, il est également essentiel d'analyser l'activité opsonisante des anticorps induits par le vaccin.

Dans cette étude, un programme de vaccination active des porcelets n'a pas entraîné d'augmentation significative du taux d'anticorps anti-*S. suis*, ou de changement de profil isotypique (évalué par ELISA), ou de différence de fonctionnalité de ces anticorps mesurée par le test OPA (« opsonophagocytosis assay »). Seule une légère augmentation des taux d'IgM a été observée après le rappel du vaccin. À ce stade, à l'âge de 5 semaines, une augmentation de l'activité OPA a également été observée par rapport à celle observée après la première vaccination. Pourtant, dans l'ensemble, aucune différence avec le groupe placebo n'a été observée dans le test OPA. Bien que prometteur, l'implication biologique d'une augmentation de ces paramètres était limitée car aucune protection clinique n'avait été observée à ce moment-là, et coïncidait même avec une augmentation de la maladie liée à *S. suis* dans la pouponnière.

La caractérisation immunologique de la réponse anticorps a également révélé des taux très élevés d'anticorps, probablement d'origine maternelle, vers l'âge d'une semaine environ, soit avant la vaccination des porcelets; et ceci indépendamment de la vaccination des truies. Tel qu'attendu pour des anticorps maternels, cette réponse était principalement composée d'IgG1 et d'IgG2 et de taux plus faibles d'IgM. Cette réponse anticorps d'origine maternelle était hautement opsonisante, mais pas assez durable pour permettre une protection des porcelets après le sevrage. En effet, au moment du sevrage, à 3 semaines d'âge, les taux d'anticorps chez les porcelets étaient déjà très faibles, indépendamment du programme de vaccination. De ce fait, lors de l'apparition des premiers signes cliniques de *S. suis* à environ 5 semaines, le faible taux d'anticorps témoigne d'une absence de protection des porcelets. De la même manière que nos résultats, une étude expérimentale a montré que

ni l'application d'une bactérine à *S. suis* aux truies avant parturition, ni celle à des porcelets allaités, ni celle des deux, n'induisait de protection chez les porcelets âgés de 8 semaines; ce qui s'explique par le manque d'anticorps opsonisants (75). La demi-vie sérique des IgG chez les porcelets allaités a été estimée de 6 à 10 jours (75, 165). Un profil sérologique transversal précédemment publié provenant de porcelets non-vaccinés montrait une diminution significative des anticorps anti-*S. suis* après 2 semaines d'âge, les valeurs les plus faibles se situant entre 6 et 8 semaines.

Sur la base de ces observations, on pourrait s'attendre à une forte interférence des anticorps maternels lors de la vaccination des porcelets au cours des deux premières semaines d'âge. Dans une précédente étude de terrain utilisant une bactérine expérimentale (157), la réponse au vaccin variait considérablement entre les porcs et était attribuée, en partie, aux taux d'anticorps maternels au moment de la vaccination. Dans l'étude expérimentale de Baums *et al.* (75), les réponses immunitaires faibles ou absentes observées chez les porcelets vaccinés (deux doses à 2 et 4 semaines) étaient potentiellement liées à une inhibition par des anticorps maternels, ou d'autres composants du colostrum, ou par une immunité adaptative immature chez les porcelets sous la mère. Par conséquent, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer la fenêtre d'âge idéale pour vacciner des porcelets afin d'éviter toute interférence maternelle et permettant à la fois une protection au moment de l'apparition des premiers signes cliniques de *S. suis*.

La caractérisation immunologique de la réponse anticorps lors de l'expérience de vaccination des truies a notamment révélé que les taux d'anticorps basaux dirigés contre *S. suis* chez les truies sont déjà très élevés. Cela a également été constaté dans des études antérieures (75, 157). Ces anticorps sont générés soit par l'exposition naturelle des animaux à *S. suis* dans la ferme, en tenant compte en particulier du fait que cette espèce bactérienne fait partie de la microflore normale des porcs, soit par des réactions croisées avec d'autres espèces bactériennes commensales, notamment des autres streptocoques. Un programme de vaccination à deux doses des truies avant parturition a augmenté significativement les taux d'anticorps anti-*S. suis*, avec une commutation isotypique principalement vers les IgG1. Cependant, cette réponse accrue chez les truies n'était pas suffisante pour améliorer le transfert d'anticorps maternels aux porcelets et donc leur protection clinique au fil du temps. Fait intéressant, bien que les taux d'anticorps maternels des porcelets nés de truies vaccinées et non vaccinées aient été très élevés au cours de la première semaine d'âge, une variation importante des titres d'anticorps (quelques porcelets présentant des valeurs très faibles) a été observée. Cela avait

déjà été noté dans une autre étude (157). Les explications possibles peuvent inclure un manque d'apport suffisant en colostrum ou des problèmes d'absorption intestinale chez ces porcelets.

L'activité OPA des anticorps des truies était déjà de 100% avant la vaccination et aucun changement ne peut donc être anticipé par un programme de vaccination des truies. Les taux élevés d'anticorps de truies détectés par ELISA et le niveau élevé d'anticorps opsonisants tels que mesuré par le test OPA peuvent expliquer l'absence de maladie causée par *S. suis* chez les porcs adultes (166). De plus, malgré l'augmentation du titre des anticorps chez les truies, l'activité OPA des anticorps dérivés de la mère chez les porcelets nés de truies vaccinées était similaire à celle observée dans le groupe non-vacciné. Dans l'ensemble, le programme de vaccination appliqué aux truies dans notre étude n'a pas permis d'améliorer l'immunité protectrice naturelle préexistante chez les porcelets. Les programmes de vaccination des truies sont très variables et le nombre de doses varie de 2 à 4 avant parturition, selon le niveau de parité des truies. Cela peut affecter la réponse vaccinale et doit encore être pleinement évalué dans une étude comparative sur le terrain. Le profil isotypique des anticorps induits par un vaccin est important dans la lutte contre *S. suis*, car il est lié à la capacité de certains isotypes à induire une opsonophagocytose alors que d'autres isotypes sont connus pour être faiblement opsonisants (117, 167). L'adjuvant est le principal composant de la formulation vaccinale à l'origine du changement d'isotype, et cet aspect n'a pas été évalué de manière scientifique sur le terrain avec des bactérines autogènes. Cela peut s'expliquer par l'utilisation de vaccins préparés par des sociétés privées agréées, qui ne divulguent généralement pas la formulation. La formulation vaccinale utilisée dans cette étude semble favoriser, au moins chez les truies, la production d'Ig de sous-classe IgG1, ce qui a déjà été suggéré comme étant peu protecteur dans le contexte des infections à *S. suis* (117). L'antigène du vaccin lui-même peut également influencer sur la commutation d'isotype et / ou la fonctionnalité des anticorps (161, 168). Dans cette étude, le sérotype 7 présent dans le vaccin induisait moins efficacement la commutation isotypique comparativement au sérotype 9 de ce vaccin bivalent. En tant que tel, l'impact de la formulation d'un vaccin autogène sur son efficacité doit être soigneusement étudié, y compris l'effet de l'adjuvant et les interférences possibles de l'inclusion de plusieurs sérotypes et souches de *S. suis*, couramment utilisés sur le terrain.

## **V. Conclusion et perspectives**

- Ce projet de maîtrise a permis d'évaluer de façon détaillée l'efficacité d'un vaccin à base de bactérines autogènes utilisé sur le terrain pour contrôler les infections à *S. suis* chez le porc.
- Les bactérines autogènes sont le seul outil préventif disponible pour les producteurs de porcs afin de lutter contre les infections à *S. suis*. Dans les deux stratégies vaccinales étudiées, le même profil d'anticorps a pu être observé, rapportant de forts titres d'anticorps maternels chez les porcelets qui déclinent au cours du temps jusqu'à ne plus être présents après le sevrage, au-delà de 3 semaines d'âge, période la plus à risque d'infection.
- Selon notre étude, bien que la vaccination soit une stratégie nécessaire, des progrès restent encore à faire pour mettre en place un vaccin efficace.

**En perspective**, les résultats obtenus grâce à cette étude permettent d'ouvrir de nouvelles pistes d'étude pour améliorer l'efficacité du vaccin. Ces pistes passent par des études scientifiques approfondies et comparatives de préparation et d'administration du vaccin : adjuvant à inclure, méthode pour tuer les bactéries, concentration de la bactérie, inclusion de différents sérotypes dans une même formulation, nombre de doses, âge de la vaccination des porcelets, bénéfice réel de la vaccination des truies, ou des porcelets ou des deux. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour parvenir à développer un vaccin protecteur.

# Références

1. Higgins R, Gottschalk M. An update on *Streptococcus suis* identification. J Vet Diagn Invest. 1990;2(3):249-52.
2. Gottschalk M, Segura M, Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. Anim Health Res Rev. 2007;8(1):29-45.
3. Unterweger C, Ruczizka U, Spergser J, Baums CG, Hennig-Pauka I. Effect of early-life treatment of piglets with long-acting ceftiofur on colonization of *Streptococcus suis* serotype 7 and elicitation of specific humoral immunity in a farm dealing with streptococcal diseases. Pathogens. 2018;7(2).
4. Segura M. *Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress. Expert Rev Vaccines. 2015;14(12):1587-608.
5. Segura M, Fittipaldi N, Calzas C, Gottschalk M. Critical *Streptococcus suis* Virulence factors: are they all really critical? Trends Microbiol. 2017;25(7):585-99.
6. Jansen E.J. VDCA. Meningoencephalitis bij varkens door streptococcen. Tijdschr Diergeneeskd. 1951.
7. De Moor CE. Septicaemic infections in pigs, caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R, S, and T. Antonie Van Leeuwenhoek. 1963;29:272-80.
8. Elliott SD. Teichoic acid and the group antigen of group D streptococci. Nature. 1962;193:1105-6.
9. Windsor RS. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis* type II. Vet Rec. 1977;101(19):378-9.
10. Okura M, Osaki M, Nomoto R, Arai S, Osawa R, Sekizaki T, et al. Current taxonomical situation of *Streptococcus suis*. Pathogens. 2016;5(3).
11. Chatellier S, Harel J, Zhang Y, Gottschalk M, Higgins R, Devriese LA, et al. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. Int J Syst Bacteriol. 1998;48 Pt 2:581-9.
12. Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. Vet Microbiol. 2005;107(1-2):63-9.

13. Nomoto R, Maruyama F, Ishida S, Tohya M, Sekizaki T, Osawa R. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22 and 26: *Streptococcus parasuis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65(Pt 2):438-43.
14. Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*. 1993;31(8):2192-4.
15. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J Clin Microbiol*. 1983;18(6):1351-4.
16. Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg Microbes Infect*. 2014;3(6):e45.
17. Van Calsteren M-R, Goyette-Desjardins G, Gagnon F, Okura M, Takamatsu D, Roy R, et al. Explaining the serological characteristics of *Streptococcus suis* serotypes 1 and 1/2 from their capsular polysaccharide structure and biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(16):8387-98.
18. King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, 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):3671-80.
19. Lachance C, Gottschalk M, Gerber PP, Lemire P, Xu J, Segura M. Exacerbated type II interferon response drives hypervirulence and toxic shock by an emergent epidemic strain of *Streptococcus suis*. *Infect Immun*. 2013;81(6):1928-39.
20. Schultsz C, Jansen E, Keijzers W, Rothkamp A, Duim B, Wagenaar JA, et al. Differences in the population structure of invasive *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and from humans in The Netherlands. *PLoS One*. 2012;7(5):e33854.
21. Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol*. 2010;5(3):371-91.
22. Segura M, Calzas C, Grenier D, Gottschalk M. Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses. *FEBS Lett*. 2016;590(21):3772-99.
23. Murase K, Watanabe T, Arai S, Kim H, Tohya M, Ishida-Kuroki K, et al. Characterization of pig saliva as the major natural habitat of *Streptococcus suis* by analyzing oral, fecal, vaginal, and environmental microbiota. *PLoS One*. 2019;14(4):e0215983.

24. Ferrando ML, de Greeff A, van Rooijen WJ, Stockhofe-Zurwieden N, Nielsen J, Wichgers Schreur PJ, et al. Host-pathogen interaction at the intestinal mucosa correlates with zoonotic potential of *Streptococcus suis*. *J Infect Dis*. 2015;212(1):95-105.
25. Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol*. 2000;76(3):259-72.
26. Madsen LW, Bak H, Nielsen B, Jensen HE, Aalbaek B, Riising HJ. 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):211-5.
27. Bonifait L, Veillette M, Letourneau V, Grenier D, Duchaine C. Detection of *Streptococcus suis* in bioaerosols of swine confinement buildings. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(11):3296-304.
28. Enright MR, Alexander TJ, Clifton-Hadley FA. Role of houseflies (*Musca domestica*) in the epidemiology of *Streptococcus suis* type 2. *Vet Rec*. 1987;121(6):132-3.
29. Thanawongnuwech R, Brown GB, Halbur PG, Roth JA, Royer RL, Thacker BJ. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. *Vet Pathol*. 2000;37(2):143-52.
30. John VS, Wilcock B, Kierstead M. *Streptococcus suis* Type 2 Infection in swine in Ontario: A review of clinical and pathological presentations. *Can Vet J*. 1982;23(3):95-7.
31. Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultsz C. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis*. 2009;48(5):617-25.
32. Perch B, Kristjansen P, Skadhauge K. Group R streptococci pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1968;74(1):69-76.
33. Gomez-Torres J, Nimir A, Cluett J, Aggarwal A, Elsayed S, Soares D, et al. Human Case of *Streptococcus suis* disease, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(12):2107-9.
34. Zhou Y, Dong X, Li Z, Zou G, Lin L, Wang X, et al. Predominance of *Streptococcus suis* ST1 and ST7 in human cases in China, and detection of a novel sequence type, ST658. *Virulence*. 2017;8(6):1031-5.
35. Segura M. *Streptococcus suis*: an emerging human threat. *J Infect Dis*. 2009;199(1):4-6.
36. Van Samkar A, Brouwer MC, Schultsz C, van der Ende A, van de Beek D. *Streptococcus suis* meningitis in the Netherlands. *J Infect*. 2015;71(5):602-4.
37. Huang YT, Teng LJ, Ho SW, Hsueh PR. *Streptococcus suis* infection. *J Microbiol Immunol Infect*. 2005;38(5):306-13.



38. Huong VT, Hoa NT, Horby P, Bryant JE, Van Kinh N, Toan TK, et al. Raw pig blood consumption and potential risk for *Streptococcus suis* infection, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(11):1895-8.
39. Eisenberg T, Hudemann C, Hossain HM, Hewer A, Tello K, Bandorski D, et al. Characterization of five zoonotic *Streptococcus suis* strains from Germany, including one isolate from a recent fatal case of streptococcal toxic shock-like syndrome in a hunter. *J Clin Microbiol.* 2015;53(12):3912-5.
40. Nakayama T, Takeuchi D, Matsumura T, Akeda Y, Fujinaga Y, Oishi K. Alcohol consumption promotes the intestinal translocation of *Streptococcus suis* infections. *Microb Pathog.* 2013;65:14-20.
41. 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 Microbiol.* 2012;7(2):259-79.
42. Wilson SM, Norton P, Haverson K, Leigh J, Bailey M. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and cells of the myeloid lineage in the palatine tonsil of the pig. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;117(1-2):116-23.
43. Roy D, Grenier D, Segura M, Mathieu-Denoncourt A, Gottschalk M. Recruitment of factor H to the *Streptococcus suis* cell surface is multifactorial. *Pathogens.* 2016;5(3).
44. Benga L, Goethe R, Rohde M, Valentin-Weigand P. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2004;6(9):867-81.
45. Smith HE, Damman M, van der Velde J, Wagenaar F, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun.* 1999;67(4):1750-6.
46. Avci FY, Kasper DL. How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system. *Annual Review of Immunology*, Vol 28. 2010;28:107-30.
47. Benga L, Fulde M, Neis C, Goethe R, Valentin-Weigand P. Polysaccharide capsule and suilysin contribute to extracellular survival of *Streptococcus suis* co-cultivated with primary porcine phagocytes. *Vet Microbiol.* 2008;132(1-2):211-9.
48. Chabot-Roy G, Willson P, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb Pathog.* 2006;41(1):21-32.

49. Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, Segura M. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and sulysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis.* 2011;204(6):919-29.
50. Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Hilgers LAT, Smith HE. Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol.* 2002;84(1-2):155-68.
51. Houde M, Gottschalk M, Gagnon F, Van Calsteren MR, Segura M. *Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition. *Infect Immun.* 2012;80(2):506-17.
52. Segura M. Fisher scientific award lecture - the capsular polysaccharides of Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* differently modulate bacterial interactions with dendritic cells. *Can J Microbiol.* 2012;58(3):249-60.
53. Dominguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rivest S, Gottschalk M. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol.* 2007;179(3):1842-54.
54. Charland N, Nizet V, Rubens CE, Kim KS, Lacouture S, Gottschalk M. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun.* 2000;68(2):637-43.
55. Tenenbaum T, Papandreou T, Gellrich D, Friedrichs U, Seibt A, Adam R, et al. Polar bacterial invasion and translocation of *Streptococcus suis* across the blood-cerebrospinal fluid barrier *in vitro*. *Cell Microbiol.* 2009;11(2):323-36.
56. Gottschalk M., Kobisch M., Berthelot-Hérault F. L'Infection à *Streptococcus suis* chez le porc - Revue générale. *Journées Rech. Porcine en France.* 2001;33, 269-276.
57. Amass SF, Wu CC, Clark LK. Evaluation of antibiotics for the elimination of the tonsillar carrier state of *Streptococcus suis* in pigs. *J Vet Diagn Invest.* 1996;8(1):64-7.
58. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 2001;305(3):567-80.
59. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods.* 2011;8(10):785-6.

60. Yongkiettrakul S, Maneerat K, Arechanajan B, Malila Y, Srimanote P, Gottschalk M, et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs, asymptomatic pigs, and human patients in Thailand. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):5.
61. Feng Y, Zhang H, Wu Z, Wang S, Cao M, Hu D, et al. *Streptococcus suis* infection: an emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases? *Virulence.* 2014;5(4):477-97.
62. Niemann L, Eichhorn I, Muller P, Brauns J, Nathaus R, Schakel F, et al. Draft genome sequences of three porcine *Streptococcus suis* isolates which differ in their susceptibility to penicillin. *Microbiol Resour Announc.* 2019;8(9).
63. Waack U, Nicholson TL. Subinhibitory Concentrations of Amoxicillin, Lincomycin, and Oxytetracycline Commonly Used to Treat Swine Increase *Streptococcus suis* Biofilm Formation. *Front Microbiol.* 2018;9:2707.
64. Choinière M. Proposition de l'ES PQ sur une cible de réduction de l'usage des antibiotiques dans la filière porcine au Québec. *Wet-Lab Avia.* Drumondville. 2018.
65. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Eighth edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2015. viii, 535 pages p.
66. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. Immunologie : le cours de Janis Kuby : avec questions de révision. 6<sup>e</sup> édition ed. Paris: Dunod; 2008.
67. Rieckmann K, Seydel A, Szewczyk K, Klimke K, Rungelrath V, Baums CG. *Streptococcus suis* cps7: an emerging virulent sequence type (ST29) shows a distinct, IgM-determined pattern of bacterial survival in blood of piglets during the early adaptive immune response after weaning. *Vet Res.* 2018;49(1):48.
68. Quessy S, Dubreuil JD, Caya M, Letourneau R, Higgins R. Comparison of pig, rabbit and mouse IgG response to *Streptococcus suis* serotype 2 proteins and active immunization of mice against the infection. *Can J Vet Res.* 1994;58(3):220-3.
69. Crawley A, Wilkie BN. Porcine Ig isotypes: function and molecular characteristics. *Vaccine.* 2003;21(21-22):2911-22.
70. Lebel G, Piche F, Frenette M, Gottschalk M, Grenier D. Antimicrobial activity of nisin against the swine pathogen *Streptococcus suis* and its synergistic interaction with antibiotics. *Peptides.* 2013;50:19-23.
71. Vazquez R, Domenech M, Iglesias-Bexiga M, Menendez M, Garcia P. Csl2, a novel chimeric bacteriophage lysin to fight infections caused by *Streptococcus suis*, an emerging zoonotic pathogen. *Sci Rep.* 2017;7(1):16506.

72. Zhang H, Zhang C, Wang H, Yan YX, Sun J. A novel prophage lysin Ply5218 with extended lytic activity and stability against *Streptococcus suis* infection. FEMS Microbiol Lett. 2016;363(18).
73. Tang F, Li D, Wang H, Ma Z, Lu C, Dai J. Prophage lysin Ply30 protects mice from *Streptococcus suis* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infections. Appl Environ Microbiol. 2015;81(21):7377-84.
74. Buttner N, Beineke A, de Buhr N, Lilienthal S, Merkel J, Waldmann KH, et al. *Streptococcus suis* serotype 9 bacterin immunogenicity and protective efficacy. Vet Immunol Immunopathol. 2012;146(3-4):191-200.
75. Baums CG, Bruggemann C, Kock C, Beineke A, Waldmann KH, Valentin-Weigand P. Immunogenicity of an autogenous *Streptococcus suis* bacterin in preparturient sows and their piglets in relation to protection after weaning. Clin Vaccine Immunol. 2010;17(10):1589-97.
76. Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Hilgers LA, Smith HE. Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. Vet Microbiol. 2002;84(1-2):155-68.
77. Fittipaldi N, Harel J, D'Amours B, Lacouture S, Kobisch M, Gottschalk M. Potential use of an unencapsulated and aromatic amino acid-auxotrophic *Streptococcus suis* mutant as a live attenuated vaccine in swine. Vaccine. 2007;25(18):3524-35.
78. Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. Microbiology. 1998;144 ( Pt 2):325-32.
79. Li Z, Chang P, Xu J, Tan C, Wang X, Bei W, Li J. A capsular polysaccharide-expressing live vaccine suppresses streptococcal toxic shock-like syndrome and provides sequence type-independent protection during *Streptococcus suis* infection. biorxiv. 2018.
80. Li Z, Chang P, Xu J, Tan C, Wang X, Bei W, et al. A *Streptococcus suis* live vaccine suppresses streptococcal toxic shock-like syndrome and provides sequence type-independent protection. J Infect Dis. 2019;219(3):448-58.
81. Li M, Cai RJ, Li CL, Song S, Li Y, Jiang ZY, et al. Deletion of *ssnA* attenuates the pathogenicity of *Streptococcus suis* and confers protection against serovar 2 strain challenge. PLoS One. 2017;12(1):e0169791.
82. Yao X, Li M, Wang J, Wang C, Hu D, Zheng F, et al. Isolation and characterization of a native avirulent strain of *Streptococcus suis* serotype 2: a perspective for vaccine development. Sci Rep. 2015;5:9835.

83. Wang J, Feng YJ, Wang CJ, Zheng F, Hassan B, Zhi LM, et al. Genome-wide analysis of a avirulent and reveal the strain induces protective immunity against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2. BMC Microbiol. 2017;17.
84. Busque P, Higgins R, Caya F, Quessy S. Immunization of pigs against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a live avirulent strain. Canadian Journal of Veterinary Research. 1997;61(4):275-9.
85. Quessy S, Dubreuil JD, Higgins R. Immunization of mice against *Streptococcus suis* serotype 2 infections using a live avirulent strain. Canadian Journal of Veterinary Research-Revue. 1994;58(4):299-301.
86. Quessy S, Dubreuil JD, Caya M, Higgins R. Discrimination of virulent and avirulent *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates from different geographical origins. Infect Immun. 1995;63(5):1975-9.
87. Holt ME, Enright MR, Alexander TJ. Immunisation of pigs with live cultures of *Streptococcus suis* type 2. Res Vet Sci. 1988;45(3):349-52.
88. Jiang X, Yang Y, Zhu L, Gu Y, Shen H, Shan Y, et al. Live *Streptococcus suis* type 5 strain XS045 provides cross-protection against infection by strains of types 2 and 9. Vaccine. 2016;34(51):6529-38.
89. Kock C, Beineke A, Seitz M, Ganter M, Waldmann KH, Valentin-Weigand P, et al. Intranasal immunization with a live *Streptococcus suis* isogenic of mutant elicited suilysin-neutralization titers but failed to induce opsonizing antibodies and protection. Vet Immunol Immunopathol. 2009;132(2-4):135-45.
90. Hu J, Xu J, Liu F, Tan C, Yuan F, Chen H, et al. Immunogenicity and cross-protective efficacy of double-mutant *Streptococcus suis* DeltaSspepO/DeltaSpspC serotypes 2 and 7. Vaccine. 2019;37(16):2194-9.
91. Kebede M, Chengappa MM, Stuart JG. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of *Streptococcus suis*: efficacy trial of the mutant vaccine in mice. Vet Microbiol. 1990;22(2-3):249-57.
92. Foster N, Staats JJ, Chengappa MM. Isolation, characterization and protection studies in mice of a streptomycin-dependent mutant of *Streptococcus suis* type 1/2. Vet Res Commun. 1994;18(3):155-63.

93. Hu J, You W, Wang B, Hu X, Tan C, Liu J, et al. Construction, characterization and evaluation of the protective efficacy of the *Streptococcus suis* double mutant strain DeltaSsPep/DeltaSsPspC as a live vaccine candidate in mice. *Microbiol Res.* 2015;170:87-94.
94. Zhang W, Lu CP. Immunoproteomics of extracellular proteins of Chinese virulent strains of *Streptococcus suis* type 2. *Proteomics.* 2007;7(24):4468-76.
95. Zhang A, Xie C, Chen H, Jin M. Identification of immunogenic cell wall-associated proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *Proteomics.* 2008;8(17):3506-15.
96. Brockmeier SL, Loving CL, Nicholson TL, Wang J, Peters SE, Weinert L, et al. Use of proteins identified through a functional genomic screen to develop a protein subunit vaccine that provides significant protection against virulent *Streptococcus suis* in pigs. *Infect Immun.* 2018;86(3).
97. Gu H, Zhu H, Lu C. Use of *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT) for the identification of *Streptococcus suis* serotype 2 *in vivo*-induced bacterial protein antigens. *BMC Microbiol.* 2009;9:201.
98. Gomez-Gascon L, Luque I, Olaya-Abril A, Jimenez-Munguia I, Orbegozo-Medina RA, Peralbo E, et al. Exploring the pan-surform of *Streptococcus suis*: looking for common protein antigens. *J Proteomics.* 2012;75(18):5654-66.
99. Feng L, Niu X, Mei W, Li W, Liu Y, Willias SP, et al. Immunogenicity and protective capacity of EF-Tu and FtsZ of *Streptococcus suis* serotype 2 against lethal infection. *Vaccine.* 2018;36(19):2581-8.
100. Xia XJ, Wang L, Cheng LK, Shen ZQ, Li SG, Wang JL. Expression and immunological evaluation of elongation factor Tu of *Streptococcus suis* serotype 2. *Pol J Vet Sci.* 2017;20(2):277-84.
101. Fu L, Zhao J, Lin L, Zhang Q, Xu Z, Han L, et al. Characterization of IgA1 protease as a surface protective antigen of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbes Infect.* 2016;18(4):285-9.
102. Zhou Y, Wang Y, Deng L, Zheng C, Yuan F, Chen H, et al. Evaluation of the protective efficacy of four novel identified membrane associated proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine.* 2015;33(19):2254-60.
103. Seele J, Hillermann LM, Beineke A, Seitz M, von Pawel-Rammingen U, Valentin-Weigand P, et al. The immunoglobulin M-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, IdeSsuis, is a highly protective antigen against serotype 2. *Vaccine.* 2015;33(19):2207-12.

104. Huang D, Zhu H, Lin H, Xu J, Lu C. First insights into the protective effects of a recombinant swinepox virus expressing truncated MRP of *Streptococcus suis* type 2 in mice. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2012;125(3-4):144-52.
105. Geng H, Zhu L, Yuan Y, Zhang W, Li W, Wang J, et al. Identification and characterization of novel immunogenic proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *J Proteome Res.* 2008;7(9):4132-42.
106. Chen B, Zhang A, Li R, Mu X, He H, Chen H, et al. Evaluation of the protective efficacy of a newly identified immunogenic protein, HP0272, of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2010;307(1):12-8.
107. Zhang A, Chen B, Li R, Mu X, Han L, Zhou H, et al. Identification of a surface protective antigen, HP0197 of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine.* 2009;27(38):5209-13.
108. Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, Smith HE. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun.* 1991;59(9):3156-62.
109. Tan C, Liu M, Liu J, Yuan F, Fu S, Liu Y, et al. Vaccination with *Streptococcus suis* serotype 2 recombinant 6PGD protein provides protection against *S. suis* infection in swine. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;296(1):78-83.
110. Tan C, Fu S, Liu M, Jin M, Liu J, Bei W, et al. Cloning, expression and characterization of a cell wall surface protein, 6-phosphogluconate-dehydrogenase, of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol.* 2008;130(3-4):363-70.
111. Li W, Hu X, Liu L, Chen H, Zhou R. Induction of protective immune response against *Streptococcus suis* serotype 2 infection by the surface antigen HP0245. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;316(2):115-22.
112. Wu Z, Zhang W, Shao J, Wang Y, Lu Y, Lu C. Immunoproteomic assay of secreted proteins of *Streptococcus suis* serotype 9 with convalescent sera from pigs. *Folia Microbiol (Praha).* 2011;56(5):423-30.
113. Wu Z, Zhang W, Lu C. Immunoproteomic assay of surface proteins of *Streptococcus suis* serotype 9. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;53(1):52-9.
114. Jiang X, Yang Y, Zhou J, Liu H, Liao X, Luo J, et al. Peptidyl isomerase PrsA is surface-associated on *Streptococcus suis* and offers cross-protection against serotype 9 strain. *FEMS Microbiol Lett.* 2019;366(2).
115. Zhang W, Liu G, Tang F, Shao J, Lu Y, Bao Y, et al. Pre-absorbed immunoproteomics: a novel method for the detection of *Streptococcus suis* surface proteins. *PLoS One.* 2011;6(6):e21234.

116. Zhang W, Lu CP. Immunoproteomic assay of membrane-associated proteins of *Streptococcus suis* type 2 China vaccine strain HA9801. *Zoonoses Public Health*. 2007;54(6-7):253-9.
117. Li Y, Gottschalk M, Esgleas M, Lacouture S, Dubreuil JD, Willson P, et al. Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(8):937-43.
118. Li Y, Martinez G, Gottschalk M, Lacouture S, Willson P, Dubreuil JD, et al. Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infect Immun*. 2006;74(1):305-12.
119. Aranda J, Garrido ME, Cortes P, Llagostera M, Barbe J. Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions. *Infect Immun*. 2008;76(4):1590-8.
120. Aranda J, Garrido ME, Fittipaldi N, Cortes P, Llagostera M, Gottschalk M, et al. Protective capacities of cell surface-associated proteins of *Streptococcus suis* mutants deficient in divalent cation-uptake regulators. *Microbiology*. 2009;155(Pt 5):1580-7.
121. Mandanici F, Gomez-Gascon L, Garibaldi M, Olaya-Abril A, Luque I, Tarradas C, et al. A surface protein of *Streptococcus suis* serotype 2 identified by proteomics protects mice against infection. *J Proteomics*. 2010;73(12):2365-9.
122. Garibaldi M, Rodriguez-Ortega MJ, Mandanici F, Cardaci A, Midiri A, Papasergi S, et al. Immunoprotective activities of a *Streptococcus suis* pilus subunit in murine models of infection. *Vaccine*. 2010;28(20):3609-16.
123. Tikkanen K, Haataja S, Finne J. The galactosyl-(alpha 1-4)-galactose-binding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies. *Infect Immun*. 1996;64(9):3659-65.
124. Haataja S, Tikkanen K, Hytonen J, Finne J. The Gal alpha 1-4 Gal-binding adhesin of *Streptococcus suis*, a gram-positive meningitis-associated bacterium. *Adv Exp Med Biol*. 1996;408:25-34.
125. Wisselink HJ, Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE. Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. *Vet Rec*. 2001;148(15):473-7.
126. Lun S, Perez-Casal J, Connor W, Willson PJ. Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microb Pathog*. 2003;34(1):27-37.



127. Du H, Huang W, Xie H, Ye C, Jing H, Ren Z, et al. The genetically modified suilysin, rSLY(P353L), provides a candidate vaccine that suppresses proinflammatory response and reduces fatality following infection with *Streptococcus suis*. *Vaccine*. 2013;31(38):4209-15.
128. Liu L, Cheng G, Wang C, Pan X, Cong Y, Pan Q, et al. Identification and experimental verification of protective antigens against *Streptococcus suis* serotype 2 based on genome sequence analysis. *Curr Microbiol*. 2009;58(1):11-7.
129. Jacobs AA, van den Berg AJ, Loeffen PL. Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *Vet Rec*. 1996;139(10):225-8.
130. Jacobs AA, Loeffen PL, van den Berg AJ, Storm PK. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun*. 1994;62(5):1742-8.
131. Li J, Xia J, Tan C, Zhou Y, Wang Y, Zheng C, et al. Evaluation of the immunogenicity and the protective efficacy of a novel identified immunogenic protein, SsPepO, of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine*. 2011;29(38):6514-9.
132. Hsueh KJ, Lee JW, Hou SM, Chen HS, Chang TC, Chu CY. Evaluation on a *Streptococcus suis* vaccine using recombinant sao-I protein manufactured by bioreactors as the antigen in pigs. *Transbound Emerg Dis*. 2014;61(6):e35-43.
133. Feng Y, Zheng F, Pan X, Sun W, Wang C, Dong Y, et al. Existence and characterization of allelic variants of Sao, a newly identified surface protein from *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;275(1):80-8.
134. Roy D, Fittipaldi N, Dumesnil A, Lacouture S, Gottschalk M. The protective protein Sao (surface antigen one) is not a critical virulence factor for *Streptococcus suis* serotype 2. *Microb Pathog*. 2014;67-68:31-5.
135. Esgleas M, Dominguez-Punaro Mde L, Li Y, Harel J, Dubreuil JD, Gottschalk M. Immunization with SsEno fails to protect mice against challenge with *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;294(1):82-8.
136. Feng Y, Pan X, Sun W, Wang C, Zhang H, Li X, et al. *Streptococcus suis* enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface. *J Infect Dis*. 2009;200(10):1583-92.
137. Zhang A, Chen B, Mu X, Li R, Zheng P, Zhao Y, et al. Identification and characterization of a novel protective antigen, Enolase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine*. 2009;27(9):1348-53.

138. Baums CG, Valentin-Weigand P. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Anim Health Res Rev.* 2009;10(1):65-83.
139. Calzas C, Lemire P, Auray G, Gerdts V, Gottschalk M, Segura M. Antibody response specific to the capsular polysaccharide is impaired in *Streptococcus suis* serotype 2-infected animals. *Infect Immun.* 2015;83(1):441-53.
140. Goyette-Desjardins G, Calzas C, Shiao TC, Neubauer A, Kempker J, Roy R, et al. Protection against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a capsular polysaccharide glycoconjugate vaccine. *Infect Immun.* 2016;84(7):2059-75.
141. Hsueh KJ, Cheng LT, Lee JW, Chung YC, Chung WB, Chu CY. Immunization with *Streptococcus suis* bacterin plus recombinant Sao protein in sows conveys passive immunity to their piglets. *BMC Vet Res.* 2017;13(1):15.
142. Baums CG, Kock C, Beineke A, Bennecke K, Goethe R, Schroder C, et al. *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(2):200-8.
143. Holt ME, Enright MR, Alexander TJ. Immunisation of pigs with killed cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res Vet Sci.* 1990;48(1):23-7.
144. Pallares FJ, Schmitt CS, Roth JA, Evans RB, Kinyon JM, Halbur PG. Evaluation of a ceftiofur-washed whole cell *Streptococcus suis* bacterin in pigs. *Can J Vet Res.* 2004;68(3):236-40.
145. Hsueh KJ, Chen MC, Cheng LT, Lee JW, Chung WB, Chu CY. Transcutaneous immunization of *Streptococcus suis* bacterin using dissolving microneedles. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2017;50:78-87.
146. Li YA, Ji Z, Wang X, Wang S, Shi H. Salmonella enterica serovar Choleraesuis vector delivering SaoA antigen confers protection against *Streptococcus suis* serotypes 2 and 7 in mice and pigs. *Vet Res.* 2017;48(1):89.
147. Halbur P, Thanawongnuwech R, Brown G, Kinyon J, Roth J, Thacker E, et al. Efficacy of antimicrobial treatments and vaccination regimens for control of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Streptococcus suis* coinfection of nursery pigs. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1156-60.
148. Wisselink HJ, Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE. Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype Z strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. *Vet Rec.* 2001;148(15):473-7.

149. Amass S, Stevenson G, Knox K, Reed A. Efficacy of an autogenous vaccine for preventing streptococcosis in piglets. *Vet Med.* 1999;94(5):480-+.
150. Unterweger C, Baums CG, Hocher M, Fischer L, Weiss A, Hennig-Pauka I. [Clinical situation, diagnosis and prevention of a *Streptococcus suis* serotype 7 problem on a farm]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2014;127(5-6):194-201.
151. Dekker CN, Bouma A, Daemen AJ, van Leengoed LA, Jonker FH, Wagenaar JA, et al. Homologous whole bacterin vaccination is not able to reduce *Streptococcus suis* serotype 9 strain 7997 transmission among pigs or colonization. *Vaccine.* 2012;30(7):1379-87.
152. Hopkins D, Poljak Z, Farzan A, Friendship R. Field studies evaluating the direct, indirect, total, and overall efficacy of *Streptococcus suis* autogenous vaccine in nursery pigs. *Can Vet J.* 2019;60(4):386-90.
153. Blouin C, Higgins R, Gottschalk M, Simard J. Evaluation of the antibody response in pigs vaccinated against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Can J Vet Res.* 1994;58(1):49-54.
154. Hopkins D, Poljak Z, Farzan A, Friendship R. Field studies evaluating the direct, indirect, total, and overall efficacy of *Streptococcus suis* autogenous vaccine in nursery pigs. *Canadian Veterinary Journal.* 2019;60(4):386-90.
155. Torremorell M, Calsamiglia M, Pijoan C. Colonization of suckling pigs by *Streptococcus suis* with particular reference to pathogenic serotype 2 strains. *Can J Vet Res.* 1998;62(1):21-6.
156. Torremorell M, Pijoan C, Trigo E. Vaccination against *Streptococcus suis*: Effect on nursery mortality. *Swine Health Prod.* 1997;5(4):139-43.
157. Lapointe L, D'Allaire S, Lebrun A, Lacouture S, Gottschalk M. Antibody response to an autogenous vaccine and serologic profile for *Streptococcus suis* capsular type 1/2. *Can J Vet Res.* 2002;66(1):8-14.
158. Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet Microbiol.* 2004;100(3-4):255-68.
159. Kraehenbuhl JP, Campiche MA. Early stages of intestinal absorption of specific antibodies in the newborn. An ultrastructural, cytochemical, and immunological study in the pig, rat, and rabbit. *J Cell Biol.* 1969;42(2):345-65.
160. Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine.* 2001;19(17-19):2666-72.

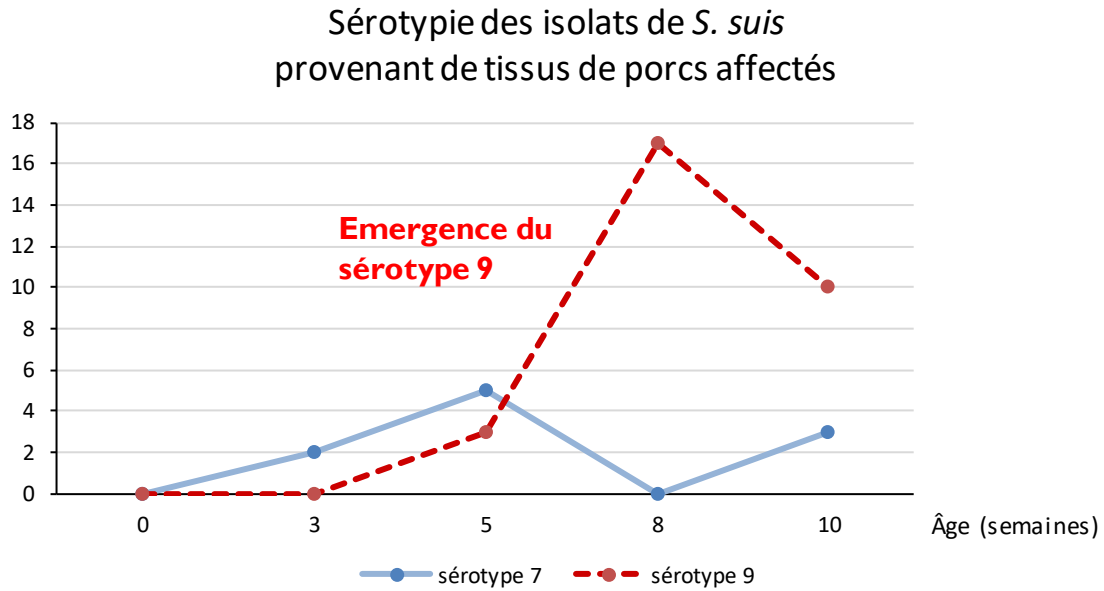
161. Martelet L, Lacouture S, Goyette-Desjardins G, Beauchamp G, Surprenant C, Gottschalk M, et al. Porcine dendritic cells as an *in vitro* model to assess the immunological behaviour of *Streptococcus suis* subunit vaccine formulations and the polarizing effect of adjuvants. *Pathogens*. 2017;6(1).
162. Vermout S. DM, Losson B., Mignon B. Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Ann. Mead. Vét.*; 2003.
163. Petrovsky N. Comparative safety of vaccine adjuvants: A summary of current evidence and future needs. *Drug Saf*. 2015;38(11):1059-74.
164. Lapointe L, D'Allaire S, Lebrun A, Lacouture S, Gottschalk M. Antibody response to an autogenous vaccine and serologic profile for *Streptococcus suis* capsular type 1/2. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2002;66(1):8-14.
165. Butler JE, Zhao Y, Sinkora M, Wertz N, Kacs Kovics I. Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. *Dev Comp Immunol*. 2009;33(3):321-33.
166. Gottschalk M, and Segura, M. . Streptococcosis. In: Zimmerman JJ, Karriker, L. A., Ramirez , A., Schwartz , K. J., Stevenson, G. W. and Zhang, J., editor. *Diseases of swine*. 11th ed. West Sussex, UK. : Wiley-Blackwell; 2019.
167. Schreiber JR, Cooper LJ, Diehn S, Dahlhauser PA, Tosi MF, Glass DD, et al. Variable region-identical monoclonal antibodies of different IgG subclass directed to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide O-specific side chain function differently. *J Infect Dis*. 1993;167(1):221-6.
168. Sela-Culang I, Kunik V, Ofran Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. *Front Immunol*. 2013;4:302.

# Annexes

# Annexe 1

## Emergence du sérotype 9 dans la ferme

---



Les analyses proviennent de tissus affectés des cas cliniques de porcelets de l'expérience 1 du projet. On constate une émergence de cas cliniques causés par le sérotype 9 à partir de 5 semaines d'âge.

## Annexe 2

### Accord des détenteurs du droit d'auteur Figure 3



RightsLink®

Home

Account  
Info

Help



AMERICAN  
SOCIETY FOR  
MICROBIOLOGY

**Title:** Exacerbated Type II Interferon Response Drives Hypervirulence and Toxic Shock by an Emergent Epidemic Strain of *Streptococcus suis*

**Author:** Claude Lachance, Marcelo Gottschalk, Pehuén P. Gerber, Paul Lemire, Jianguo Xu, Mariela Segura

**Publication:** Infection and Immunity

**Publisher:** American Society for Microbiology

**Date:** May 10, 2013

Copyright © 2013, American Society for Microbiology

Logged in as:

Lorelei Corsaut  
University of Montréal

LOGOUT

#### Permissions Request

ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2019 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) [Terms and Conditions.](#) Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)

## Annexe 3

### Accord des détenteurs du droit d'auteur Figure 4

---



RightsLink®

Home

Account Info

Help



**informa**  
healthcare

**Title:** Streptococcus suis vaccines: candidate antigens and progress  
**Author:** Mariela Segura  
**Publication:** Expert Review of Vaccines  
**Publisher:** Taylor & Francis  
**Date:** Dec 2, 2015  
Rights managed by Taylor & Francis

Logged in as:  
Lorelei Corsaut  
University of Montréal

LOGOUT

#### Thesis/Dissertation Reuse Request

Taylor & Francis is pleased to offer reuses of its content for a thesis or dissertation free of charge contingent on resubmission of permission request if work is published.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2019 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)



## Annexe 4

### Accord des détenteurs du droit d'auteur Figure 5

---

ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Nov 06, 2019

---

---

This Agreement between University of Montréal -- Lorelei Corsaut ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4701521307065
License date	Nov 03, 2019
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Trends in Microbiology
Licensed Content Title	Critical Streptococcus suis Virulence Factors: Are They All Really Critical?
Licensed Content Author	Mariela Segura, Nahuel Fittipaldi, Cynthia Calzas, Marcelo Gottschalk
Licensed Content Date	Jul 1, 2017
Licensed Content Volume	25
Licensed Content Issue	7
Licensed Content Pages	15
Start Page	585
End Page	599

Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Title	Caractérisation de la réponse anticorps induite par les bactéries autogènes et de leur effet protecteur pour contrôler les infections à Streptococcus suis chez le porc
Institution name	n/a
Expected presentation date	Dec 2019
Order reference number	4697110336213
Portions	Figure 1. Most Important Sequence Types (STs) of Streptococcus suis Serotype 2 as Determined by Multilocus Sequence Typing (MLST).
Specific Languages	French
Requestor Location	University of Montréal 2900 Boulevard Edouard-Montpetit  Montréal, QC H3T 1J4 Canada Attn: University of Montréal

Publisher Tax ID            GB 494 6272 12

Total                        0.00 CAD

Terms and Conditions

### **INTRODUCTION**

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

### **GENERAL TERMS**

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

#### **LIMITED LICENSE**

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator

must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

**16. Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com> . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

**17. For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

**Preprints:**

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use

- for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of

the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

#### **Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

#### **Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article

- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

**20. Other Conditions:**

v1.9

**Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**

---

---