

2m11.2822.4

Université de Montréal

**Étude de l'hétérogénéité antigénique du sérotype 7
d'*Actinobacillus pleuropneumoniae***

Par

Mimi Tadjine

**Département de Pathologie et Microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M.Sc.)
en sciences vétérinaires option microbiologie**

Décembre, 1999

© Mimi Tadjine, 1999



3011-2824

L'Université de Montréal

Étude de l'histogénéité mitochondriale de sérotypes
d'antibactériens pneumococques

Par

SF
607
U54
2000
N, 005

Mimi Tadjiri

Département de Pathologie et Microbiologie
École de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en sciences (M.Sc.)
en sciences médicales option microbiologie

December, 1999



17, Avenue Jacques-Lussier, 1999

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude de l'hétérogénéité antigénique du sérotype 7
d'*Actinobacillus pleuropneumoniae***

Présenté par:
Mimi Tadjine

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Serge Messier	Président-rapporteur
Dr K. R. Mittal	Directeur
Dr Robert Higgins	Membre

Mémoire accepté le : ...2000-02-10.....

Sommaire

Actinobacillus pleuropneumoniae est responsable de pleuropneumonie fibrinohémorragique et nécrosante qui cause d'importantes pertes économiques dans l'industrie porcine, et qui peut se présenter soit sous forme chronique, soit sous forme aiguë.

L'étude de l'hétérogénéité antigénique au sein d'un même sérotype et la détermination des relations antigéniques entre différents sérotypes sont d'une importance capitale à l'établissement d'une sérologie correcte. Cette dernière est nécessaire à l'étude épidémiologique ainsi qu'à la production de vaccins.

Le projet a consisté à étudier l'hétérogénéité antigénique à l'intérieur du sérotype 7. Des tests sérologiques tels que: la coagglutination, l'immunodiffusion en gel, l'hémagglutination indirecte, la contre-immunoélectrophorèse, dot-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), croissance de la bactérie en milieu semi-solide en présence de l'antisérum (Serum Soft-Agar) et l'agglutination en croissance (Growth agglutination) ont été utilisés à cette fin.

La souche de référence du sérotype 7 (WF83) partage des déterminants antigéniques avec la souche de référence du sérotype 1B (ISU158) mais non avec les souches de référence 1A (4074 et ATCC 27088). Cependant, les souches de champ du sérotype 7 partagent des déterminants antigéniques avec les souches de référence des sérotypes: 1A, 1B, 4, 10 et 11 en immunodiffusion en gel et en coagglutination mais pas toujours en contre-immunoélectrophorèse et en hémagglutination indirecte. On peut distinguer 6 groupes dans le sérotype 7 en se basant sur les réactions croisées avec les autres sérotypes.

Deux souches de champ du sérotype 7 (90-3182 et 86-1411) ont été sélectionnées. La souche 90-3182 a réagi de la même façon dans tous les tests avec l'antisérum contre les deux souches de référence des sérotypes 1 et 7, alors que la souche 86-1411 a donné une identité partielle avec la souche de référence du

sérotype 7. Pour ces raisons, les deux souches (90-3182 et 86-1411) ont été choisies pour une caractérisation antigénique approfondie.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) et l'immunobuvardage (Western-blot) ont été utilisés pour examiner le profil antigénique des protéines de la membrane externe (OMP), les lipopolysaccharides (LPS) et les polysaccharides capsulaires (PSC) afin de déterminer où se situe la différence. Les résultats de ces deux tests, en utilisant les OMP des souches de champs n'ont pas montré de différence significative. Cependant, l'utilisation de la cellule entière, traitée avec la protéinase K, a montré que la souche 90-3182 a un profil identique avec la souche de référence du sérotype 1A et non avec la souche de référence du sérotype 7, alors que la souche 86-1411 a un profil identique avec la souche de référence du sérotype 7.

Pour vérifier ces résultats nous avons utilisé de la Tricine pour l'analyse par SDS-PAGE ce qui augmente la résolution lipopolysaccharidique et la région du noyau lipopolysaccharidique. Il a été possible de distinguer que le noyau de la souche 90-3182 appartient au noyau de type I comme la souche de référence du sérotype 1A, alors que la souche 86-1411 a le même noyau que la souche de référence du sérotype 7 (noyau de type II).

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	II
SOMMAIRE.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	VIII
REMERCIEMENTS.....	X
I. INTRODUCTION.....	1
II. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	4
1- Historique et taxonomie.....	5
2- Étiologie.....	6
2-1 Les liens antigéniques entre les sérotypes.....	7
3- Épidémiologie.....	8
3-1 Modes de transmission.....	9
3-2 Traitement.....	9
3-3 Prévention.....	10
4- Pathologie et pathogénicité.....	10
4-1 Signes cliniques.....	11
4-1A Forme aiguë.....	11
4-1B Forme chronique.....	12
5- Diagnostic.....	12
5-1 Diagnostic microbiologique.....	12
5-2 Diagnostic sérologique.....	13
6- Facteurs de virulence.....	14

6-1 Fimbriae.....	14
6-2 Polysaccharides capsulaires.....	14
6-3 Lipopolysaccharides	16
6-4 Protéines de la membrane externe	17
6-5 Les protéines qui lient le fer	18
6-6 Toxines (Apx).....	19

III. MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS.....23

Mimi Tadjine, and Mittal, K.R.

Study of Antigenic Heterogeneity among *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotype 7. (À soumettre à Veterinary Microbiology)

IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....62

V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....68

LISTE DES TABLEAUX

- TABLEAU I:** Serological reactivity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* reference and field strains of serotype 7 representing various groups using rabbit hyperimmune sera against all the known 12 serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.....51-52
- TABLEAU II:** Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 field strains based on their cross-reactivities with other serotypes in the immunodiffusion test.....53
- TABLEAU III:** Effect of absorption of rabbit hyperimmune sera against reference (WF83) and field strain (86-1411) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 with homologous and heterologous strains of serotype 7 as detected by the immunodiffusion test.....54
- TABLEAU IV:** Results of the immunodiffusion test using purified capsular antigen and rabbit hyperimmune sera against reference and two selected field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7.....55

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique d'une bactérie qui exprime la toxine RTX.....	21
Figure 2: Schématisation du génotype et phénotype des toxines Apx selon leur présence dans les différents sérotypes et biovars d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	22
Figure 3: Distribution of different serotypes of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> isolated from lung lesions of acute porcine pleuropneumonia in Québec.....	56
Figure 4: Representing results of serum soft agar test.	
Tube 1 Agar containing non capsulated strain 101 of <i>Escherichia coli</i> and normal rabbit Serum showing compact colonies.	
Tube 2 Agar containing capsulated reference strain 4074 of <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1 and normal rabbit serum showing diffuse (mucoid) colonies.	
Tube 3 Agar containing capsulated reference strain WF83 of <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 7 and normal rabbit serum showing diffuse (mucoid) colonies.	
Tube 4 Agar containing capsulated reference strain WF83 of <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 7 and rabbit hyperimmune serum against WF83 of <i>A. pleuropneumoniae</i> . Showing compact colonies.....	57

Figure 5: SDS-PAGE and Western blot analysis of whole-cell preparations of reference and field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 probed with rabbit hyperimmune serum against serotype 7 reference strain.

WF83 (lane 1), 90-3182 (lane 2), 86-1411 (lane 3), 98-C827 (lane 4), 97-A714 (lane 5), 95-4590 (lane 6), 97-1061 (lane 7).....58

Figure 6: Western blot analysis of proteinase-K- treated whole-cell preparations of *Actinobacillus pleuropneumoniae* probed with rabbit hyperimmune serum against serotype 7 reference strain.

4074 (1A) (lane 1), ISU158 (1B) (lane 2), 86-1411(7) (lane 3), SHY85-77 (7) (lane 4), M62 (4) (lane 5), WF83 (7) (lane 6), 90-3182 (7) (lane 7).....59

Figure 7: Western blot analysis of proteinase-K- treated whole-cell preparations of *Actinobacillus pleuropneumoniae* probed with rabbit hyperimmune serum against a serotype 7 field strain (86-1411).

4074 (1A) (lane 1), ISU158 (1B) (lane 2), 86-1411(7) (lane 3), SHY85-77 (7) (lane 4), M62 (4) (lane 5), WF83 (7) (lane 6), 90-3182 (7) (lane 7).....60

Figure 8: Western blot analysis of proteinase-K- treated whole-cell preparations of *Actinobacillus pleuropneumoniae* probed with rabbit hyperimmune serum against a serotype 7 field strain (90-3182)

4074 (1A) (lane 1), ISU158 (1B) (lane 2), M62 (4) (lane 3), WF83 (7) (lane 4), 90-3182 (7) (lane 5), 86-1411 (7) (lane 6), SHY85-77 (7) (lane 7).....61

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement:

*** Le Dr K. R. Mittal mon directeur de projet de maîtrise, pour ses conseils, ses qualités et son support scientifique, sans oublier sa confiance et son soutien sans faille.**

*** Le Dr Serge Messier d'avoir accepté de présider le jury et pour sa disponibilité.**

*** Le Dr Robert Higgins de l'honneur qu'il m'accorde en faisant partie de mon jury**

*** Madame Suzanne Bourdon de m'avoir initiée aux techniques du laboratoire et surtout pour son amitié et son soutien.**

*** Tous les membres du GREMIP et en particulier Dr Mario Jacques, Dr Daniel Dubreuil et Dr Josée Harel pour leur disponibilité.**

*** Madame Micheline St-Germain pour les services rendus.**

I. INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae est un parasite du tractus respiratoire et est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine. Cette maladie respiratoire est répandue mondialement et cause d'énormes pertes économiques dans l'industrie porcine. Les porcs âgés de moins de 12 semaines sont les plus vulnérables. Cette maladie peut se manifester sous deux formes: chronique ou aiguë. Au sein de cette espèce on peut distinguer 2 biotypes en se basant sur leur besoin de croissance en nicotinamide adénine dinucléotide (NAD ou facteur V), le biotype I qui est NAD-dépendant et le biotype II qui est NAD-indépendant. On peut distinguer 12 sérotypes au sein du biotype I en se basant sur leurs antigènes capsulaires. Les sérotypes 1 et 5 sont subdivisés en 1A et 1B, et 5A et 5B, respectivement. Parmi ces sérotypes on peut observer des réactions croisées, notamment entre les sérotypes 1, 9 et 11 ; 3, 6 et 8 ; 4 et 7 et enfin 7 et 1. Ces réactions croisées non spécifiques au sérotype sont attribuées à l'antigène lipopolysaccharidique (LPS). Sauf pour les sérotypes 6 et 8 qui partagent des épitopes au niveau des polysaccharides capsulaires (Nielsen et O'Connor, 1984).

L'hétérogénéité antigénique des souches de champ du sérotype 7 a déjà été rapportée par Mittal et Bourdon (1991). En effet, ces souches partagent des antigènes communs avec les autres sérotypes, notamment les sérotypes 1, 4, 9, 10 et 11, ce qui explique l'existence des réactions croisées entre ces sérotypes. Les réactions croisées peuvent causer des problèmes au niveau de la sérotypie et du sérodiagnostic. Une identification précise du sérotype 7 est d'une grande importance pour les raisons suivantes:

- 1) les réactions croisées observées entre certaines souches des sérotypes 7 et 1 dans différents tests sérologiques (Mittal et Bourdon, 1991; Gottschalk *et al.*, 1999).
- 2) le sérotype 1 est considéré comme étant le plus virulent en Amérique du Nord d'où l'importance de ce projet.
- 3) l'augmentation marquée du nombre d'isolats du sérotype 7 identifiés dans notre laboratoire au cours des 10 dernières années (Figure 3).

Le sérotype 7 est généralement considéré moins virulent que les sérotypes 1 et 5 (Frey et Nicolet, 1990). Rogers *et al.* (1990) rapportent l'existence de 2 isolats australiens du sérotype 7 qui sont moins virulents que le sérotype 1 mais d'une virulence semblable à celles des sérotypes 2 et 3. Cependant, plusieurs études rapportent la présence de variations dans la virulence au sein d'un même sérotype (Bertram, 1985; Brandreth et Smith, 1987). Rosendal *et al.* (1985) rapportent que le sérotype 7 a une virulence similaire à celle du sérotype 1 et que la différence en virulence entre les sérotypes 1, 2 et 7 est probablement faible.

Compte tenu de ces observations, l'objectif du projet était de vérifier l'hétérogénéité antigénique d'isolats d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotype 7 à l'aide de différentes méthodes immunologiques.

II. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1- Historique et taxonomie

La pleuropneumonie a été décrite pour la première fois par Pattison *et al.* (1957) et ensuite par Matthew et Pattison (1961) et Olander (1963). Shope (1964) a décrit une infection similaire dans une ferme en Argentine. À ce moment, l'agent responsable de cette maladie a été désigné *Haemophilus pleuropneumoniae* par Shope *et al.* (1964). Cette désignation a été confirmée par la majorité des chercheurs. De même, Olander (1963); Nicolet et König (1966) et Nicolet (1968) attribuèrent le nom d'*Haemophilus parahaemolyticus* à cette bactérie à cause de sa ressemblance biochimique avec une bactérie d'origine humaine du même nom.

Par la suite, sa présence a été rapportée dans plusieurs pays à travers le monde, et au Canada, le premier cas fut rapporté en Saskatchewan en 1974 (Shiefer *et al.*, 1974). Au Québec, c'est en 1978-1979 que les pertes causées par la pleuropneumonie porcine commencèrent à être plus considérable (Higgins *et al.*, 1982).

Depuis l'étude de l'homologie de l'ADN, le % G+C démontre que *H. pleuropneumoniae* est plus proche de *Actinobacillus lignieresii* que de *Haemophilus influenzae* et en se basant sur le fait que l'hémolyse n'est pas un critère pour classer les souches, car ces dernières peuvent facilement perdre ce caractère après quelques passages *in vitro*. Pohl *et al.* (1983) transfèrent l'agent causal de la pleuropneumonie porcine au genre *Actinobacillus*, un membre de la famille des *Pasteurellaceae*. Enfin, l'espèce *Actinobacillus pleuropneumoniae* a été subdivisée en deux biovars selon le besoin de croissance en NAD :

- * NAD-dépendant représente les bactéries du biovar I
- * NAD-indépendant représente les bactéries du biovar II.

Plus tard, Niven et Lévesque (1988) montrent que les souches du biovar II peuvent être aussi dépendantes du NAD.

2- Étiologie

Actinobacillus pleuropneumoniae est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine. C'est une bactérie à Gram négatif, capsulée, avec une morphologie typique des coccobacilles, non mobile, anaérobie facultative et possédant une activité hémolytique (une hémolyse complète sur gélose au sang). Une caractérisation morphologique et biochimique complète a été effectuée par Shope (1964) et Kilian *et al.* (1978). Pour des fins de diagnostic, *A. pleuropneumoniae* est souvent distingué des autres *Haemophilus* rencontrés chez le porc: *H. parasuis*, *Haemophilus* sp. " Minor group ", *Haemophilus* sp. " Taxon C" et *Haemophilus* sp. " Urease-negative ". Dans le cas du biotype II, Rapp *et al.* (1985) ont démontré comment les différencier des autres *Actinobacillus* communs aux porcs.

Jusqu'à date, 12 sérotypes sont rapportés. Les sérotypes 1 à 5 ont été décrits par Kilian *et al.* (1978), alors que les sérotypes 1 et 5 ont été subdivisés en 1A et 1B; 5A et 5B respectivement (Ricka *et al.*, 1994; Nielsen, 1986a). Le sérotype 6 a été décrit par Nielsen (1982), le sérotype 7 par Rosendal et Boyd (1982), et le sérotype 8 par Nielsen et O'Connor (1984). Les sérotypes 9 et 10 ont été proposés par Nielsen (1985a; 1985b). Le sérotype proposé par Kamp *et al.* (1987) a été officiellement considéré le 11ième par Nielsen et enfin le sérotype 12 a été décrit par Nielsen (1986b).

La spécificité de la sérologie est donnée par les polysaccharides capsulaires et lipopolysaccharide (LPS). Cependant, quelques sérotypes montrent une certaine similarité ou identité avec la chaîne O des LPS, ce qui explique les réactions croisées rencontrées entre différents sérotypes notamment entre les sérotypes: 1, 9 et 11; 3, 6 et 8; 4 et 7 et enfin entre 1 et 7 (Mittal *et al.*, 1988; Perry *et al.*, 1990; Mittal et Bourdon, 1991)

2-1 Les liens antigéniques entre les sérotypes :

La pleuropneumonie porcine est devenue, depuis ces 15 dernières années, une des principales maladies d'origine bactérienne en production porcine. Les 12 sérotypes que comportent cette bactérie ont été définis sur la base des antigènes polysaccharidiques capsulaires. Il a été démontré que quelques épitopes lipopolysaccharidiques, partagés entre certains sérotypes, causent des réactions croisées. La caractérisation de ces réactions est nécessaire afin d'établir un système de sérotypie, ainsi que des épreuves sérologiques plus fiables. Les réactions croisées observées entre les sérotypes 1, 9 et 11, font que la classification a été désignée: K1: O1, K9: O1 et K11: O1 respectivement (Perry *et al.*, 1990; Rodriguez-Barbosa *et al.*, 1996). On rencontre en plus, des réactions croisées entre les sérotypes 3, 6 et 8, dont l'antigène partagé est localisé au niveau du polysaccharide capsulaire (Nielsen et O'Connor, 1984). Gottschalk *et al.* (1998) rapportent que les sérotypes 4 et 7 partagent un épitope au niveau de la chaîne "O" du LPS.

En 1989, Fodor *et al.* rapportent des réactions croisées, entre la souche N-282 du sérotype 2 biotype II et la souche S1536 du sérotype 2 biotype I. Par la suite, Nielsen *et al.* (1996) indiquent que la souche 7317 du sérotype 2 (qui représente 9 isolats du sérotype 2 examinés) partage des épitopes polysaccharidiques capsulaires avec le sérotype 2 (S1536 et 4226) en plus, des épitopes partagés au niveau de la chaîne "O" du LPS avec le sérotype 7 (WF83) biotype I, d'où la désignation K2: O7.

3- Épidémiologie

Actinobacillus pleuropneumoniae est un parasite du tractus respiratoire ayant une affinité quasi exclusive pour l'espèce porcine. Olander (1963) a isolé la bactérie d'un agneau (cas d'arthrite), mais l'organisme comme tel n'a pas été isolé des petits rongeurs, oiseaux et l'humain (Nicolet, 1985). Cette bactérie a une courte vie dans l'environnement (Nicolet, 1992).

La pleuropneumonie porcine est largement distribuée à travers le monde. De ce fait, les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* sont géographiquement distribués: les sérotypes 1, 5, et 7 sont les plus fréquents en Amérique du Nord alors que d'autres sérotypes sont rapportés mais sont beaucoup moins fréquents, à savoir les sérotypes 3, 4, 8 et 9. Les sérotypes 1, 2, 5, 7, et 9 sont rencontrés en Europe. Certains sérotypes comme le sérotype 3 sont considérés non virulents et ne possèdent aucune importance épidémiologique dans certains pays, alors qu'ils peuvent être épidémiques dans d'autres pays (Desrosiers *et al.*, 1984; Brandreth et Smith, 1985). La prévalence des sérotypes varie d'une région à l'autre et peut également varier dans le temps pour une même région (Mittal *et al.*, 1998).

Les mortalités et les médicaments constituent les deux principales pertes économiques associées à cette maladie. L'agent infectieux est localisé souvent dans les lésions pulmonaires nécrotiques et/ou amygdales mais il est moins fréquent dans les cavités nasales (Kum *et al.*, 1984).

L'infection expérimentale montre qu'une exposition massive induit une mortalité après quelques heures à quelques jours. Cependant, dans la phase aiguë, tous les porcs sont susceptibles selon la virulence de la souche et la particularité de l'environnement.

3-1 Modes de transmission

Les sources d'infections possibles d'un troupeau sont souvent par contact direct d'un porc avec un autre ou sur de courtes distances, par des gouttelettes. Toutefois, le rôle possible des aérosols dans la transmission sur de longues distances a été suggéré. La transmission peut se faire également par l'intermédiaire des petits rongeurs ou oiseaux (peu probable) mais l'humain est un hôte non commun pour *A. pleuropneumoniae* (Nicolet, 1985). Le mélange des porcs et leurs déplacement augmentent le risque de la pleuropneumonie, ainsi que les facteurs de stress, en particulier le changement rapide de température, une grande humidité et l'insuffisance de ventilation.

La survie de la bactérie dans l'environnement est considérée de courte durée, par contre, si elle est protégée par du mucus ou des matières organiques, sa vie peut se prolonger jusqu'à quelques jours (Nicolet, 1992).

3-2 Traitement

A. pleuropneumoniae est particulièrement sensible *in vitro* aux antibiotiques suivants: pénicilline, ampicilline, céphalosporine, chloramphénicol, tétracycline, colistine, sulfonamide, cotrimoxazole (triméthoprime-sulfaméthoxazole) et gentamicine (Nicolet et Shifferli, 1982; Gilbride et Rosendal, 1984). La résistance à l'ampicilline, streptomycine, sulfonamides, tétracyclines et chloramphénicol est observée fréquemment avec les sérotypes 1, 3, 5 et 7 de *A. pleuropneumoniae* (Gilbride et Rosendal, 1984 ; Vallancourt *et al.*, 1988). Le succès du traitement dépend de la rapidité à détecter les premiers signes cliniques et la rapidité de l'intervention thérapeutique.

3-3 Prévention

La prévention et le contrôle de la pleuropneumonie peuvent être accomplis de différentes façons. Une fois l'infection établie dans un troupeau, il est difficile d'éliminer l'agent infectieux. La première chose à faire est de contrôler le facteur environnemental (améliorer l'aération) pour le troupeau infecté. Il faut ensuite séparer le troupeau dans la ferme, selon les âges, avec l'utilisation des tests sérologiques pour détecter les porteurs sains ou les porteurs sous-cliniques de la bactérie. Donc, effectuer des tests sérologiques sur des échantillons de sérums de porcs âgés de 7 et 8 semaines. La maladie a une période d'incubation de 24 heures chez le porc, de plus la bactérie peut persister chez l'animal pendant 10 mois et il y a de fortes possibilités qu'elle persiste toute sa vie (Nicolet, 1992).

Il existe aussi des vaccins utilisant des bactéries mortes, mais ils ont une faible efficacité contre la maladie. L'idéal serait d'utiliser des bactéries vivantes et atténuées. Le vaccin réduit la mortalité mais ne prévient pas l'infection.

4- Pathologie et pathogénicité

La pathogénie de la pleuropneumonie n'est pas bien comprise et elle est considérée comme multifactorielle. Cependant, la forme aiguë et subaiguë de la maladie ressemble au choc septique de l'humain (Kiorpes *et al.*, 1990).

Il existe plusieurs facteurs de virulence attribués à l'agent infectieux dont, la capsule, l'endotoxine, l'exotoxine (hémolysine et cytotoxine) et d'autres qui jouent un rôle important dans la pathogénie (Inzana, 1991; Bertram, 1990; Fenwick, 1990; Nicolet, 1990). La différence de virulence entre les sérotypes ou au sein d'un même sérotype a été observée par Desrosiers *et al.*, 1984 ; Rosendal *et al.*, 1985 ; Brandreth et Smith, 1987. Il a été suggéré que quelques différences

seraient dues à la capsule (Jacques *et al.*, 1988), à la composition du LPS (Jenson et Bertram, 1986) ou le type d'hémolysine (Frey et Nicolet, 1990). Quand le porc est infecté avec d'autres agents pathogènes du tractus respiratoire, cela peut contribuer au développement de la pleuropneumonie (Caruso et Ross, 1990).

L'infection expérimentale ou naturelle stimule la réponse immunitaire. Toutefois, la présence d'anticorps peut être détectée approximativement 10-14 jours après l'infection. Ces anticorps atteignent un niveau maximum 4-6 semaines post-infection et peuvent persister à un bas niveau pendant quelques mois (Nielsen, 1988).

4-1 Signes cliniques :

La sévérité des signes cliniques peut varier en fonction de l'état de l'immunité de l'animal, du stress, des conditions d'environnement et enfin du degré d'exposition de l'animal à l'agent infectieux d'où la possibilité de cas aigus ou de cas chroniques de la maladie (Nicolet *et al.*, 1969; Nielsen 1982; Shope, 1964).

4-1A Forme aiguë:

Lors d'une infection aiguë à *A. pleuropneumoniae*, les porcs sont subitement malades avec une fièvre élevée et sont apathiques et anorexiques. Il peut y avoir une courte période de vomissement et de diarrhée, des problèmes sévères de respiration avec cyanose, dyspnée et des mortalités soudaines. Chez les porcs infectés on observe souvent des écoulements de sang au nez et à la bouche. La mort peut subvenir 24-36 heures après l'apparition des signes cliniques, comme elle peut se manifester avant même qu'on observe les signes cliniques (Fedorka *et al.*, 1993; Nicolet, 1992).

4-1B Forme chronique :

La forme chronique se caractérise par peu ou pas de fièvre, une toux qui se développe spontanément et une perte d'appétit qui entraîne la perte de poids. Un animal peut être infecté sans qu'on observe de signes cliniques. Un pourcentage élevé de pleurésie chez les porcs en phase terminale de croissance est un bon indicateur d'une infection par *A. pleuropneumoniae* (Hani *et al.*, 1973; Pattison *et al.*, 1957; Olander, 1963; Shope, 1964)

5- Diagnostic

5-1 Diagnostic microbiologique:

L'isolement d'*A. pleuropneumoniae* à partir de lésions pulmonaires typiques de pleuropneumonie ou à partir d'autres organes (septicémie) peut s'effectuer avec un peu de difficulté, car il n'est pas impossible d'isoler d'autres organismes à partir de ces lésions, spécialement *P. multocida* (Nicolet, 1992).

L'isolement primaire se fait sur gélose au sang de mouton 5 % avec une strie de *Staphylococcus aureus*. Après une incubation de 18 heures on voit des colonies tout autour de la strie. *Actinobacillus pleuropneumoniae* est une bactérie à Gram négatif, ayant une apparence de coccobacille pléomorphe. Elle est également anaérobie facultatif, non sporulant, capsulée et non mobile. Sur gélose au sang, la zone d'hémolyse est accentuée par la β -hémolysine de *Staphylococcus aureus* d'où la réaction de CAMP positive. La croissance nécessite le facteur V (Kilian., 1976). Parmi les réactions biochimiques, l'uréase est positive (Fedorka Cray *et al.*, 1993). Pour une identification de routine, le test de CAMP, l'activité d'uréase et la fermentation du mannitol sont suffisantes (Nicolet, 1970; Kilian, 1976).

Dans le cas d'une infection mixte, en particulier avec *P. multocida*, ou lors de contamination bactérienne, l'utilisation d'un milieu sélectif est recommandée (Little et Harding, 1971; Gilbride et Rosendal, 1983).

5-2 Diagnostic sérologique :

La sérologie s'est avérée un outil tout à fait déterminant pour le contrôle de la pleuropneumonie dans les pays où la production porcine est intensive. Toutefois, l'expérience a démontré que la sérologie avait des lacunes en termes de sensibilité et de spécificité. Les tests sérologiques tels que: le test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Nicolet *et al.*, 1981; Bossé *et al.*, 1990) et le test de fixation du complément (CFT) (Nicolet *et al.*, 1971), ont été évalués pour la détection des anticorps contre *A. pleuropneumoniae*. Ces tests se sont avérés très spécifiques mais leur sensibilité est faible. Cependant, le CFT reste à ce jour le test de référence. L'essai de neutralisation de l'hémolysine (hemolysin neutralization assay) possède une sensibilité et spécificité élevées mais il ne peut pas détecter le sérotype 7 à cause d'un manque de production de l'hémolysine (Fedorka-Cray *et al.*, 1993). Mittal *et al.*, 1984 ont mis au point le test d'agglutination en tube en présence de 2-mercaptoéthanol; ce dernier élimine les IgM qui sont souvent impliquées dans les réactions croisées.

La sérotypie sert à la détection de l'antigène responsable du sérotype spécifique. Le test de coagglutination (Mittal *et al.*, 1983) sert à détecter l'antigène à partir d'extrait de poumon. La sérotypie peut être confirmée par une agglutination sur lame (slide agglutination), ou à partir d'une culture sur PPLO (pleuropneumonia-like organisme medium) par le test de coagglutination (Mittal *et al.*, 1987). Dans plusieurs cas, l'identification finale peut être effectuée par les tests

d'immunodiffusion en gel et d'hémagglutination indirecte. Une évaluation des méthodes de sérotypie disponibles est donnée par Nicolet (1988).

La sérotypie est recommandée pour une confirmation rapide du diagnostic bactériologique.

6- Facteurs de virulence:

De nombreuses composantes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* telles que les fimbriae, la capsule, le LPS, les protéines de la membrane externe, et les toxines sont impliquées dans la virulence de la bactérie.

6-1 Fimbriae:

Les fimbriae servent à plusieurs bactéries pour l'attachement aux cellules épithéliales, aidant ainsi à la colonisation de l'hôte. Pour *A. pleuropneumoniae*, le rôle des fimbriae ou "fimbriae-like structures" dans la colonisation n'est pas encore établi (Utrera et Pijoan, 1991; Dom *et al.*, 1994).

Approximativement la moitié des isolats provenant d'infections expérimentales possèdent des fimbriae (Dom *et al.*, 1994). *In vitro*, les fimbriae sont présents chez *A. pleuropneumoniae* quand la bactérie est cultivée sur un milieu solide, mais sont absents en milieu liquide (Dom *et al.*, 1994).

6-2 Capsule (polysaccharides capsulaires):

La nature de la capsule est polysaccharidique et sa présence a été rapportée chez toutes les souches de référence d'*A. pleuropneumoniae*. La structure chimique de la capsule consiste en une unité de répétition

d'oligosaccharides (Inzana, 1991) et sa charge est négative due au phosphate ou aux résidus de l'acide carboxylique (Perry *et al.*, 1990). Les polysaccharides capsulaires sont responsables du sérotype spécifique d'*A. pleuropneumoniae* (Inzana et Mathison, 1987; Inzana *et al.*, 1988). La capsule est la première composante qui protège la bactérie de la défense de l'hôte (Perry *et al.*, 1990). Les souches capsulées d'*A. pleuropneumoniae* des sérotypes 1-3, 5 et 7 sont résistantes à l'effet bactéricide des anticorps et du complément de lapin et de porc. Alors que Rycroft et Cullen, (1990) rapportent que les sérotypes 2 et 3 sont éliminés par le sérum normal humain, les travaux de Inzana *et al.* (1988) suggèrent que la capsule protège la bactérie de la lyse par le complément. Par contre, les anticorps dirigés contre la capsule contribuent à l'immunité spécifique de sérotype induite par la vaccination avec la bactérie (Inzana *et al.*, 1988; Inzana, 1991). L'anticorps dirigé contre la capsule opsonise la bactérie. Cette opsonisation est suivie de la phagocytose par les macrophages alvéolaires et les neutrophiles (Byrd et Kadis, 1992; Beudet *al et.*, 1994). L'importance de la capsule a été démontrée avec des souches peu ou pas capsulées. Ces souches sont d'une faible virulence lorsque comparées à des souches capsulées, qui elles causent des signes cliniques. Inzana *et al.* (1988) rapportent que la souche de référence du sérotype 5 n'est pas détruite par le sérum normal humain, alors que le mutant non capsulé de cette souche est détruit par le sérum normal de porc, de lapin ou d'humain. Donc, un vaccin contenant le matériel capsulaire de la souche peut aider à stimuler les mécanismes de défense de l'hôte.

Certains souches à l'intérieur d'un même sérotype sont plus virulentes que d'autres (Rosendal *et al.*, 1985). Jacques *et al.* (1988) montrent que les différences de virulence entre les sérotypes pourraient être expliquées par des différences dans la structure du matériel capsulaire entre les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*.

6-3 Lipopolysaccharides (LPS):

Les lipopolysaccharides sont les constituants majeurs de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Les LPS, également appelés endotoxine, ont une structure qui consiste en deux parties: une partie lipidique (lipide A) et une partie polysaccharidique. Cette dernière est composée de deux parties : l'antigène "O" polysaccharidique et le noyau oligosaccharidique (Fenwick, 1990). Chaque sérotype a un polysaccharide qui lui est spécifique (Perry *et al.*, 1990; Inzana, 1991) mais il peut exister des épitopes communs de nature lipopolysaccharidique partagés entre quelques sérotypes (1, 9 et 11; 3, 6 et 8 et enfin entre 4 et 7). Les conséquences d'une telle homologie entre les sérotypes, se manifestent par des réactions croisées dans certains tests sérologiques (Perry *et al.*, 1990).

Jusqu'à maintenant, il a été rapporté que les sérotypes 2, 4 et 7 possèdent un LPS lisse, alors que les sérotypes 1 et 5 possèdent un LPS partiellement rugueux et que les sérotypes 3 et 6 ont un LPS rugueux. Toutefois, le LPS rugueux a été rapporté parmi les souches du sérotype 5 (Fenwick *et al.*, 1986). Bélanger *et al.* (1990) rapportent que 83% des souches possédant un LPS lisse (sérotypes 2 et 7) adhèrent en grand nombre à la trachée de porc alors que 80% des sérotypes possédant un LPS partiellement rugueux (sérotypes 1 et 5) adhèrent pauvrement.

Le LPS purifié cause des lésions pulmonaires sévères chez le porc. Cependant, dans le contexte des lésions pulmonaires causées par *A. pleuropneumoniae*, les lésions dues aux LPS ne sont pas nécrotiques ou hémorragiques (Udeze *et al.*, 1987). Ceci indique que les LPS ne sont pas responsables des lésions typiques de pleuropneumonie, mais peuvent contribuer à leur formation. En plus, les LPS sont impliqués dans l'adhésion à la muqueuse de la trachée (Bélanger *et al.*, 1990), ce processus jouerait un rôle important dans la colonisation de l'hôte.

Les LPS sont fortement immunogènes, et l'immunisation avec le LPS purifié induit une protection partielle. Les LPS, comme la capsule, peuvent être responsables de la spécificité de sérotype. Mais ils font partie des facteurs de virulence d'*A. pleuropneumoniae* qui interagissent avec d'autres facteurs (Fenwick *et al.*, 1986; Inzana *et al.*, 1988).

6-4 Protéines de la membrane externe (OMP) :

Un total de 3 à 5 protéines majeures et de 10 à 20 protéines mineures sont présentes dans la membrane externe des souches d'*A. pleuropneumoniae* sérotypes 1 à 9 qui ont été examinées par MacInnes et Rosendal (1987) et Rycroft et Taylor (1987). Les protéines majeures ont un poids moléculaire de 39-44 kDa (Rycroft et Taylor, 1987). Rapp *et al.* (1986) ont étudié le profil des protéines majeures des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* et rapportent que les sérotypes 1 et 9 ont un profil identique, de même que le profil des sérotypes 2 et 6. Le profil des protéines majeures des souches de champ des sérotypes 1 et 5 est similaire mais non identique à celui des souches de référence. Toutefois, le profil des souches de champ du sérotype 7 est identique à celui de la souche de référence.

Des protéines de la membrane externe spécifiques peuvent être induites sous des conditions restreintes en fer ou en additionnant du maltose. Les sérotypes 1 à 5 et 7 produisent deux protéines de 105 et 76 kDa dans des conditions restreintes en fer (Deneer et Potter, 1989a; Niven *et al.*, 1989); alors qu'une protéine de 42 kDa est produite par les sérotypes 1 à 3, et 5 à 7 lorsque le maltose est ajouté au milieu de culture (Deneer et Potter, 1989b). Immunologiquement trois protéines de 17, 32, 42 kDa sont les plus dominantes (MacInnes et Rosendal, 1987).

Du sérum prélevé d'un porc infecté avec la souche du sérotype 5 reconnaît la majorité des OMP, et quelques molécules de haut poids moléculaire (> 94 kDa). L'absorption du sérum avec la bactérie entière enlève les anticorps spécifiques aux protéines de 45, 49.5, 66.5 et quelques protéines dont le poids moléculaire est > 94 kDa, indiquant que ces protéines sont exposées sur la surface cellulaire. Toutefois, l'antisérum produit contre les OMP de quelques souches du sérotype 5 montre des réactions croisées avec les protéines des autres sérotypes (Rapp et Ross, 1986; Inzana et Mathison, 1987). MacInnes et Rosendal (1987) démontrent que les protéines de la membrane externe d'*A. pleuropneumoniae* sont similaires aux protéines des autres *Actinobacillus* spp et *Pasteurella haemolytica*, alors que la protéine de 17 kDa est commune aux bactéries à Gram négatif incluant *Escherichia coli*.

Il en résulte que les LPS et OMP sont responsables des réactions croisées entre les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* et entre les espèces. Ces réactions croisées peuvent être responsables du manque de spécificité des tests de diagnostics utilisant des préparations brutes ou l'antisérum dirigé contre la bactérie entière.

L'immunisation des porcs avec des OMP traités avec la protéinase-K induit, lors d'une infection expérimentale, une réduction significative de la sévérité et du nombre de porcs avec des lésions comparativement à une immunisation où on utilise des OMP non traitées ou traitées avec du périodate.

6-5 Les protéines qui lient le fer (Transferrin binding proteins) :

Les protéines qui lient le fer sont secrétées par tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. Au total, trois protéines différentes de 60, 62 et 65 kDa sont

identifiées parmi les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (Gerlach *et al.*, 1992a). Les protéines captent le fer de la circulation de l'hôte pour alimenter la bactérie car il

est essentiel à sa croissance (Ricard *et al.*, 1991). Ces protéines d'*A. pleuropneumoniae* sont spécifiques à la transferrine du porc et ceci peut expliquer pourquoi le porc est l'hôte naturel d'*A. pleuropneumoniae* (Gonzalez *et al.*, 1990).

6-6 Toxines (Apx) :

Actinobacillus pleuropneumoniae secrète des substances qui sont hémolytiques pour les érythrocytes de plusieurs espèces animales et qui sont cytotoxiques pour les macrophages et les neutrophiles pulmonaires du porc (Rosendal *et al.*, 1988; Van Leengoed *et al.*, 1989). Ces substances sont présentes dans le surnageant de culture de tous les sérotypes du biotype I, mais l'activité diffère pour chaque sérotype (Frey et Nicolet, 1990; Kamp *et al.*, 1991; Rosendal *et al.*, 1988). Au début, le rôle cytotoxique ou hémolytique d'*A. pleuropneumoniae* n'était pas clair car il était attribué à une ou plusieurs protéines. Toutefois, l'utilisation des anticorps monoclonaux a démontré la présence de trois protéines différentes qui possèdent l'activité hémolytique et/ou cytotoxique et qui sont secrétées par les 12 sérotypes (Kamp *et al.*, 1991). Par la suite, Frey *et al.* (1993) ont standardisé la nomenclature de ces protéines apparentées aux toxines de type RTX et les trois toxines ont été désignées ApxI, Apx II et Apx III.

La toxine Apx fait partie de la famille des RTX toxine qui est présente chez plusieurs bactéries pathogènes, comme α -hémolysine (Hly) d'*E. coli*. Cette toxine est codé par un opéron qui est constitué de 4 gènes, qui sont présents dans l'ordre suivant C, A, B et D (Fig 1). Le gène A code pour une protéine qui est synthétisée comme protéine inactive. La protéine qui code pour le gène C est un intermédiaire dans l'activation de la toxine. Les protéines qui codent pour les gènes B et D sont essentielles pour la sécrétion de la toxine à l'extérieur de la cellule bactérienne

(Welch et Pellett, 1988 ; Welch, 1991). Récemment, Frey *et al.* (1997) ont rapportés l'existence d'une 4 ième toxine chez *A. pleuropneumoniae*.

L'importance des toxines Apx dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae* et leur rôle dans la pathogénicité ont été mis en évidence par des mutants (Inzana *et al.*, 1991; Gerlach *et al.*, 1992b). Une protection immunitaire contre l'infection due à *A. pleuropneumoniae* a été démontrée par l'immunisation avec les toxines Apx en combinaison avec les autres composantes de la bactérie. Il en résulte que l'Apx est une composante essentielle pour la vaccination contre les souches homologues et hétérologues d'*A. pleuropneumoniae* (Byrd et Kadis, 1992; Beudet *et al.*, 1994).

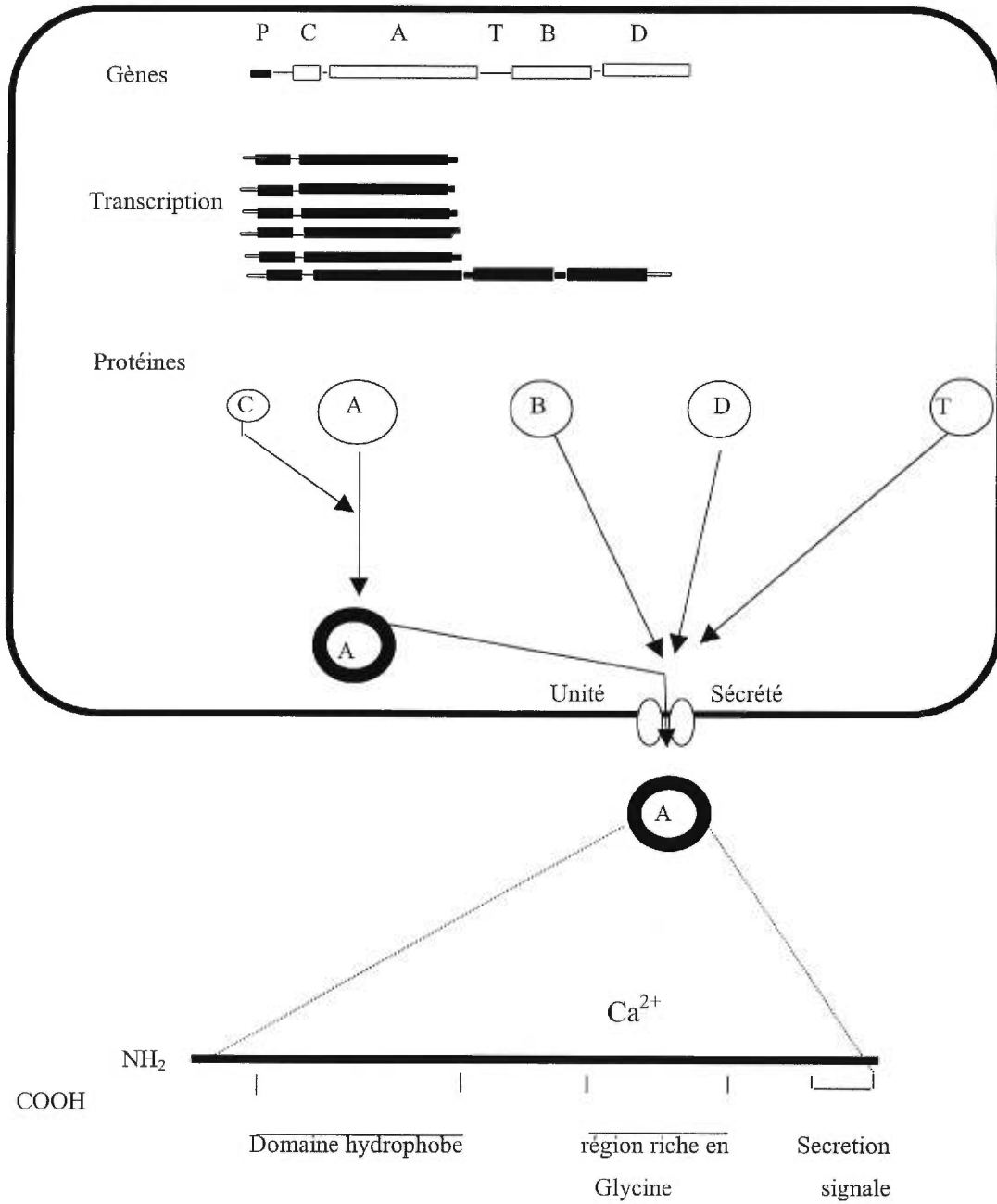


Figure 1: Représentation schématique d'une bactérie qui exprime la toxine RTX.

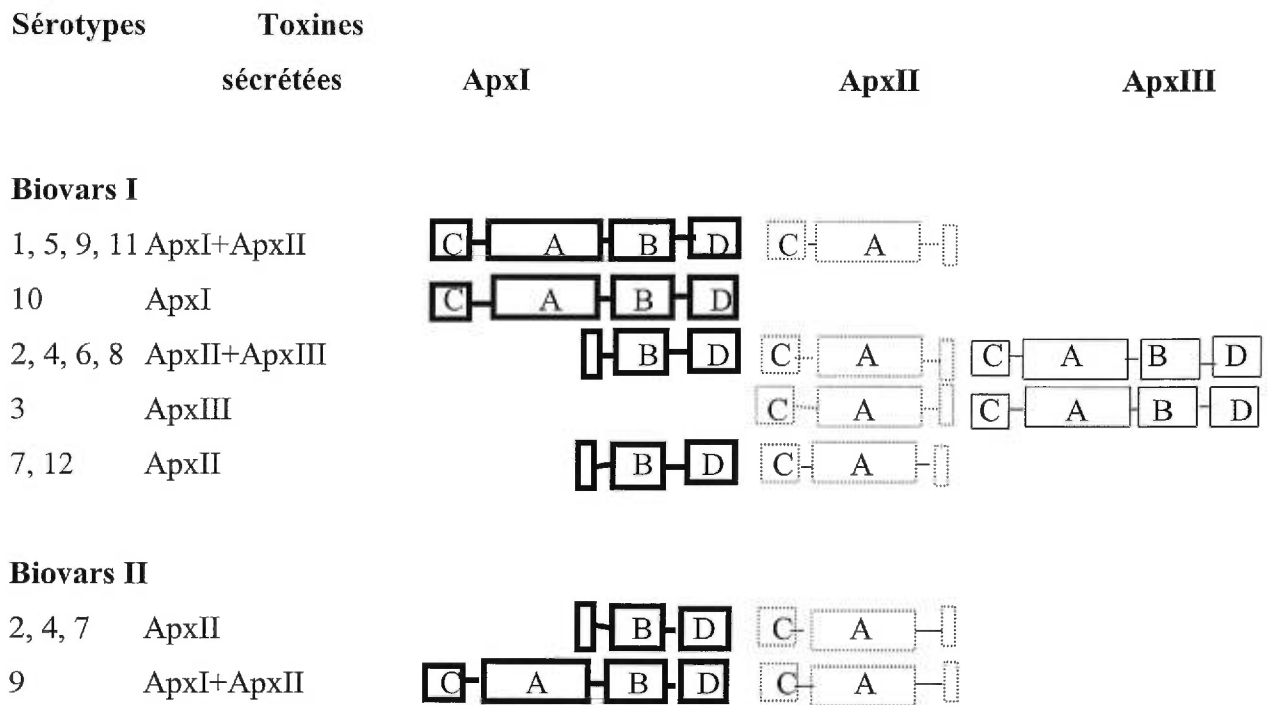


Figure 2: Schématisation du génotype et phénotypes des toxines Apx selon leur présence dans les différents sérotypes et biovars d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Study of Antigenic Heterogeneity among *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotype 7

M. TADJINE and K. R. MITTAL *

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Qué., Canada, J2S 7C6

* Corresponding author

3200, Sicotte, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

Phone: (450) 345-8521 ext: 8296

Fax: (450) 778-8113

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotyping, cross-reaction

ABSTRACT

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) serotype 7 strains were studied for their antigenic heterogeneity using rabbit polyclonal hyperimmune sera against all the known twelve reference strains of APP and a battery of different serological tests such as coagglutination (COA), immunodiffusion (ID), indirect hemagglutination (IHA), counterimmunoelectrophoresis (CIE), rapid dot-ELISA (RDE), serum soft-agar (SSA) and growth agglutination (GA). Reference serotype 7 strain (WF83) showed cross-reactivity with reference serotype 1B strain (ISU158) but not with serotype 1A strains (4074 and ATCC 2788). Field serotype 7 strains showed cross-reactivities with serotypes 1A, 1B, 4, 9, 10, and 11 in COA, ID, and CIE tests, but not in IHA test. Serotype 7 strains could be clearly divided into 6 groups on the basis of their cross-reactivities with other serotypes of APP. Two field strains of serotype 7 (90-3182 and 86-1411) which appeared to be different from the typical serotype 7 strains were selected for further antigenic characterization. Strain 90-3182 reacted similarly in all the serological tests with antisera against both serotypes 1 and 7. Strain 86-1411 shared a partially identical precipitation line with serotype 7 reference strain. SDS-PAGE, Western blot, and Tricine SDS-PAGE assays were used for further antigenic characterization of these two strains. Using SDS-PAGE and western blot assay of whole-cell suspension of 16 field serotype 7 strains selected at random did not reveal any significant differences in the profile of outer membrane proteins. However, Western blot analysis of proteinase-K-treated whole-cell preparations of APP probed with rabbit hyperimmune sera against serotype 7 and 1 reference strains proved to be highly specific and sensitive to detect both serotype-specific as well as cross-reacting capsular polysaccharide

and/or somatic LPS antigens. Western blot assay of the 90-3182 strain revealed the presence of ladder profile identical with that of serotype 1A strain but not

with that of the serotype 7 strain. Similarly strain 86-1411 gave a ladder profile identical to that of the serotype 7 strain. In order to verify the results of the western blot assay, Tricine SDS-PAGE was used which has been shown to increase the resolution of the core region of LPS. The results of this test showed that the core of strain 90-3182 was type I similar to that of serotype 1 and the core of strain 86-1411 was type II similar to that of serotype 7.

1. INTRODUCTION

Porcine pleuropneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) is one of major problems in the modern swine industry all over the world. The organism may cause an acute respiratory infection, resulting in high morbidity and mortality, or a chronic persistent infection, resulting in severe economic loss (Nicolet, 1992). Two biotypes have been reported: biotype I requires Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) for growth, whereas biotype II which is much less common, does not (Pohl *et al.*, 1983; Fodor *et al.*, 1999). Twelve serotypes of *A. pleuropneumoniae* biotype I, based on capsular antigens, have been recognized (Nielsen, 1986a) with two subtypes A and B of serotypes 1 and 5 (Rika *et al.*, 1994; Nielsen, 1986b). Serotypes 1, 5 and 7 of biotype I are the most prevalent in North America and an increasing number of serotype 7 infection has been observed during the last few years, especially in high health status herds (Mittal *et al.*, 1998).

Serological diagnosis and vaccination programs have been used in an attempt to control the disease. Both these programs require an extensive knowledge of different serotypes existing in a particular region, as this organism is known to be antigenically heterogeneous with different serotypes showing different geographical distributions. Serotyping of APP which is of importance in epidemiologic studies, is carried out using various techniques such as Coagglutination (CoA), Immunodiffusion (ID), and Indirect hemagglutination (IHA) tests. Since these techniques are carried out with polyclonal antibodies, cross-reactivities with different serotypes of APP or with other bacterial species are sometimes observed. Serotype-specific antigens are mainly capsular polysaccharide epitopes, whereas cell wall lipopolysaccharide may be shared between different serotypes, such as strains of serotype 1, 9 and 11; 4 and 7 as

well as those of 3, 6 and 8.(Mittal *et al.*, 1988b, Mittal, 1990; Mittal and Bourdon, 1991; Perry *et al.*, 1990)

Strains of serotype 7 are known to be antigenically heterogeneous and share common antigens with several other serotypes. Strong cross-reactivities between strains of serotypes 4 and 7 as well as between strains of serotype 7 and those of other serotypes may cause a great deal of problems in both serotyping and serodiagnosis. Precise identification of serotype 7 thus becomes extremely important especially in view of the recently observed cross-reactivity between some strains of serotypes 7 and 1 in various serological tests (Mittal and Bourdon, 1991; Gottschalk *et al.*, 1999).

Serotype 7 is generally considered to be less virulent than serotypes 1 and 5 (Frey and Nicolet, 1990). However, several studies have indicated that within any given serovar, there may be striking differences in the virulence among isolates (Bertram, 1985; Brandreth and Smith, 1987). Komal and Mittal (1990) demonstrated from their experimental studies in mice that some strains of serotype 7 were found to be highly virulent.

The purpose of the present study was to examine the antigenic heterogeneity among different strains of serotype 7 and their cross-reactivities with other serotypes using a battery of serological tests and rabbit polyclonal hyperimmune

2. Materials and Methods

2.1 Bacterial strains

Reference strains representing serotypes 1 through 12 of *A.pleuropneumoniae* were 4074, ATCC 27088 (1A), ISU158 (1B), S1536 (2), 1421 (3), M62 (4), K-17 (5a), 81-7502 (5b), FemØ (6), WF83 (7), 405 (8), CVJ-13261 (9), D13039 (10), 56153 (11) and 8329 (12). One hundred twenty two field isolates of serotype 7 originating from pulmonary tissues of pigs that had died of acute pleuropneumonia, or from tonsils of chronically infected pigs, were received from different diagnostic laboratories in Canada. The cultural and biochemical characterization of the bacteria was done according to the method of Biberstein *et al.* (1977).

2.2 Preparation of hyperimmune sera in rabbits:

Antisera against all the reference strains of serotypes 1-12 and two field strains of serotype 7 (90-3182 and 86-1411) were prepared in rabbits by intravenous inoculations of formalized whole cell antigens. Young adult rabbits were injected twice a week with an antigen preparation of each strain. In total, seven injections were given in an increasing dose. The method used has been described previously by Mittal *et al.* (1982). The rabbits were bled 7 days after the last injection; the sera were separated and stored at -20 °C until used.

2.3 Preparation of antigens:

Reference and field strains of *A. pleuropneumoniae* were grown on enriched pleuropneumonia-like organism (PPLO) agar medium overnight at 37 °C. Each

plate was washed off gently in 3 ml of phosphate-buffered saline solution (PBS; pH 7.0) containing 0.5% formalin, and pooled. The pooled whole-cell suspension of each strain was divided into two portions. One portion was kept at room temperature for 4 h and a second portion was kept at 100 °C in a water bath for 1h; two antigen preparations were referred to as WC and BC, respectively. BC antigens were centrifuged at 800 ×g for 30 min and supernatants were collected and referred to as BC-SE.

2.4 Serological tests:

2.4A Coagglutination (CoA) test :

Details of the preparation of CoA reagents and the procedure used have been described earlier by Mittal *et al.* (1983a). BC antigens were used for serotyping. Briefly, *Staphylococcus aureus* strain Cowan I (NCTC 8530) capable of producing a large amount of protein A and serotype-specific antisera produced in rabbits were used for preparation of Co-A reagents. One drop of the CoA reagent was mixed on a glass slide with an equal volume of bacterial suspension. A positive reaction in 2 to 3 min was characterized by a distinct clumping.

2.4B Immunodiffusion (ID) test:

ID test was carried out as described by Mittal *et al.* (1988a) using BC-SE as antigen and hyperimmune sera against all the known serotypes of APP, in small plastic petri dishes containing 1% agar buffered with PBSS (pH 7.2). The reagent wells were 2 mm deep and 5 mm in diameter. Plates were incubated at room temperature in a water-saturated atmosphere; and plates were read daily for 2 days for the presence of a precipitation line.

2.4C Indirect haemagglutination (IHA) test:

IHA was performed with a microtiter system (Dynatech lab.inc) using BC-SE as antigen. The overnight growth on PPLO agar was washed off in PBS containing 0.5% formalin. The suspension was adjusted to 10% concentration and BC-SE was used directly to sensitize sheep red blood cells to be used in the IHA test. Details of the IHA test have been described previously by Mittal *et al.* (1983b).

2.4D Counterimmunoelectrophoresis (CIE) test:

CIE was carried out as described by Mittal *et al.* (1993) using BC-SE. Cathodal wells were filled with BC-SE antigen and anodal wells were filled with antisera. Four juxtaposed sheets of filter paper were used as connecting wicks to the tampon. The antigens and antisera were electrophoresed for 60 minutes at 80 V and the reactivity was expressed as visible precipitation lines.

2.4E Rapid dot-ELISA (RDE):

Field strains of serotype 7 were tested by RDE as described by Achacha and Mittal (1995). Three μ l of BC were used for coating the nitrocellulose membrane (Bio-Rad) and incubated at room temperature for 15 min. Nitrocellulose membranes were blocked with 1% (v/v) skim milk in PBS for 30 min and incubated with the rabbit polyclonal antiserum diluted to 1/25,000 in PBS containing 1% of skim milk, at room temperature for 1h. The membranes were washed 3 times in PBS containing 0.05% tween-20 (PBS-T) and incubated for 1h at room temperature with optimally diluted goat anti-rabbit immunoglobulin coupled to peroxidase. The membranes were rinsed 3 times with PBS-T, and

finally 4-chloro-1-naphthol was added. The color reaction was stopped by washing the membrane in water and the reactivity was expressed as a visible coloured dot on the membrane.

2.4F Serum-soft agar (SSA) test:

Colonial morphology in serum-soft agar was determined according to the method of Finkelstein and Sulkin (1958). One drop of APP culture (grown on PPLO agar for 18 h at 37°C) containing approximately 10^8 colony forming units was added to 1ml of rabbit antisera optimally diluted in PPLO broth and mixed with 0.15% bacteriological agar and incubated overnight at 37°C. Negative control using normal rabbit serum showing diffuse mucoid colonies and positive control using known antiserum showing compact type colonies were always kept. When diffuse colonies were converted to compact-type growth by addition of antiserum, the organisms were designated as belonging to the same serotype as that which had been used for rabbit immunization. Conversion of diffuse type colonies to compact type was considered as positive.

2.4G Growth Agglutination (GA) test:

GA was carried out as described by Mittal and Tizard (1979). Optimal dilutions of cultures grown overnight in PPLO broth at 37°C were added to different dilutions of rabbit antisera starting at 1/5 to 1/200 in PPLO broth. The mixtures were incubated overnight at 37°C and examined for the presence of agglutinated growth. The growth agglutinin titre was expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum showing distinct clump of organisms and a clear supernatant. Negative control tubes showed no agglutination but were turbid as a result of

growth of the organisms. A small button of sedimented growth was sometimes present in negative control tube, which became turbid on mild shaking.

2.4H Absorption of rabbit antisera:

Rabbit hyperimmune sera against the WC antigens of reference (WF83) and two field strains (90-3182a and 86-1411) of serotype 7 were absorbed with an equal volume of 10 % suspensions of WC antigens of homologous and heterologous strains in PBS. The mixtures were kept at 37°C for 2h and then centrifuged at 800 ×g for 30 min. The second absorption was done in the same way. The sera were tested before and after absorption for antibodies against homologous and heterologous strains by ID test.

2.5 Purification of capsular polysaccharide:

Capsular material was extracted as described by Inzana *et al.* (1988). Cultures in PPLO broth were incubated with constant shaking for 18 h at 37 °C, and centrifuged at 10,000 × g for 10 min to remove the cells. Cells were washed twice in PBS pH 7.4, and their supernatants were pooled. Polyanionic material was extracted from the pooled supernatants by overnight precipitation at 4 °C with 25 mM hexadecyltrimethyl-ammonium bromide (Sigma). Precipitates were collected by centrifugation at 10,000 × g for 30 min, resuspended in 0.4 M NaCl and held overnight at 4 °C. The pellet obtained by centrifugation at 20,000 × g for 10 min was re-extracted in 0.4 M NaCl. Supernatants from two extractions were combined and two volumes of cold 95 % ethanol were added. Following

incubation at -20 °C for two days, precipitate was collected by centrifugation at 15,000 × g for 30 min at -15 °C and resuspended in distilled water.

2.6 SDS-PAGE and Western blotting:

WC antigens of field and reference strains of serotype 7 were separated by SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The antigens were solubilized in sample buffer containing 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 1M trisbase (pH8.3) and 0.025% bromophenol blue and the solution was heated at 100°C for 10 min. Antigens were separated on a 4.5% polyacrylamide stacking gel and a 10% separating gel. Samples were electrophoresed at 100 V (stacking gel) and 200 V (separating gel). Gels were either stained with silver nitrate as described by Tsai and Fresch (1982) or transferred to nitrocellulose membranes (0.2 µm; Bio-Rad) for Western blotting (Towbin *et al.*, 1979). Non-specific binding was blocked with a 2% casein solution and incubated with rabbit antiserum overnight at 4 °C for 1 h at room temperature. The membrane was washed three times with PBS-T. An optimal dilution of anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Sigma) in PBS-T was added and incubated at room temperature for 2 h. The membrane was washed and developed in 4-chloro-1-naphtol substrate for 1-5 min and the membrane was resuspended in distilled water in order to stop the reaction.

2.7 Treatment of antigens with proteinase K

WC antigens were treated with 100 mg/ml of proteinase K (Sigma) in PBS at 55°C for 1h as described by Hamel *et al.* (1987).

2.8 Tricine-SDS-PAGE (TSDS-PAGE):

TSDS-PAGE was carried out as described by Jacques *et al.* (1996). The stacking gel was prepared at a final concentration of 4.5% acrylamide and 0.08% bisacrylamide, and polymerized by the addition of 30 μ l of 10% ammonium persulfate and 10 μ l of TEMED per 10 ml of gel. The separating gel was prepared at a final concentration of 18% acrylamide, 0.36% bisacrylamide, and 10.5% glycerol. The gel was polymerized by the addition of 40 μ l of 10% ammonium persulfate and 4 μ l of TEMED (per 20 ml of gel). The buffers used were as follows: anode buffer (0.2 M Tris-HCL, pH 8.9), cathode buffer (0.1 M Tris-HCL, 0.1 M Tricine, 0.1% SDS, pH 8.25), and 0.4 \times gel buffer stock solution (4.0 M Tris-HCL, 0.4% SDS, pH 8.45). Agar-grown bacteria (2 mg) were suspended in 100 μ l of solubilization buffer (5.9 ml of 0.06 M Tris-HCL-1 mM EDTA-2% SDS (pH6.8), 4 ml glycerol, 0.8 ml 2-mercaptoethanol, and 0.4 ml saturated solution of bromophenol blue), and then boiled for 8 min. An equal volume of proteinase K (1mg/ml; Sigma chemical) prepared in 50 mM Tris-HCL (pH 8.0) containing 1mM CaCl_2 was added to the sample, and the mixture was incubated for 60 min at 60°C. Samples were electrophoresed for 3h at 38 mA. Gels were fixed for 30 min in 40% ethanol –5% acetic acid solution and stained with the silver-staining procedure of Tsai and Frasch (1982).

3. RESULTS

3.1 Distribution of different serotypes of APP isolated from lung lesions of acute porcine pleuropneumonia in Quebec.

Results shown in Figure 1 indicate the evolution of distribution of different serotypes of APP isolated from diseased pigs in Quebec. The number of isolates of serotype 1, which was the most prevalent (60-90%) until 1992, is constantly decreasing and presently represents about 17% of isolates. Since 1993, isolates of serotype 5 have become predominant with a prevalence of 39 % followed by a gradual increase in the prevalence of serotype 7 with 36 % in 1999, especially in high health status herds (Figure 1).

3.2 Serological reactivity of *A. pleuropneumoniae* reference and field strains of serotype 7 representing various groups using rabbit hyperimmune sera against reference strains of all the known 12 serotypes of APP

Reference strain of APP serotype 7 shared cross-reactivity only with serotype 1B; whereas field strains of serotypes 7 shared cross-reactivities with serotypes 1A, 1B, 4, 9, 10 and 11. Results showing field strains representing each of 6 groups of serotype 7 based on their cross-reactivity with other serotypes using various serological tests are given in Table 1.

3.3 Grouping of *A. pleuropneumoniae* serotype 7 field strains based on their cross-reactivities with other serotypes in the immunodiffusion test.

A total of 122 field isolates of serotype 7 were tested for their reactivities with rabbit hyperimmune sera against all the known 12 serotypes. More than 98% of the field strains of serotype 7 did not show any evidence of cross-reactivity with reference

strains 4074 and ATCC 2788 of serotype 1A in any of the serological tests used. However, more than half of the field isolates of serotype 7 cross-reacted with reference strain ISU158 of serotype 1B in all the serological tests except IHA and CIE (Table 2).

Seventeen percent of strains in group I did not show any cross-reactivities with any other serotype, whereas, 56 % of the strains in group II showed cross-reactivity with serotype 1B, 13 % of strains in group III with serotype 4, and 5 % in group IV with serotypes 1B and 4. A total of 7 % strains in group V with serotype 10, and only 2 % of the isolates in group VI showed cross-reactivity with serotypes 1A, 9 and 11

3.4 Effect of absorption of rabbit hyperimmune sera against reference and field strains of *A. pleuropneumoniae* serotype 7 with homologous and heterologous strains of serotype 7 as detected by ID test

Results shown in Table 3 clearly demonstrate the existence of antigenic heterogeneity within serotype 7 strains as shown by the ID test. Absorption of anti-WF83 serum with field strain 86-1411 did not remove antibodies against WF83. Similarly, absorption of anti-86-1411 serum with reference strain WF83 failed to remove antibodies against field strain 86-1411.

Most of the strains tested in ID test using anti-WF83 serum gave a precipitation line completely identical with strain WF83, and only a few strains were found to give partial identity with WF83.

3.5 SDS-PAGE and Western blot analysis of whole-cell preparations of serotype 7 strains probed with rabbit hyperimmune serum against serotype 7 reference strain

SDS-PAGE and Western blot analysis did not show significant differences in the profile of major outer membrane proteins of reference and field strains of serotype 7 (Figure 5). The results shown in Figure 6 present the evidence of cross-reactivities between capsular polysaccharide antigens of reference serotype 1B and 7 strains. Strains 86-1411 and WF83 showed an identical profile of both capsular and lipopolysaccharidic antigens. However, strain 90-3182 showed a similar reaction as shown by the reference serotype 1A (4074) strain with anti-WF83 serum (Figure 6). The serotype 4 strain (M62) showed one-way capsular polysaccharidic cross-reaction with anti-WF83 serum (results not shown). Reference strain WF83 and field strain 86-1411 showed an identical profile of both capsular polysaccharidic and lipopolysaccharidic antigens in Western blot (Figure 6 and 7). Strain 90-3182 shared capsular polysaccharide with reference strain WF83 (Figure 6); but shared neither capsular nor somatic antigens with strain 86-1411 (Fig 7).

Results of the Western blot analysis shown in Figure 8 presented evidence of an identical profile of both capsular and somatic antigens of serotype 1A (4074) and field strain 90-3182 with antiserum against 90-3182.

Tricine SDS-PAGE was used to further characterize the serotype identity of strain 90-3182 by determining its core type. Strain 90-3182 was found to possess the same core type (type I) as possessed by the serotype 1A reference strain. Whereas, strain 86-1411 possessed the core type II as that possessed by the serotype 7 reference strain.

4. DISCUSSION

More than 5000 strains of *A. pleuropneumoniae* (APP) isolated from lung lesions of pigs that died because of acute pleuropneumonia have been serotyped in our laboratory during the last several years. At present, strains isolated from acute infections are predominantly serotypes 5 and 7 with an average percentage of 45 and 32 respectively (Mittal *et al.*, 1998). Figure 1 demonstrates that the number of serotype 7 isolates in 1999 has tripled as compared to those in 1990.

Various techniques used for serotyping have their own limitations. Although all of these methods may be reliable, they present some disadvantages such as the time needed to perform the test or the cost of sera and reagents. COA, ID and IHA tests are routinely used in our laboratory for serotyping APP strains. The ID test is used all over the world as a confirmatory test for serotyping APP isolates. ID and IHA tests require only clear cell-free soluble antigens. The ID test was used because of its high specificity, the IHA test was chosen because of its high sensitivity to measure antibodies against soluble antigens. (Mittal *et al.*, 1988). The IHA test is efficient to detect agglutinating antibodies of both IgM and IgG types, whereas, the COA test is used primarily to detect antibodies of the IgG type (Mittal *et al.*, 1988). The COA test was found to be satisfactory for serotyping both rough and smooth strains, and was found to be more rapid, more specific and more sensitive than the rapid slide agglutination test for serotyping *A. pleuropneumoniae* (Mittal *et al.*, 1987). The IHA test has been found suitable for studying the antigenic relationship among strains of different serotypes of *A. pleuropneumoniae* (Mittal *et al.*, 1983b; Nielsen. and O'Connor, 1984; Gutierrez *et al.*, 1991). The Growth agglutination (GA) test could be used for characterizing surface antigens for non-autoagglutinating strains, whereas, the serum soft agar (SSA) test was found useful to characterize surface antigens of both autoagglutinating and non-autoagglutinating strains, as well as to differentiate strains showing different surface antigens (Figure 4). Both GA and SSA methods

were found to be suitable serological tests to characterize most superficially located surface antigens because of the use of live bacterial cells instead of killed cell suspensions or cell extractions routinely used in conventional serological tests. Both GA and SSA method have been used earlier by various workers to study the surface antigens of various microbes. However, these 2 tests have not been used earlier for surface characterization of *A. pleuropneumoniae*.

Strains of APP possess several antigens, some of which are shared by different serotypes. Serotyping of APP is based on identification and characterization of serotype-specific antigens. Strong cross-reactions between serotype 7 strains and those of other serotypes have been observed (Mittal and Bourdon, 1991; Gottschalk *et al.*, 1998). Precise identification of serotype 7 becomes extremely important especially in view of the recently observed strong cross-reactions between serotypes 7 and 1 strains (Mittal and Bourdon, 1991; Gottschalk *et al.*, 1999). In view of the fact that serotype 1 is recognized as the most virulent serotype involved in acute swine pleuropneumonia and that serotype 7 isolates are the second most prevalent in north America, such cross-reactions may cause a great deal of problems in both serotyping and serodiagnosis. It is not uncommon to encounter serotype 7 strains, which give confusing and contradictory results in serotyping because of the presence of strong cross-reactions.

Serotype 7 is generally considered to be less virulent than serovars 1 and 5 (Frey and Nicolet, 1990). Rogers *et al.* (1990) indicated that 2 Australian isolates of serovar 7 were of lesser virulence than those of serotype 1 but of similar virulence to serovars 2 and 3. However, several studies have indicated that within any given serovars, there may be striking differences in the virulence of isolates (Bertram, 1985; Brandreth and Smith, 1987; Komal and Mittal, 1990). Rosendal *et al.* (1985) concluded from their experimental studies that there was little difference in the virulence between serovars 1, 2 and 7.

Nielsen *et al.* (1996) demonstrated by latex agglutination and IHA tests the presence of identical capsular polysaccharidic epitopes between the serotype 2 reference strain

(S1536), and strain 7317 representative of the 9 serotype 2 isolates examined. However, ID test showed an antigenic relationship with the serotype 7 reference strain (WF83). Analysis by SDS-PAGE and immunoblot of LPS from strains S1536, WF83 and 7317 showed that strains WF83 and 7317 had an identical smooth LPS ladder pattern and they proposed the strain 7317 to be designated as K2:O7. Gottschalk *et al.* (2000) studied 3 isolates of APP (1B, 27E and 26B) on the basis of their cross-reactions in ID, COA, and IHA tests. Isolates 1B and 27E showed cross-reactivities with antisera against serotypes 1 and 7, but the 26B isolate showed cross-reactivities with antisera against 1, 7 and 4. Using serotype-specific monoclonal antibodies (Mabs) in dot-ELISA, isolates 1B and 27E were recognised by two different serotype 1-specific Mabs (directed to capsular epitopes) as well as by serotype 7 and serotype 4/7-specific Mabs (directed against O-chain LPS epitopes). Isolate 26B reacted with serotype 1-specific CPS Mab and with the O-chain LPS serotype 4/7-specific Mab. None of the isolates reacted neither with a serotype 1 O-chain LPS specific Mab nor with a serotype 7-CPS specific Mab. In order to confirm further, ELISA-inhibition test was used and the results obtained indicated that all three isolates possessed serotype 1-related CPS and serotype 7-related O-chain LPS antigens. In addition, isolate 26B also possessed serotype 4-specific O-chain LPS epitopes. Strains 1B and 27E were proposed to be designated as K1:O7 and strain 26E as K1:O7/4.

Results shown in Table 1 indicate the existence of several common antigens between serotype 7 field strains and those of other serotypes. Based on the presence of common epitopes, serotype 7 strains have been divided into 6 groups (Table 2). Results obtained are in complete agreement with those reported by Mittal and Bourdon (1991). The significance of the results shown in Table 2 in the present study lies in the fact that more than half of the serotype 7 strains isolated from cases of acute pleuropneumonia reacted strongly with antiserum against serotype 1B (ISU158) but not with antiserum against 1A (4074 and ATCC 2708). Until recently serotype 1 was considered as the major cause of swine pleuropneumonia in north America

(Mittal *et al.*, 1992; Mittal *et al.*, 1994). These results indicate that pigs infected with some strains of serotype 1 (mainly those of serotype 1B) could give false positive results in serology for serotype 7. Thus, this observation should be taken into consideration for both serotyping and serodiagnosis. The majority of serotype 7 (>98%) field isolates did not present any evidence of cross-reactivities with reference strains of serotype 1A (4074 and ATCC 2708) in any of serological tests used. Based on the results shown in Table 2, it is suggested that the use of antiserum against serotype 1A reference strains (4074 and ATCC 2708) could be helpful for differentiating between strains of serotype 1 and 7. The IHA test was found to be the most reliable serological test to characterize serotype specific antigens (Mittal *et al.*, 1983b; Gutierrez *et al.*, 1991; Mittal *et al.*, 1993). The implications of the heterogeneity of the strains described above for serodiagnosis and vaccination would require further studies.

Strain 86-1411 showed strong reactions with rabbit antiserum against serotype 7 reference strain WF83 in both SSA and GA tests, but not with antisera against other serotypes, whereas strain 90-3182 reacted equally well in both SSA and GA tests with antisera against reference strains of both serotypes 1B and 7. Antiserum against strain 90-3182 also reacted in both SSA and GA tests with reference strains of serotypes 1A, 1B and 7 (Results not shown). These observations prompted us to further study this strain which showed two-way cross-reactions in various tests.

Perry *et al.* (1990) studied the detailed structure of specific capsular polysaccharide and cellular lipopolysaccharide components of different serotypes of APP. They reported that a specific LPS antigenic O-chain component was always associated with a specific capsular polysaccharide. They further suggested that serotypes of APP could be more rigorously defined by specifications of both their capsular polysaccharide and cell wall LPS antigenic characteristics. The APP 90-3182 strain was isolated from pig tonsils from a chronically infected herd and was identified earlier as serotype 7 in our laboratory based on various serological tests used. In view

of the strong reactivity shown by strain 90-3182 in all the serological tests with antisera against serotypes 1 and 7; it was decided to characterize both capsular and somatic antigens using Western-blot analysis as well as Tricine SDS-PAGE. Although strain 90-3182 was strongly positive for both serotypes 1 and 7, results of Western-blot clearly characterized this strain as showing a profile identical with serotype 1A and not with serotype 7.

Jacques *et al.* (1996) suggested the presence of 2 core types in APP based on separation of lipopolysaccharides (LPS) by Tricine SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, which has been shown to improve resolution of low molecular mass migrating bands. Strains representing 12 serotypes of APP were divided into two groups according to the gel mobility of the core lipid A region of their LPS. The first electrophoretic core type (type I) was found in serotypes 1, 6, 9 and 11. The second electrophoretic core type (type II) was found in serotypes 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10 and 12. Strain 90-3182 possessed the same core (type I) as that possessed by serotype 1 and strain 86-1411 possessed a core type II as that possessed by serotype 7 (Results not shown). Since serotype 7 field strain 86-1411 showed a precipitation line partially identical with reference strain WF83 in ID test. Strain 86-1411 was found to give an antigen profile identical to reference strain WF83 in both SDS-PAGE and western-blot using antisera against both strains. The results of both western blot and tricine SDS-PAGE clearly demonstrated that strain 90-3182 belonged to serotype 1A and not to serotype 7 as identified earlier by conventional serological tests, whereas, strain 86-1411 belonged to serotype 7 as identified by other serological tests. The reference serotype 1 strain (1A and 1B) did not show any reactivity with anti- WF83 serum in the CIE, IHA, RDE, SSA and GA assays (Results not shown). Whereas, strain 90-3182 showed strong reactions with antisera against both serotypes 1A and 7 reference strains in all these tests. Results of further characterization of strain 90-3182 showed that this strain reacted equally well with antisera against both serotypes 1 and 7 in all the serological tests used.

Observed apparent serological cross-reactions between APP serotypes 4 and 7 may be due to the presence of antibodies to their LPS components since their LPS O-chains are both structurally similar being composed of repeating tetrasaccharide units with identical trisaccharide residues forming a common backbone (Perry *et al.*, 1990). Previous investigations have attributed apparent serological cross-reactivity between different serotypes to common LPS antigens (Mittal, 1990). Gottshalk *et al.* (1998) used monoclonal antibodies to demonstrate the existence of common epitopes to both serotypes 4 and 7 of APP located on O-chain LPS. One- or two-way cross-reactions between serotypes 4 and 7 and those between serotypes 7 and 1, 9, 10 or 11 may affect the reliability of serotyping and serodiagnostic results. Although in most cases it is not difficult to identify the serotype-specific antigens, because of their stronger antigenic activity compared with cross-reacting common antigens, which are only minor in nature. Usually, a combination of two or more serological tests is able to identify serotype specific antigens in strains showing strong cross-reactivity.

Currently used serological tests are specific and sensitive to identify type-specific antigens but may give confusing results for serotyping some strains. In such cases, it is recommended to use Western blot assay as a confirmatory test to identify serotype specific capsular and somatic antigens. Identification and characterization of the type specific and cross-reacting common antigens may help in the precise and accurate serotyping of APP as well as in the correct serodiagnosis of swine pleuropneumonia.

Acknowledgements

We gratefully thank Suzanne Bourdon for her kind help in serotyping.

REFERENCES

- 1) **Achacha, M, and K. R. Mittal.** 1995. Identification and characterization of genus-specific epitopes of *Serpulina* species using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2519-2521.
- 2) **Bertram, T. A.** 1985. Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.* **22**: 598-609.
- 3) **Biberstein, E . L., A. Gunnarsson, and B. Hurvell.** 1977. Cultural and biochemical criteria for the identification of *Haemophilus spp* from swine. *Am. J. Vet. Res.* **38**: 7-11.
- 4) **Brandreth, S. R., and I. M. Smith.** 1987. Comparative virulence of some English strains of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 2 and 3 in the pigs. *Res. Vet. Sci.* **42**: 187-193.
- 5) **Finkelstein, R. A., and S. E. Sulkin.** 1958. Characteristics of coagulase positive and coagulase negative staphylococcus in serum-soft agar. *J. Bacteriol.* **75**: 339-344
- 6) **Fodor, L., J. Varga, E. Molnar, and I. Hajtos,** 1989. Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine. *Vet. Microbiol.* **20**: 173-180
- 7) **Frey, J., and J. Nicolet.** 1990. Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 232-236
- 8) **Gottschalk, M., A. Lebrun, S. Lacouture, D. Côté, and K. R. Mittal.** 1998. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 7 and 4 using

monoclonal antibodies: demonstration of common LPS O-chain epitopes with *Actinobacillus lignieresii*. Vet. Microbiol. **65**: 271-182.

9) Gottschalk, M., A. Lebrun, S. Lacouture, D. Côté, J. Harel, C. Forget, and K. R. Mittal. 2000. Atypical *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates which share antigenic determinants with both serotypes 1 and 7. J. Vet. Diagn. Invest. (in press).

10) Gutierrez, C. B; Tascon, R. I; Vazquez, J. A, and Rodriguez Ferri, E. F.1991. Cross-reactivity between *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes comparing different antigens and serological tests. Res. Vet. Sci. **50** :308-310.

11) Hamel, J., Brodeur, B.R., Larose, Y., Tsang, P.S, Belmaaza, A. and Montplaisir, S., 1987. Monoclonal antibody directed against a serotype-specific, outer-membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b. J. Med. Microbiol. **23**:163-170

12) Inzana, T. J., Ma, T. Workman, R. P .Gogolewski, and P. Anderson. 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. Infect. Immun. **56**:1880-1889.

13) Jacques, M., S. Rioux, S. E. Paradis, C. Bégin, and M. Gottschalk.1996. Identification of two core types in lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* representing serotypes 1 to 12. Can. J. Microbiol. **42**:855-858.

14) Komal, J. P. S and K. R. Mittal. 1990. Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* of serotypes 1 through 12 on the basis of their virulence in mice. Vet. Microbiol. **25**:229-240.

15) Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London). **227**: 680-685

- 16) **Mittal, K. R. and I. R. Tizard.** 1979. Growth agglutination and growth inhibition tests in the diagnosis of brucellosis. *J. Hyg. Camb.* 1-10
- 17) **Mittal, K. R., R. Higgins, and S. Larivière.** 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **15**:1019-1023.
- 18) **Mittal, K. R., R. Higgins, and S. Larivière.** 1983a. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 1351-1354
- 19) **Mittal, K. R., R. Higgins, and S. Larivière.** 1983b. Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect haemagglutination test. *J. Clin. Microbiol.* **17**:787-790.
- 20) **Mittal, K. R., R. Higgins, and S. Larivière.** 1987. An evaluation of agglutination and coagglutination techniques for serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates. *Am. J. Vet. Res.* **48**: 219-226.
- 21) **Mittal, K. R., R. Higgins, and S. Larivière.** 1988a. Some serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 through 5. *Curr. Microbiol.* **17**:305-313.
- 22) **Mittal, K. R., R. Higgins and S. Larivière.** 1988b. Serologic studies of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains of serotype-3 and their antigenic relationships with other *A. pleuropneumoniae* serotypes in swine. *Am. J. Vet. Res.* **49**: 152-155.
- 23) **Mittal, K. R.** 1990. Cross-reactions between *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains serotypes 1 and 9. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 535-539.

24) Mittal, K. R., R. Higgins, S. Larivière, and M. Nadeau. 1992. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.* **32**: 135-148

25) Mittal, K. R. and Bourdon, S. 1991. Cross-reactivity and antigenic heterogeneity among *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 4 and 7. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1344-1347.

26) Mittal, K. R., S. Bourdon, and M. Berrouad. 1993. Evaluation of counterimmunoelectrophoresis for serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates and detection of type-specific antigens in lungs of infected pigs. *J. Clin. Microbiol.* **31** : 2339-2342.

27) Mittal, K. R., S. Bourdon, and R. Higgins. 1998. Évolution de la distribution des différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* provenant de porcs malades au Québec. *Med. Vet. Qué.* **28**: 21-22.

28) Nicolet, J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, In *Diseases of Swine*, 7th., pp.401-408. Edited by A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire et D. J. Taylor. Ames, I. A: Iowa State University Press.

29) Nielsen, R., and O'Connor, P.J. 1984. serological characterization of 8 *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 8. *Acta Vet. Scand.* **25**:96-106.

30) Nielsen, R. 1986a. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype : serotype 12. *Acta. Vet. Scand.* **27**: 453-455.

- 31) Nielsen, R.** 1986b. Serology of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtypes A and B. Act. Vet. Scand. 27: 49-58
- 32) Nielsen, R., L. O. Andersen, and T. Plambeck.** 1996. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1 strains antigenically related to both serotypes 2 and 7. Acta Vet. Scand. 37: 327-336.
- 33) Perry, M. B., E. Altman, J. R. Brisson, L. M. Beynon, and J. C. Richards.** 1990. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. Serodiagn. Immuno. Infect. Dis. 4: 299-308.
- 34) Pohl, S., H. U. Bertschinger, W. Frederiksen and W. Mannheim.** 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae* comd. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 510-514.
- 35) Rika, A. V. Jolie, M. H. Mulks and B. J. Thacker.** 1994. Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Vet. Microbiol. 38 :329-349.
- 36) Roger, R.J, Eaves, L.E, Blackall, P.J, and Truman,K.F.** 1990. The comparative pathogenicity of four serovars of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Aust. Vet. J. 67: 9-12.
- 37) Rosendal, S., D.A. Boyd, and K.A. Gilbride.** 1985. Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria. Can. J. Comp. Med. 49: 68-74.

38) Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354

39) Tsai, C. M; and C. E. Frasch. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 119: 115-119.

Table 1. Serological reactivity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* reference and field strains of serotype 7 representing various groups using rabbit hyperimmune sera against all the known 12 serotypes of *A. pleuropneumoniae*.

of serotype 7	Tests used	Rabbit hyperimmune sera against reference strains of serotypes												NRS Control	
		1A	1B	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
98-7773A	COA	-	3+	-	-	-	-	-	4+	-	-	-	-	-	-
	ID	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	IHA	0	0	0	0	0	0	0	800	0	0	0	0	0	-
	CIE	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	RDE	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	SSA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	GA*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WF83	COA	-	2+	-	-	-	-	-	4+	-	-	-	-	-	-
	ID	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	IHA	0	0	0	0	0	0	0	1600	0	0	0	0	0	-
	CIE	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	RDE	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	SSA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	GA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
98-1102	COA	2+	2+	-	-	2+	-	-	3+	-	-	-	-	-	-
	ID	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	IHA	0	0	0	0	0	0	0	400	0	0	0	0	0	-
	CIE	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	RDE	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	SSA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	GA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
96-2462	COA	-	3+	-	-	3+	-	-	4+	-	-	-	-	-	-
	ID	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	IHA	0	0	0	0	0	0	0	400	0	0	0	0	0	-
	CIE	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	RDE	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	SSA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	GA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
97-2629	COA	-	2+	-	-	2+	-	-	4+	-	-	3+	-	-	-
	ID	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	IHA	0	0	0	0	0	0	0	400	0	0	0	0	0	-
	CIE	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	RDE	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	SSA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	GA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

90-3182	COA	3+	-	-	-	-	-	-	3+	-	+	-	3+	-	-
	ID	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	IHA	800	0	0	0	0	0	0	800	0	200	0	100	0	-
	CIE	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	RDE	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	SSA	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	GA	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

3+ and 4+ indicate the intensity of the reaction in the COA test, + indicates positive reaction in the ID, CIE, SSA and GA tests.

- indicate negative reaction.

control) = Normal rabbit serum control.

agglutinating strain in GA test

Table 2. Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 field strains based on their cross-reactivities with other serotypes in the immunodiffusion test

<i>Group</i>	<i>Rabbit hyperimmune sera against reference strains of serotypes</i>							<i>No of strains</i>	<i>%</i>
	<i>1A</i>	<i>1B</i>	<i>4</i>	<i>7</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>		
Group I	-	-	-	+	-	-	-	21	17
Group II	-	+	-	+	-	-	-	69	56
Group III	-	-	+	+	-	-	-	15	13
Group IV	-	+	+	+	-	-	-	6	5
Group V	-	-	-	+	-	+	-	8	7
Group VI	+	-	-	+	+	-	+	3	2

Table 3. Effect of absorption of rabbit hyperimmune sera against reference and field strains of *A. pleuropneumoniae* serotype 7 with homologous and heterologous strains of serotype 7 as detected by immunodiffusion test

<i>strain</i>	<i>Anti-WF83 absorbed with</i>			<i>Anti- 86-1411 absorbed with</i>		
	<i>Nil</i>	<i>WF83</i>	<i>86-1411</i>	<i>Nil</i>	<i>WF83</i>	<i>86-1411</i>
WF83	+	-	+	+	-	-
86-1411	+	-	-	+	+	-

Table 4. Results of the immunodiffusion test using purified capsular antigen and rabbit hyperimmune sera against reference and two selected field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7.

<i>Rabbit antisera against strains</i>	<i>Capsular antigen of strain</i>		
	<i>WF83</i>	<i>90-3182</i>	<i>86-1411</i>
WF83	— +	— +	-
90-3182	— +	— +	-
86-1411	+	-	+

— = identical precipitation line

- = Negative

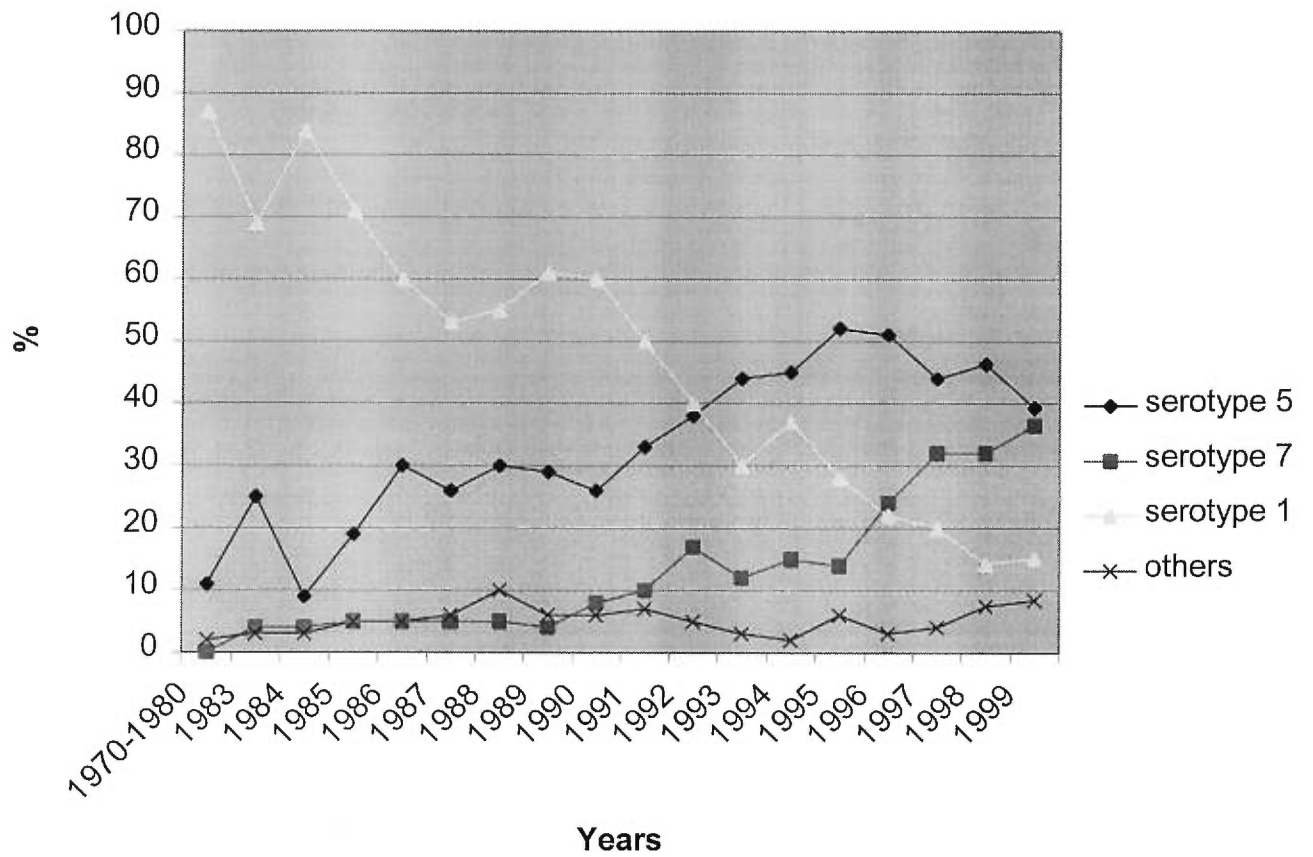


Figure 3 . Distribution of different serotypes of *A. pleuropneumoniae* isolated from lung lesions of acute porcine pleuropneumonia in Québec.

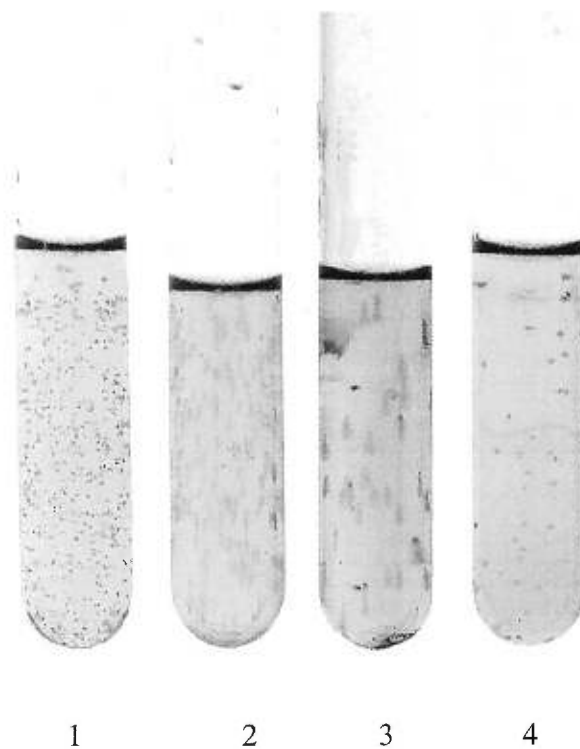


Figure 4: Representing results of serum soft agar test.

Tube 1 Agar containing non capsulated strain 101 of *Escherichia coli* and normal rabbit Serum showing compact colonies.

Tube 2 Agar containing capsulated reference strain 4074 of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 and normal rabbit serum showing diffuse (mucoid) colonies.

Tube 3 Agar containing capsulated reference strain WF83 of *A. pleuropneumoniae* serotype 7 and normal rabbit serum showing diffuse (mucoid) colonies.

Tube 4 Agar containing capsulated reference strain WF83 of *A. pleuropneumoniae* serotype 7 and rabbit hyperimmune serum against WF83 of *A. pleuropneumoniae*. Showing compact colonies.

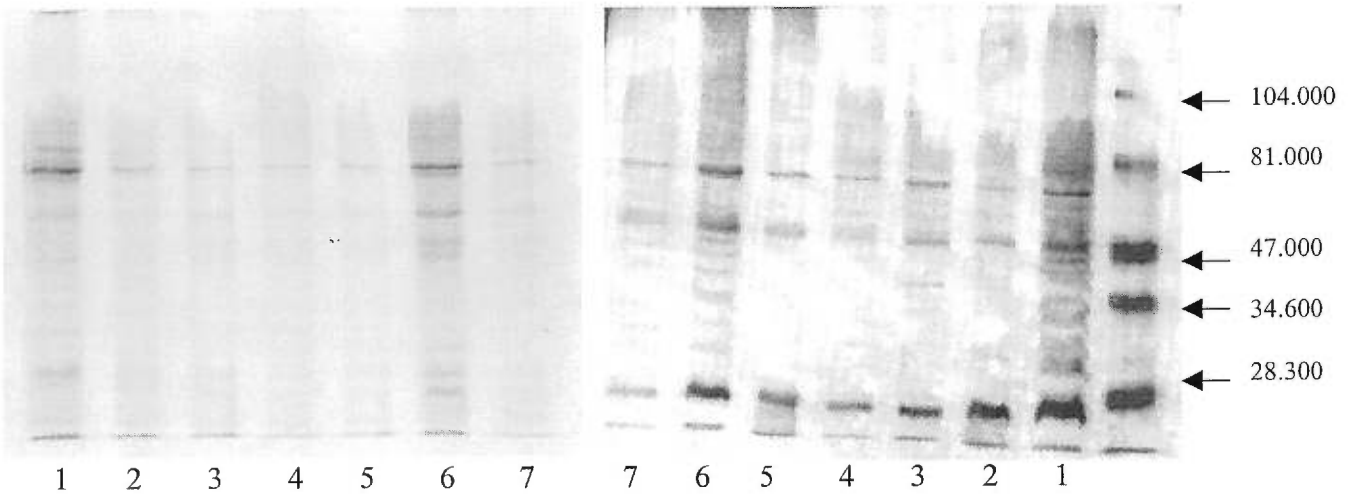


Figure 5. SDS-PAGE and Western blot analysis of whole-cell preparations of reference and field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 probed with rabbit hyperimmune serum against serotype 7 reference strain.

WF83 (lane 1), 90-3182 (lane 2), 86-1411 (lane 3), 98-c827 (lane 4), 97-A714 (lane 5), 95-4590 (lane 6), 97-1061 (lane 7)

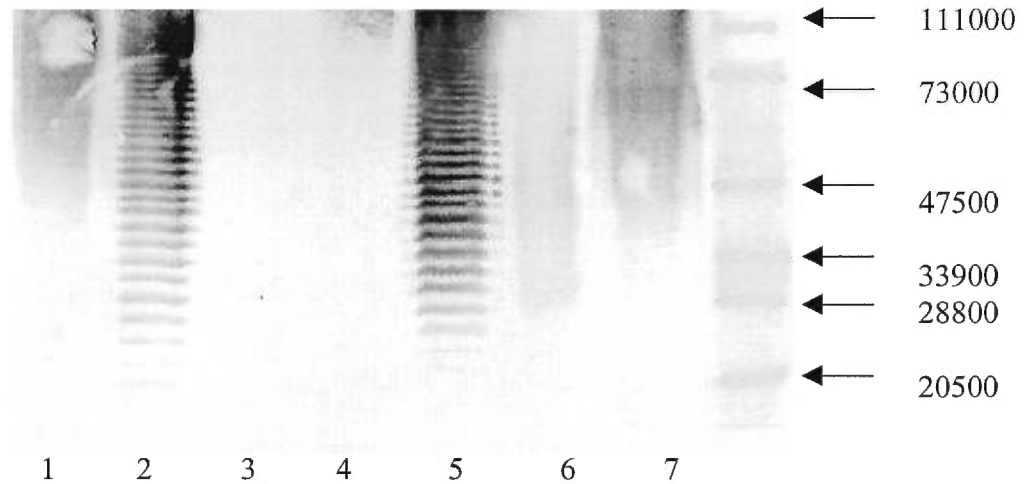


Figure 6. Western blot analysis of proteinase-K- treated whole-cell preparations of *Actinobacillus pleuropneumoniae* probed with rabbit hyperimmune serum against serotype 7 reference strain, WF83.

90-3182 (7) (lane 1), WF83 (7) (lane 2), M62 (4) (lane 3), SHY85-77 (1) (lane 4), 86-1411(7) (lane 5), ISU158 (1B) (lane 6), 4074 (1A) (lane 7).

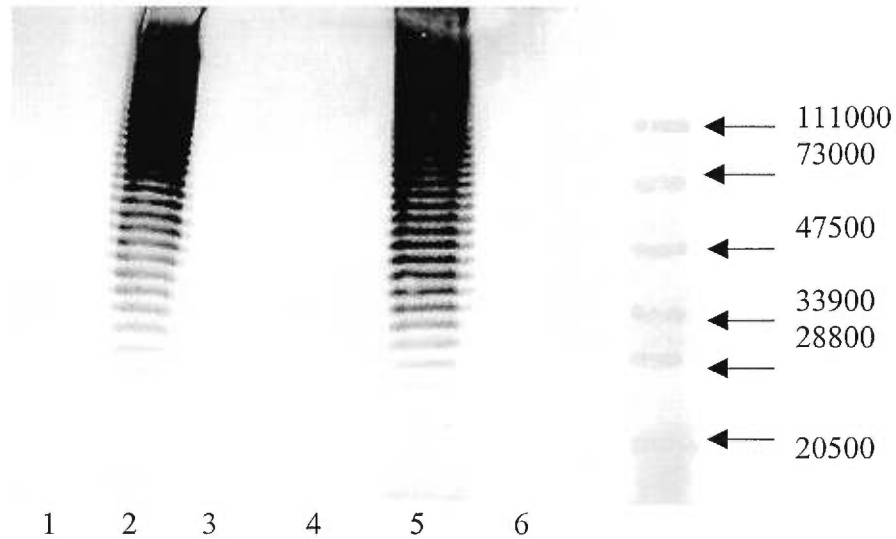


Figure 7. Western blot analysis of proteinase-K- treated whole-cell preparations of *Actinobacillus pleuropneumoniae* probed with rabbit hyperimmune serum against serotype 7 field strain 86-1411.

90-3182 (7) (lane 1), WF83 (7) (lane 2), M62 (4) (lane 3), SHY85-77 (1) (lane 4), 86-1411(7) (lane 5), ISU158 (1B) (lane 6), 4074 (1A) (lane 7).

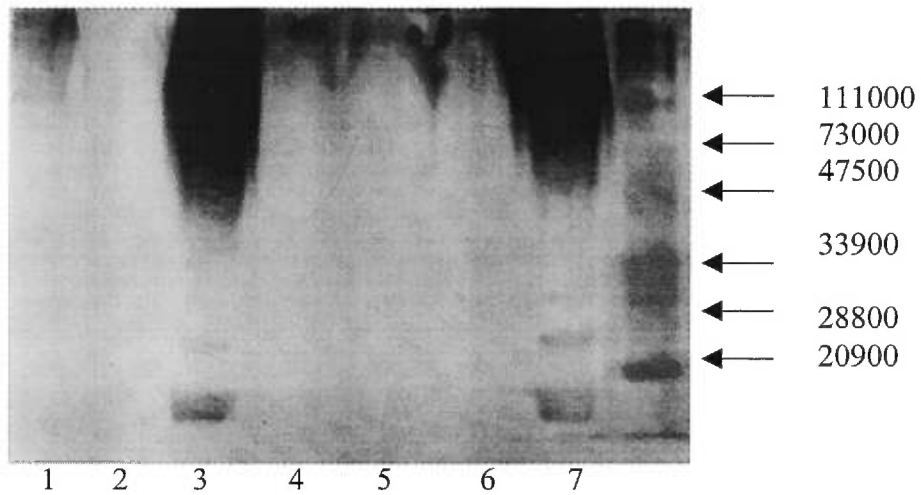


Figure 8. Western blot analysis of proteinase-K- treated whole-cell preparations of *Actinobacillus pleuropneumoniae* probed with rabbit hyperimmune serum against serotype 7 field strain 90-3182

SHY85-77 (1) (lane 1), 86-1411 (7) (lane 2), 90-3182 (7) (lane 3), WF83 (7) (lane 4), M62 (4) (lane 5), ISU158 (1B) (lane 6), 4074 (1A) (lane 7).

IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Plus de 5000 souches d'*A. pleuropneumoniae* isolées à partir de lésions pulmonaires des porcs morts d'une pleuropneumonie aiguë, des amygdales ou cavités nasales d'animaux provenant de troupeaux infectés chroniquement ont été sérotypées au Québec au cours des dernières années. Mittal *et al.* (1998) ont publié une étude statistique, montrant que les sérotypes 5 et 7 sont les plus dominant avec 39.25 et 36.4 %, respectivement.

La sérotypie d'*A. pleuropneumoniae* est basée sur l'identification et la caractérisation de l'antigène spécifique de sérotype. Toutefois, l'existence de plusieurs antigènes communs, partagés par différents sérotypes, explique les réactions croisées. De fortes réactions croisées entre le sérotype 7 et les autres sérotypes ont été rapportées par Mittal et Bourdon (1991) et Gottschalk *et al.* (1998). Une identification précise du sérotype 7 est d'une importance capitale, surtout après l'observation de la réaction croisée entre les souches des sérotypes 7 et 1 (Mittal et Bourdon, 1991; Gottschalk *et al.*, 1999). De telles réactions peuvent créer des problèmes au niveau de la sérotypie et du sérodiagnostic.

Le sérotype 7 est généralement considéré moins virulent que les sérotypes 1 et 5 (Frey et Nicolet, 1990). Roger *et al.* (1990) rapportent l'existence de 2 isolats australiens du sérotype 7 qui sont moins virulents que le sérotype 1, mais qui ont une virulence similaire à celles des sérotypes 2 et 3. Plusieurs études ont rapporté l'existence d'une variation de la virulence au sein d'un même sérotype (Bertram, 1985; Brandreth et Smith, 1987; Komal et Mittal, 1990). Quant à Rosendal *et al.* (1985), ils concluent de leurs expériences qu'il y a peu de différence de virulence entre les sérotypes 1, 2 et 7.

Nielsen *et al.* (1996) démontrent par les tests d'agglutination avec des billes de latex et IHA la présence d'un épitope polysaccharidique capsulaire identique entre la souche de référence du sérotype 2 (S1536) et la souche 7317 qui représente 9 isolats du sérotype 2, alors que le test ID montre une relation antigénique avec la

souche de référence du sérotype 7 (WF83). L'analyse des LPS par SDS-PAGE et Immunobuvardage des souches S1536, WF83 et 7317 indique l'existence d'un LPS lisse identique entre la souche 7317 et WF83 d'où la souche 7317 a été désignée K2:O7. Gottschalk *et al.* (1999) ont étudié 3 isolats atypiques (1B, 27E et 26B) en se basant sur les réactions croisées dans les tests ID, COA et IHA. Les isolats 1B et 27E présentent une réaction croisée avec l'antisérum contre les sérotypes 1 et 7, mais 26B donne une réaction croisée avec l'antisérum contre les sérotypes 1, 7 et 4. En utilisant les anticorps monoclonaux (AcMo) dans le test dot-ELISA, les isolats 1B et 27E sont reconnue par deux AcMo différents spécifiques au sérotype 1 (dirigés contre un épitope de la capsule) ainsi que par celui du sérotype 7 et l'AcMo spécifique au sérotype 4/7 (dirigé contre un épitope de la chaîne O du LPS). L'isolat 26B réagit avec l'AcMo produit contre la capsule spécifique du sérotype 1 et avec l'AcMo produit contre la chaîne O du LPS spécifique au sérotype 4/7. Aucun des isolats ne réagit avec la chaîne O du LPS spécifique au sérotype 1. Ces résultats ont été confirmés par le test d'inhibition d'ELISA d'où la désignation des isolats comme suit: souche 1B et 27E étant K1:O7 et la souche 26B étant K1:O7/4.

Le tableau I montre l'existence de plusieurs antigènes communs partagés par les souches de champ du sérotype 7 et les autres sérotypes. En se basant sur ces réactions croisées, nous avons pu diviser les souches du sérotype 7 en 6 groupes. Ces résultats concordent exactement avec ceux rapportés par Mittal et Bourdon (1991). Toutefois, le tableau II montre le pourcentage de chacun de ces groupes. On remarque que plus de la moitié (56 %) des souches de champ réagissent avec l'antisérum produit contre la souche de référence 1B (ISU158), mais ne montrent aucune réaction croisée avec celui produit contre 1A (4074 et ATCC 2708). Ces résultats démontrent qu'une sérologie du sérotype 7 peut amener à une confusion, car un porc infecté par le sérotype 1 (incluant ceux du sérotype 1B) peut donner de faux résultats pour le sérotype 7. La majorité des souches de champ (98%) ne donnent aucune réaction croisée dans tous les tests sérologiques avec la souche de

référence 1A (4074 et ATCC 2708) (tableau II). En se basant sur cette dernière observation et pour éviter toute confusion entre les sérotypes 1 et 7 on recommande l'utilisation de l'antisérum contre la souche de référence 1A (4074 et ATCC 27088). En ce qui concerne les tests utilisés jusqu'à maintenant, les tests d'IHA et CIE sont reconnus pour leurs capacités de détecter l'antigène spécifique au sérotype, en éliminant la majorité des réactions croisées (Gutierrez *et al.*, 1991; Mittal *et al.*, 1993).

A partir des résultats obtenus, nous avons choisi 2 souches qui paraissaient différentes: la première souche, 86-1411, donne une identité partielle avec l'antisérum produit contre la souche de référence, et la deuxième souche (90-3182) réagit de la même façon avec l'antisérum produit contre les deux souches de référence des sérotypes 7 et 1. La souche 86-1411 réagit fortement avec l'antisérum produit contre la souche de référence du sérotype 7 (WF83) dans les tests SSA et GA, mais ne montre aucune réaction avec les autres sérotypes. Cependant, la souche 90-3182 donne une réaction identique avec l'antisérum produit contre les deux souches de référence 1(1A et 1B) et 7 et de la même façon l'antisérum produit contre la souche 90-3182 réagit avec les deux souches de référence 1 et 7. Cette souche a été choisie car elle donne une réaction croisée dans les deux sens dans tous les tests sérologiques.

Le test de GA a été utilisé pour la caractérisation de l'antigène capsulaire pour les souches non autoagglutinantes, alors que le test SSA a été utilisé pour caractériser aussi bien les souches agglutinantes que non autoagglutinantes et pour différencier les souches selon l'antigène de surface.

Les résultats du Tableau III, montrent que les deux antigènes (86-1411 et WF83) ne sont pas capables d'absorber complètement l'antisérum produit contre l'homologues et l'hétérologues. Ce qui indique que les deux souches ne sont pas complètement identiques. L'utilisation de l'antigène capsulaire purifié dans le test

ID, a permis de voir que la capsule est impliquée dans cette réaction (Tableau IV). Perry *et al.* (1990) étudient les détails de la structure des composantes des polysaccharidiques capsulaires et des lipopolysaccharides de différents sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* et rapportent que l'antigène O du LPS est souvent associé avec l'antigène spécifique au polysaccharide capsulaire.

La caractérisation de l'OMP des souches de champ du sérotype 7 en SDS-PAGE et immunobuvardage révèle qu'il n'y a pas de différence significative avec la souche de référence (Figure 5). L'utilisation de l'immunobuvardage avec l'anti-WF83 montre clairement que 86-1411 et WF83 possèdent le même profil antigénique, alors que la souche 90-3182 montre une réaction croisée due à la capsule (Figure 6). En utilisant l'anti-86-1411, les mêmes réactions ont été observées avec les souches 86-1411 et WF83, alors que pour la souche 90-3182 aucune réaction croisée apparente n'a été notée (Figure 7). La figure 8 montre clairement que la souche 90-3182 possède exactement le même profil antigénique que la souche 1A et non celle du sérotype 7. Afin de vérifier ces résultats, un antisérum contre la souche de référence 1A a été utilisé et les mêmes résultats ont été obtenus.

Jacques *et al.* (1996) suggèrent la présence de deux types de noyau oligosaccharidique parmi les sérotypes d'APP, en séparant les lipopolysaccharides (LPS) par Tricine SDS-PAGE, ce qui a pour effet d'augmenter la résolution des bandes de faible poids moléculaire. Les douze sérotypes d'APP ont été divisés en deux groupes selon la mobilité du lipide A du LPS. Les sérotypes 1, 6, 9 et 11 possèdent un noyau de type I, alors que les sérotypes 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10 et 12 possèdent un noyau de type II.

La souche 90-3182 possède le même type du noyau que la souche du sérotype 1 (noyau type I) alors que la souche 86-1411 possède le même noyau que la souche du sérotype 7 (noyau type II).

L'existence des réactions croisées, que ce soit dans un sens ou dans les deux sens entre les sérotypes 4 et 7 ou les entre sérotypes 7 et 1, 9, 10 et 11 peut affecter la fiabilité des résultats du sérotypage et du sérodiagnostic. Dans la majorité des cas il n'est pas difficile d'identifier l'antigène spécifique au sérotype à cause de sa forte réaction antigénique comparée à celle d'une réaction croisée due à un antigène commun qui est de nature mineure. Cependant, dans le cas d'une forte réaction croisée, la combinaison de deux ou de plusieurs tests sérologiques est nécessaire pour identifier l'antigène spécifique au sérotype.

Dans la présente étude les tests GA et SSA ont été utilisés pour la première fois pour le sérotypage. Ce sont des tests simples, faciles et qui ont démontré leur fiabilité et leur efficacité pour la détection de l'antigène spécifique situé à la surface. Cette fiabilité est attribuée à l'utilisation de la bactérie vivante augmentant ainsi la spécificité de l'interaction de la surface antigénique et l'anticorps correspondant.

Il a également été démontré que l'épreuve d'immunobuvardage peut être utile.

V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beudet, R., G. McSween, G. Boulay, P. Rousseau, J. G. Bisailon, J. P. Descôteaux, and R. Ruppanner.** 1994. Protection of mice and swine against infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* by vaccination. *Vet. Microbiol.* **39**: 71-81.
- Bélanger, M., D. Dubreuil, J. Harel, C. Girard, and M. Jacques.** 1990. Role of lipopolysaccharides in adherence to *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect. Immun.* **58**: 3523-3530.
- Bertram, T. A.** 1985. Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.* **22**: 598-609.
- Bertram, T. A.** 1990. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Molecular aspects of virulence and pulmonary injury. *Can. J. Vet. Res.* **54**: S53-S56.
- Bossé, J. T., R. P. Johnson and S. Rosendal.** 1990. Serodiagnosis of pleuropneumonia using enzyme-Linked immunosorbent assay with capsular polysaccharide of serotypes 1, 2, 5 and 7. *Can. J. Vet. Res.* **54**: 427-431.
- Brandreth, S. R., and I. M. Smith.** 1985. Prevalence of big herds affected by pleuropneumonia associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* in eastern England. *Vet. Rec.* **117**: 143-147.
- Brandreth, S. R., and I. M. Smith.** 1987. Comparative virulence of some English strains of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 2 and 3 in the pig. *Res. Vet. Sci.* **42**: 187-193.
- Byrd, W., and S. Kadis.** 1992. Preparation, characterization, and immunogenicity of conjugate vaccines directed against *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence determinants. *Infect. Immun.* **60**: 3042-3051.

Caruso, J. P., and R. F. Ross. 1990. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *Am. J. Vet. Res.* **51**: 227-231

Deneer, H. G, and A. A. Potter. 1989a. Effect of iron restriction on the outer membrane protein of *Actinobacillus (Hamophilus) pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**: 798-804.

Deneer, H. G, and A. A. Potter. 1989b. Identification of a maltose-inducible major outer membrane protein in *Actinobacillus (Hamophilus) pleuropneumoniae*. *Microbiol. Pathogen.* **6**: 425-432.

Desrosiers, R., K. R. Mittal., and R. Malo. 1984. Porcine pleuropneumonia associated with serotype 3 in Quebec. *Vet. Rec.* **115**: 628-629

Dom, P., F. Haesebrouck., R. Ducatelle, and G. Charlier. 1994. *In vivo* association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. *Infect. Immun.* **62**: 1262-1267.

Fedorka-Cray, P. J., L. Hoffman., W. C. J. Cray., J. T. Gray., S. Breish, and G. A. Anderson. 1993. *Actinobacillus (Hamophilus) pleuropneumoniae*. Part I. History, Epidemiology, Serotyping, and Treatment. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.* **15**: 1447-1455.

Fenwick, B. W. 1990. Virulence attributes of the lipopolysaccharides of the HAP group of organisms. *Can. J. Vet. Res.* **54**:S28-S32.

Fenwick, B. W. and B. I. Osburn. 1986. Vaccine potential of *Haemophilus pleuropneumoniae* oligosaccharide-tetanus toxoid conjugates. *Infect. Immun.* **54**: 583-586.

Fodor, L., J. Varga, E. Molnar, and I. Hajtos, 1989. Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine. *Vet. Microbiol.* **20**: 173-180.

Frey, J., and J. Nicolet. 1990. Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 232-236.

Frey, J., J. T. Bosse, Y. -F. Chang, J. M. Cullen, B. Fenwick, G. F. Gerlach, D. Gygi, F. Haesebrouck, T. J. Inzana, R. Jansen, E. M. Kamp, J. Macdonald, J. I. MacInnes, K. R. Mittal, J. Nicolet, A. Rycroft, R. P. A. M. Sergers, M. A. Smits, E. Stenbaek, D. K. Struck, J. F. van den Bosch, P. J. Willson, and R. Young. 1993. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *J. Gen. Genet.* **139**: 1723-1728.

Frey, J. 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends. Microbiol.* **3**: 257-261.

Frey, J., R. Kun, J. MacInnes, and J. Nilet. 1997. Characterization of a novel RTX determinant in *Actinobacillus pleuropneumoniae* which is not expressed under culture conditions. Eighth European Workshop Conference on Bacterial Protein Toxin. Kloster Banz, Staffelstein, Allemagne.

Gerlach, G-F., S. Klashinsky, C. Anderson, A. A. Potter, and P. J. Willson. 1992a. Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Infect. Immun.* **60**: 3253-3261.

Gerlach, G-F., Anderson, A. Rossi-Campos, and A. A. Potter. 1992b. The role of the 102Kd *Actinobacillus pleuropneumoniae* cytolysin in virulence and the

association of the encoding gene with insertion sequence-like elements. Abstr. 199, pg. 199. Proc. Int Pig. Vet. Soc. The Hague, The Netherlands.

Gilbride, K. A., and S. Rosendal. 1983. Evaluation of a selective medium for isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae*. Can. J. Comp. Med. **47**: 445-450.

Gilbride, K. A., and S. Rosendal. 1984. Antimicrobial susceptibility of 51 strains of *Haemophilus pleuropneumoniae*. Can. J. Comp. Med. **48**: 47-50.

Gonzalez, G. C., D. L. Caamano, and A. B. Schryvers. 1990. Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Mol. Microbiol. **4**: 1173-1179.

Gottschalk, M., A. Lebrun, S. Lacouture, D. Côté and K. R. Mittal. 1998. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 7 and 4 using monoclonal antibodies: demonstration of common LPS O-chain epitopes with *Actinobacillus lignieresii*. Vet. Microbiol. **65**: 271-182.

Gottschalk, M., A. Lebrun, S. Lacouture, D. Côté; J. Harel, J. Forget and K. R. Mittal. 1999. Atypical *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates which share antigenic determinants with both serotypes 1 and 7. Vet. Microbiol. Invest: 2000 (In press).

Gutierrez, C. B; R. I. Tascon; J. A. Vazquez and E. F Rodriguez Ferri. 1991. Cross-reactivity between *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes comparing different antigens and serological tests. Res. Vet. Sci. **50**: 308-310.

Häni, H., H. König., J. Nicolet, and E. Scholl. 1973. Zur *Haemophilus pleuropneumoniae* beim Schwein. V. Pathomorphologie. Schweiz. Arch. Tierheilkd. **115**: 191-203.

Higgins, R., S. Larivière, K. R. Mittal, R. Desrosiers, A. Désilets, C. Bédard-Royal, R. Clermont, R. Éthier et J. Simard. 1982. La pleuropneumonie porcine au Québec. I. La pleuropneumonie porcine à *Haemophilus pleuropneumoniae*. Méd. Vét. Québec. **12**: 36-39.

Inzana, T. J. 1991. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiol. Pathogen. **11**: 305-316.

Inzana, T. J. and B. Mathison. 1987. Type-specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. Infect. Immun. **55**: 1580-1587.

Inzana, T. J., J. Ma, T. Workman, R. P. Gogolewski, and P. Anderson. 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. Infect. Immun. **56**: 1880-1889.

Inzana, T. J., J. Todd, J. Ma, and H. Veit. 1991. Characterization of a non-hemolytic mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: role of the 110 Kilodalton hemolysin in virulence and immunoprotection. Microbiol. Pathogen. **10**: 281-296.

Jacques, M., B. Foiry, R. Higgins et K. R. Mittal. 1988. Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Bacteriol. **170**: 3314-3318.

Jacques, M., S. Rioux, Paradis, S. É, Bégin, C and Gottschalk, M. 1996. Identification of two core types in lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* representing serotypes 1 to 12. Can. J. Microbiol. **42**: 855-858.

Jensen, A. E., and T. A. Bertram. 1986. Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **51**: 419-424.

Kamp, E. M., J. K. Popma, and L. A. M. G. Van Leengoed. 1987. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in the Netherlands: With emphasis on heterogeneity within serotype 2 and (proposed) serotype 9. *Vet. Microbiol.* **13**: 249-257.

Kamp, E. M., J. K. Popma, J. Anakotta, and M. A. Smits. 1991. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **59**:3079-3085.

Kilian, M. 1976. The hemolytic activity of *Haemophilus* species. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* **84**: 339-341.

Kilian, M., J. Nicolet, and E. L. Biberstein. 1978. Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (Matthews and Pattison 1961) Shope 1964 and proposal of a neotype strain. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**: 20-26.

Kiorpes, A. L., P. S. MacWilliams., D. I. Schenkman., and L. R. Backström. 1990. Blood gas and hematological changes in experimental peracute porcine pleuropneumonia. *Can. J. Vet. Res.* **54**: 164-169.

Komal, J. P. S and Mittal, K. R. 1990. Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* of serotypes 1 through 12 on the basis of their virulence in mice. *Vet. Microbiol.* **25**: 229-240.

Kume, K., T. Nakai., and A. Sawata. 1984. Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from nasal cavities of healthy pigs. Jpn. J. Vet. Sci. **46**: 641-647.

Little, T. W. A., and J. D. J. Harding. 1971. The comparative pathogenicity of two porcine *Haemophilus* species. Vet. Rec. **88**: 540-545.

MacInnes, J. I. and S. Rosendal. 1987. Analysis of major antigens of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* and related organisms. Infect. Immun. **55**: 1626-1634.

Matthews, P. R. J., and I. H. Pattison. 1961. The identification of a *Haemophilus*-like organism associated with pneumonia and pleurisy in the pig. J. Comp. Pathol. **71**: 44 -52.

Mittal, K. R., R. Higgins, and S. Larivière. 1983. Identification of type-specific antigens in the lungs of *Haemophilus pleuropneumoniae*-infected pigs by coagglutination test. J. Clin. Microbiol. **18**: 1355-1357.

Mittal, R. K., R. Higgins et S. Larivière . 1987. An evaluation of agglutination and coagglutination techniques for serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates. Am. J. Vet. Res. **48**: 219-226.

Mittal, R. K., R. Higgins et S. Larivière .1988. Serologic studies of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains of serotype-3 and their antigenic relationships with other *A pleuropneumoniae* serotypes in swine. Am. J. Vet. Res. **49**: 152-155.

Mittal, R. K et S. Bourdon .1991. Cross-reactivity and antigenic heterogeneity among *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 4 and 7. J. Clin. Microbiol. **29**: 1344-1347.

Mittal, K. R., S. Bourdon, and M. Berrouad. 1993. Evaluation of counterimmunoelectrophoresis for serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates and detection of type-specific antigens in lungs of infected pigs. J. Clin. Microbiol. **31**: 2339-2342.

Mittal, K. R., Higgins, R, and S. Bourdon. 1998. Évolution de la distribution des différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* provenant de porcs malades au Québec. Med. Vet. Qué. **28**: 21-22.

Nicolet, J., and H. König. 1966. Zur *Haemophilus pleuropneumonie* beim schwein. bakteriologische, pathologisch-anatomische und histologische befunde. Pathol. Microbiol. **29**: 301-306.

Nicolet, J. 1968. Sur l'hémophilose du porc. I. Identification d'un agent fréquent: *Haemophilus parahaemolyticus*. Pathol. Microbiol. **31**: 215- 225.

Nicolet, J., H. König., and D. Schifferli. 1969. Zur *Haemophilus pleuropneumoniae* beim schwein. II. eine ontagiöse krankheit von wirtschaftlicher bedeutung. schweiz. Arch. Tierheilkd. **11**: 166-174.

Nicolet, J., P. A. DeMeuron and P. H. Bachman. 1971. Sur l'hémophilose du porc. IV L'épreuve de déviation du complément. Un test de dépistage des infections à *Haemophilus parahaemolyticus*. Schweiz. Arch. Tierheilkd. **113**: 191-200

Nicolet, J., P. Paroz, M. Krawinkler et A. Baumgaetner. 1981. An enzyme-linked immunosorbent assay, using EDTA-extracted antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. Am. J. Vet. Res. **42**:2139-2142.

Nicolet, J., and D. Schifferli. 1982. *In vitro* susceptibility of *Haemophilus pleuropneumoniae* to antimicrobial substances. Proc 7th. Int Congr Pig Vet Soc. Mexico City. P. 71

Nicolet, J. 1985. *Haemophilus pleuropneumoniae* bacteriologie and epidemiology. In: R.A. Schultz (Editor). Compendium on swine *Haemophilus pleuropneumoniae*. Sigler printing. pp 7-11.

Nicolet, J. 1988. Taxonomy and serological identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can. Vet. J. **29**: 578-580.

Nicolet, J. 1990. Overview of the virulence attributes of the HAP group of bacteria. Can. J. Vet. Res. **54**: S12-S15.

Nicolet, J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, In Diseases of Swine, 7th., pp.401-408. Edited by A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengening, S. D'Allaire et D. J. Taylor. Ames, I. A: Iowa State University Press.

Nielsen, R. 1982. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. Thesis. Copenhagen, Denmark. 129pp.

Nielsen, R., and P. J. O'Connor . 1984. Serological characterization of 8 *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype : serotype 8. Acta Vet. Scand. **25**: 96-106.

Nielsen, R. 1985a. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype : serotype 9. Acta Vet. Scand. **26** : 501-512.

Nielsen, R. 1985b. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype : serotype 10. Acta Vet. Scand. **26** :581-585.

Nielsen, R. 1986a. Serology of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtypes A and B. Acta Vet. Scand. **27**: 49-58.

Nielsen, R. 1986b. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype : serotype 12. Act. Vet. Scand. **27** : 453-455.

Nielsen, R. 1988. Seroepidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can. Vet. J. **29**: 580-582.

Nielsen, R., L. Andersen and T. Planbeck. 1996. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype I strains antigenically related to both serotypes 2 and 7. Act. Vet. Scand. **37**: 327-336.

Niven, D. F and M. Lévesque. 1988. V-factor dependant growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 (Bertschinger 2008). Int. J. Syst. Bacteriol. **38**: 319-320

Niven, D. F., J. Donga, and F. S. Archibald. 1989. Response of *Haemophilus pleuropneumoniae* to iron restriction changes in the outer membrane protein profile and the removal of iron from porcine transferrin. Mol. Microbiol. **3**: 1083-1089.

Olander, H. J. 1963. A septicaemic disease of swine and its causative agent *Haemophilus parahaemolyticus*. Ph.D. diss., Univ. California.

Pattison, I. H.; D. G. Howll, and J. Elliot. 1957. A *Haemophilus*-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *J. Comp. Pathol.* **67**: 320-329.

Perry, M. B., E. Altman, J-R. Brisson, L. M. Beynon, and J. C. Richards. 1990. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Serodiagnosis and Immunotherapy. Infect. Dis.* **4**: 299-308.

Pohl, S., H. U. Bertschinger, W. Frederiksen and W. Mannheim. 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comd. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *In. J. Syst. Bacteriol.* **33**: 510-514

Rapp, V. J., R. F. Ross, and T. F. Young. 1985. Characterization of *Haemophilus* spp. isolated from health swine and evaluation of cross-reactivity of complement-fixing antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Haemophilus* Taxon "Minor group". *J. Clin. Microbiol.* **22**: 945-950

Rapp, V. J, and R. F. Ross. 1986. Antibody response of swine to outer membrane components of *Haemophilus pleuropneumoniae* during infection. *Infect. Immun.* **54**: 751-760.

Rapp, V. J., R. S. Jr. Munson, and R. F. Ross. 1986. Outer membrane protein profiles of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **52**: 414-420.

Ricard, M. A., F. S. Archibald, and D. F. Niven. 1991. Isolation and identification of a putative transferrin receptor from *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1. J. Gen. Microbiol. 137:2733-2740.

Rika, A. V., Jolie, M. H., Mulks and B. J. Thacker. 1994. Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Vet. Microbiol. 38 :329-349.

Rodriguez-Barbosa, J. I., C. B. Gutierrez Martin, R. I. Tascon, O. R. Gonzalez, K. R. Mittal and E. F. Rodriguez Ferri. 1996. Characterization of monoclonal antibodies that recognize common epitopes located on O antigen of lipopolysaccharide of serotypes 1, 9 and 11 of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. FEMS Immun. Med. Microbiol. 16: 173-181.

Roger, R.J, Eaves, L.E, Blackall, P.J, and Truman, K.F. 1990. The comparative pathogenicity of four serovars of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Aust. Vet. J. 67: 9-12.

Rosendal, S., and D. A. Boyd. 1982. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. J. Clin. Microbiol. 16: 840-843.

Rosendal, S., D. A. Boyd., and K. A. Gilbrides. 1985. Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria. Can. J. Comp. Med. 49: 68-74.

Rosendal, S., J. Devenish, J. I. MacInnes, J. H. Lumsden, S. Watson, and H. Xun. 1988. Evaluation of heat-sensitive, neutrophil-toxic, and hemolytic activity of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. Am. J. Vet. Res. 49: 1053-1058.

Rycroft, A. N, and D. J. Taylor. 1987. Preparation and characterisation of envelope proteins from *Haemophilus pleuropneumoniae*. Vet. Microbiol. 15 : 303-314.

- Rycroft, A. N., and J. M. Cullen.** 1990. Complement resistance in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection of swine. *Am. J. Vet. Res.* **51**: 1449-1453.
- Schiefer, B., R. E. Moffatt, J. Greenfield, J. L. Agar and J. A. Majka.** 1974. Porcine *Haemophilus paraahaemolyticus* in Saskatchewan. I. Natural occurrence and findings. *Can. J. Comp. Med.* **38**: 99-104.
- Shope, R. E.** 1964. Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. *J. Exp. Med.* **119**: 357-368.
- Shope, R. E.; D. C. White, and G. Leidy.** 1964. Porcine contagious pleuropneumonia. II. Studies of the pathogenicity of the etiology and pathology. *J. Exp. Med.* **119**:369-375.
- Udeze, F. A., K. S. Latimer, and S. Kadis.** 1987. Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **48**: 768-773.
- Utrera, V. and C. Pijoan.** 1991. Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet. Rec.***128**: 357-358.
- Vallancourt, J. P., R. Higgins., G. P. Martineau., K. R. Mittal., and S. Larivière.** 1988. Change in the susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to antimicrobial agents in Quebec (1981-1986). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **193**: 470-473
- Van Leengoed, L. A. M. G., E. M. Kamp, and L. M. A. Pol.** 1989. Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* to porcine lung macrophages. *Vet. Microbiol.* **19**: 337-349.

Welch, R. A. 1991. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**: 521-528.

Welch, R. A. and S. Pellett. 1988. Transcriptional organization of the *Escherichia coli* hemolysin genes. *J. Bacteriol.* **170**: 1622-1630.