

Université de Montréal

**Étude de l'hétérogénéité antigénique
parmi les souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*
du sérotype 5**

Par

Joseph Nzamba

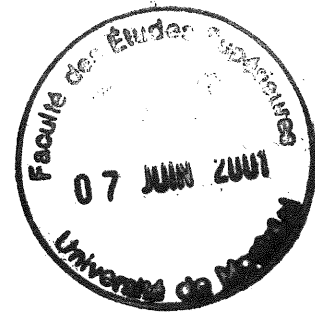
Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

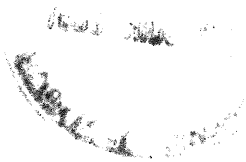
**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie**

Avril, 2001

© Joseph Nzamba, 2001



SF
607
N54
2001
N. 010



**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Ce mémoire intitulé :

**Étude de l'hétérogénéité antigénique
parmi les souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*
du sérotype 5**

Présenté par :

Joseph Nzamba

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Robert Higgins

Président-rapporteur

Dr K. R. Mittal

Directeur

Dr Serge Messier

Membre

Mémoire accepté le :.....

SOMMAIRE

L'industrie porcine représente une portion importante de l'économie canadienne. Cette industrie connaît des pertes économiques causées par la pleuropneumonie porcine, une maladie en constante évolution due à *A. pleuropneumoniae*, agent infectieux responsable d'une forte mortalité des porcs.

Le sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* est antigéniquement hétérogène et ses souches peuvent donc causer des problèmes de sérodiagnostic et de sérotypage. Ce sérotype appartient au groupe des sérotypes très virulents et occupe depuis 1993, la première place dans la prévalence des souches d'*A. pleuropneumoniae* isolées des porcs malades ou morts de pleuropneumonie aiguë au Québec.

La connaissance des relations antigéniques est nécessaire à l'établissement d'un diagnostic précis par le développement des tests fiables, à l'étude épidémiologique, ainsi qu'à la production des vaccins encore plus efficaces. Dans cette étude, nous avons donc examiné l'hétérogénéité antigénique parmi les souches de champ du sérotype 5 isolées au Québec.

Les tests sérologiques comprenant: la coagglutination (CoA), l'immunodiffusion (ID), la CoA quantitative, l'ID quantitative, la contre-immunoelectrophorèse (CIE), l'hémagglutination indirecte (IHA) et le "serum soft agar" (SSA) ont été retenus pour cette investigation.

Des réactions croisées avec d'autres sérotypes ont été observées en CoA avec la suspension bactérienne formolisée comme antigène. Cette réactivité croisée n'a pas été constatée en CIE, en ID et en IHA avec les antigènes solubles sous forme d'extraits salins. Elle n'a pas été remarquée en SSA avec la bactérie vivante.

Tous les tests utilisés à l'exception de SSA ont permis de distinguer 2 sous-types majeurs 5a et 5b. Les techniques de CoA et d'ID quantitatives utilisées pour estimer la quantité des antigènes spécifiques à chaque sous-type ont permis une meilleure discrimination des deux sous-types par rapport aux tests de CoA et d'ID. Le test de SSA a plutôt permis de confirmer que les souches des sous-types 5a et 5b partagent des déterminants antigéniques polysaccharidiques superficiels communs de nature capsulaire.

Contrairement à l'idée que seuls les antigènes capsulaires sont impliqués en IHA, l'utilisation de la souche capsulée J45 et de son mutant non capsulé du sérotype 5 a permis de démontrer que les lipopolysaccharides participent aussi à la sensibilisation des érythrocytes de mouton employés dans cette technique. Cette sensibilisation a été également constatée avec les lipopolysaccharides purifiés.

Les souches des sous-types 5a et 5b possèdent non seulement des déterminants antigéniques polysaccharidiques capsulaires communs, et spécifiques à chaque sous-type, mais aussi des épitopes associés aux lipopolysaccharides qui sont communs, et spécifiques à chaque sous-type. Les protéines de la membrane externe sont communes aux différentes souches du sérotype 5. L'utilisation des antisérums adsorbés a permis de démontrer grâce au test d'IHA utilisé pour mesurer les titres d'anticorps dans les antisérums de lapin, qu'il existe des souches atypiques au sein du sous-type 5b. Les souches du sous-type 5b ont été subdivisées en deux groupes, selon une réactivité typique ou atypique à celle de la souche de référence 81-750 du sous-type 5b, par l'antisérum produit contre le sous-type 5a adsorbé. Cette subdivision a été confirmée par le test d'immunobuvardage (Western blot). La réactivité atypique observée a été causée par des épitopes associés aux lipopolysaccharides.

Sur 1806 souches du sérotype 5 identifiées dans notre laboratoire, le sous-type 5b a été dominant avec une prévalence de 75 % contre 25 % pour le sous-type 5a.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
DÉDICACE	ix
REMERCIEMENTS	x
I. INTRODUCTION	1
II. REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
1- Taxonomie.....	5
1.1 Généralités sur la famille des <i>Pasteurellaceae</i>	5
1.2 Le genre <i>Actinobacillus</i>	5
1.3 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	7
2- Pathogénicité et épidémiologie.....	8
2.1 Pouvoir pathogène et mode de transmission.....	8
2.2 Épidémiologie.....	9
3- Facteurs de virulence.....	11
3.1 Polysaccharides capsulaires.....	12
3.2 Lipopolysaccharides.....	13
3.3 Protéines de la membrane externe.....	15

3.4 Fimbriae ou pili.....	16
3.5 Protéases extracellulaires.....	16
3.6 Exotoxines.....	17
4- Diagnostic.....	18
4.1 Diagnostic bactériologique.....	19
4.2 Diagnostic sérologique.....	20
4.3 Diagnostic moléculaire.....	23
5- Sérotypage d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	23
5.1 Méthodes de sérotypage.....	23
5.2 Parenté antigénique.....	25
6- Contrôle et prévention de la pleuropneumonie porcine.....	26
III. MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS.....	29
Article soumis au Journal of Clinical Microbiology	
J. Nzamba and K. R. Mittal	
Studies on antigenic characterization of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 5 strains and their prevalence in Quebec.	
IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	61
V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	69
VI. ANNEXES.....	87
Annexe 1.....	xi
Annexe 2.....	xii
Annexe 3.....	xiii

LISTE DES TABLEAUX

REVUE DE LA LITTÉRATURE

TABLEAU I. Quelques espèces du genre *Actinobacillus* et maladies causées chez certains animaux.....6

TABLEAU II. Chronologie de la description des sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* du biotype I.....10

MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS

TABLE 1. Serological reactivity of *A. pleuropneumoniae* reference strains of subserotypes 5a and 5b with rabbit hyperimmune sera against all the known serotypes of *A. pleuropneumoniae*.....55

TABLE 2. Results of subserotyping of *A. pleuropneumoniae* reference and field strains of subserotypes 5a and 5b using rabbit hyperimmune sera against subtypes 5a and 5b strains.....56

TABLE 3. Results of subserotyping of *A. pleuropneumoniae* reference and field strains of subserotypes 5a and 5b using rabbit hyperimmune sera adsorbed with heterologous antigens in IHA test.....57

TABLE 4. Prevalence of *A. pleuropneumoniae* serotype 5 strains in relation to the prevalence of other serotypes isolated from acute cases of porcine pleuropneumonia in Quebec.....58

TABLE 5. Serological reactivity of *A. pleuropneumoniae* capsulated strain J45 of serotype 5 and its noncapsulated mutant using rabbit hyperimmune sera against subtypes 5a and 5b strains in IHA, QID and SSA tests.....59

LISTE DES FIGURES

MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS

FIG. 1. Immunoblots using LPS extract as antigen and hyperimmune sera against serotypes 5a and 5b strains. A, rabbit anti-K17; B, rabbit anti-81-750; C, rabbit anti-K17 adsorbed with strain 81-750; D, rabbit anti-81-750 adsorbed with strain K17. Lanes: 1-3, atypical 5b strains in IHA test; 4, typical 5b strain in IHA test; 5, 5a strain; 6, 5b reference strain 81-750; 7, 5a reference strain K17; Molecular weight standards (MW in kilodaltons) are indicated on the right of immunoblot B.....60

ANNEXES

FIGURE 2. Profils des protéines de la membrane externe des souches d'*A. pleuropneumoniae* du sérotype 5 en SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium). Coloration au bleu de Coomassie. Lignes 1-5: souches de champ; ligne 6: souche 81-750 (5b); ligne 7: souche K17 (5a); PM = poids moléculaires en kilodaltons.....xi

FIGURE 3. Réactivité sérologique des souches de référence et de champ d'*A. pleuropneumoniae* du sérotype 5 en immunodiffusion. Puits A: antigènes des souches du sous-type 5a; Puits B: antigènes des souches du sous-type 5b; Puits 1: anti-K17 non adsorbé; Puits 2: anti-81-750 non adsorbé; Puits 3: anti-K17 adsorbé avec la souche 81-750; Puits 4: anti-81-750 adsorbé avec la souche K17.....xii

FIGURE 4. Morphologie des colonies des souches de référence et de champ d'*A. pleuropneumoniae* du sérotype 5 en serum soft agar (croissance de la bactérie en milieu semi-solide en présence d'antisérums). Tube 1: milieu PPLO semi-solide (1); Tube 2: (1) + sérum normal de lapin; Tube 3: (1) + antisérum contre un autre sérotype d'*A. pleuropneumoniae*; Tube 4: (1) + anti K17; Tube 5: (1) + anti 81-750.....xiii

DÉDICACE

**A la mémoire de mon père *Albert Debeyo Bagnena Nzamba*
et de mon neveu *Médard Nyambi Mabila***

Que Dieu veille au repos éternel de vos âmes.

A *Brigitte Badiwa-Bizowé*

**C'est dans l'adversité que l'on reconnaît les vrais amis.
Ta présence à mes côtés pendant ces moments difficiles m'a
fortement réconforté. Merci d'être une véritable amie.**

**A mon épouse *Christine Goulengou* et à nos adorables *J. C. Bagnena Nzamba*
et *A. G. Siety Nzamba*.**

Votre amour et votre patience m'ont donné du courage.

**A toute ma famille et en particulier, ma mère *Philomène Massagoussouka*,
Paulette Moutsinga, *Marianne Moutsinga*, *Clara Boukandou*, *Marie Agnès*
Mboumba, *Évelyne Bagafou*, *Rose Lendembet*, *Jacqueline Moussounda*, *Bibi*
Mbouity, *Viviane Bissagou*, *Alphonsine Moussounda*, *Joseph Mbouity*,
Olivier Divassa Mapoupa, *Joseph Poundou*, *Jean Pierre Kombi*, *Jean Louis Mabendi*
Nzatsimbou, *Kouya*, autres et amis.**

Votre soutien moral a fortement contribué.

REMERCIEMENTS

Ma profonde gratitude:

Au Dr *K. R. Mittal* pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour cette seule véritable richesse que l'on emporte avec soi « son savoir », qu'il a bien voulu me transmettre en partie avec toute la rigueur scientifique.

Aux Drs *Robert Higgins* et *Serge Messier* pour avoir accepté de faire partie de mon jury et pour leur attention scientifique sur cette investigation.

Toute ma reconnaissance:

Aux Drs *Serge Messier* et *Robert Higgins*, pour avoir accepté d'être membres de mon comité conseil.

Aux membres du GREMIP et en particulier, Dr *Mario Jacques* (Directeur), Dr *Daniel Dubreuil*, Dr *Marcelo Gottschalk*, Dr *Josée Harel*, Dr *John M. Fairbrother*; mais aussi aux Drs *Patrick Hallenbeck* (Microbiologie et Immunologie UDM) et *Jacques G. Lussier* (FMV) pour leur disponibilité.

A monsieur *Marco Langlois* pour les photos, et à mesdames *Suzanne Bourdon*, pour l'excellent soutien technique et l'ambiance; *Micheline St-Germain*, *Yolande Beaudry* et *Hélène Boucher* pour le dévouement à leur poste de secrétaire.

Mes sincères remerciements:

Aux Professeurs *Maryvonne Kombila* (Médecine tropicale), *Blaise Koudogbo* (Toxicologie) et *Edouard Ngou Milama* (Biochimie) de la Faculté de Médecine du Gabon, pour les lettres de recommandation.

Au Gouvernement de la République Gabonaise, pour la prise en charge financière de ma scolarité.

I- Introduction

Actinobacillus pleuropneumoniae est une bactérie à Gram négatif de la famille des *Pasteurellaceae*. Elle est l'agent causal de la pleuropneumonie porcine, une maladie sévère caractérisée par une pneumonie fibrinohémorragique ou nécrosante. Ce microorganisme est responsable des pertes économiques importantes dans l'industrie porcine à travers le monde. L'infection souvent fatale peut se développer à tous âges, mais les porcs âgés de douze semaines ou plus sont plus vulnérables. Les porteurs asymptomatiques ou chroniques sont responsables de la transmission de la maladie. Celle-ci peut se faire par contact direct ou par aérosol. Deux biotypes de cette bactérie sont définis sur la base de la dépendance à la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Les souches du biotype I sont NAD-dépendantes, celles du biotype II sont NAD-indépendantes. Actuellement, douze sérotypes du biotype I sont identifiés sur la base des antigènes capsulaires. Les sérotypes 1 et 5 sont subdivisés en deux sous-types a et b chacun. Le troisième sérotype du biotype II est proposé (Nielsen *et al.*, 1997).

Plus de 5000 souches d'*A. pleuropneumoniae* isolées à partir des lésions pulmonaires des porcs morts d'une pleuropneumonie aiguë, des amygdales ou cavités nasales des animaux provenant des troupeaux infectés chroniquement ont été soumises au sérotypage dans notre laboratoire. Des réactions croisées sont plutôt observées entre les sérotypes 1, 9 et 11; 3, 6 et 8; 4 et 7; 1 et 7 du biotype I. Ces réactions croisées sont attribuées aux antigènes "O" des lipopolysaccharides (LPS). Les polysaccharides capsulaires (PSC) sont des antigènes spécifiques à chaque sérotype. Cependant, Nielsen et O'Connor (1984) rapportent que les souches des sérotypes 6 et 8 partagent des déterminants antigéniques polysaccharidiques au niveau de la capsule.

Sur la base de sa virulence chez la souris (Komal et Mittal, 1990), le sérotype 5 est classifié dans le groupe des sérotypes les plus virulents incluant les sérotypes 1, 9, 10, et 11. Les souches du sérotype 5 identifiées dans notre laboratoire sont isolées en majorité des porcs atteints de pleuropneumonie aiguë; justifiant ainsi qu'elles sont vraiment très virulentes. Le sérotype 5, subdivisé en sous-types 5a (souche K17) et 5b (souche L20)

sur la base des déterminants antigéniques polysaccharidiques capsulaires, au moyen des tests d'agglutination sur lame, d'hémagglutination indirecte et d'immunodiffusion (Nielsen, 1986a), occupait jusqu'en 1992, la deuxième place après le sérotype 1 dans la prévalence des souches d'*A. pleuropneumoniae* isolées des porcs malades au Québec (Mittal *et al.*, 1992). Depuis 1993, le sérotype 5 prédomine au Québec (Mittal *et al.*, 1998). Et comme pour la plupart des autres sérotypes de cette bactérie, les souches du sérotype 5 sont antigéniquement hétérogènes et peuvent donc causer des problèmes de sérodiagnostic et de sérotypage. Ce sérotypage est basé sur l'identification et la caractérisation des antigènes spécifiques au sérotype et donc au sous-type (Mittal et Bourdon, 1991). Il semble que peu de laboratoires en Amérique du Nord pratiquent en routine le sous-sérotypage des souches du sérotype 5. La maîtrise de l'évolution épidémiologique de cette maladie implique cependant l'identification et la surveillance de la distribution des différents sérotypes et sous-types. En général, les vaccins à base de la bactérie entière disponibles ne sont efficaces que contre la souche homologue. Aucune donnée n'est disponible sur la prévalence des sous-types du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae*. Le souci permanent est celui de continuer à développer des tests sensibles, spécifiques, rapides, faciles d'utilisation pour une identification exacte de ce microorganisme, et des vaccins encore plus efficaces pour lutter contre l'affection.

Compte tenu de toutes ces observations, et afin de s'assurer d'un schéma d'identification précise des souches de ce sérotype actuellement prédominant, la présente étude se proposait donc d'examiner l'hétérogénéité antigénique parmi les souches de champ du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* isolées au Québec, au moyen de diverses techniques sérologiques. Les objectifs comprenaient l'identification des antigènes spécifiques à chaque sous-type et la détermination du sous-type dominant au Québec.

II- Revue de la Littérature

1. *Taxonomie*

1.1 *Généralités sur la famille des Pasteurellaceae*

La famille des *Pasteurellaceae* compte actuellement quatre genres: *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella* et *Mannheimia* (Angen *et al.*, 1999). Les membres de cette famille sont presque toujours associés aux vertébrés. Ils sont pour un nombre, des pathogènes importants des animaux de rente (MacInnes et Smart, 1993).

Les conditions requises pour la pathogénie des bactéries de cette famille incluent la colonisation de la surface des muqueuses, l'invasion des tissus de l'hôte, la survie et la multiplication chez l'hôte, l'interférence avec les défenses de l'hôte et les lésions causées chez l'hôte. Ces bactéries possèdent des facteurs d'adhérence, des polysaccharides capsulaires, des protéines de la membrane externe, des lipopolysaccharides et peuvent aussi sécréter des exotoxines. Elles infectent une vaste gamme d'animaux souvent avec une spécificité d'espèce marquée; et sont la cause de diverses maladies avec différentes caractéristiques pathologiques (Nicolet, 1990)

1.2 *Le genre Actinobacillus*

Le genre *Actinobacillus* créé par Lignières et Spitz existe depuis 1902 (Rycroft et Garside, 2000). Il groupe des bâtonnets de taille petite ou moyenne, qui peuvent présenter des formes cocobacillaires ou cocoïdes et des pseudoramifications. Ces bâtonnets sont immobiles, à Gram négatif avec tendance à la coloration bipolaire (Pilet, 1987). Les espèces de ce genre sont aérobies, microaérophiles ou anaérobies facultatives. Elles sont non sporulantes et fermentent les hydrates de carbone avec production d'acide et non de gaz (Phillips, 1990). Les bactéries du genre *Actinobacillus* sont des parasites obligatoires de l'humain et de diverses espèces animales.

Plus d'espèces de ce genre sont des commensales des aliments, des muqueuses digestives, respiratoires et génitales. Quelques unes se présentent seulement comme des pathogènes, mais certaines espèces commensales sont aussi retrouvées dans diverses lésions (Pilet, 1987; Phillips, 1990). Parmi les espèces pathogènes identifiées chez les animaux, *A. pleuropneumoniae* est un pathogène strict du porc (Tableau I).

TABLEAU I : Quelques espèces du genre *Actinobacillus* et maladies causées chez certains animaux.

Espèce	Hôte	Maladie	Besoin en NAD	Microflore normale
<i>A. equuli</i>	Cheval	Poulains: maladie du sommeil ou des articulations (néphrite purulente, arthrite) Adultes: avortement, septicémie, néphrite, endocardite	-	+
	Porc	Porcelets : arthrite Adultes : avortement, endocardite		
<i>A. lignieresii</i>	Bovin	Langue raide	-	+
	Mouton	Lésions suppuratives de la peau et des poumons		+
<i>A. pleuropneumoniae</i>	Porc	pleuropneumonie	+/-	-
<i>A. suis</i>	Porc	Septicémie, pneumonie, néphrite, arthrite.	-	+
	Cheval	Septicémie, polyarthrite		+
	Bovin	Avortement		+

Adapté de MacInnes et Smart (1993).

1.3 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Synonyme d'*Haemophilus pleuropneumoniae* et d'*H. parahaemolyticus* (Fenwick et Henry, 1994), cet agent infectieux est responsable de la pleuropneumonie porcine. Pattison en 1957 et ensuite Shope en Argentine en 1964 (Rycroft et Garside, 2000) sont parmi les premiers à observer la maladie. En 1978, Kilian *et al.* remarquent que les souches d'*Haemophilus* responsables de la pleuropneumonie porcine sont différentes de celles d'*H. parahaemolyticus* d'origine humaine. Ils officialisent le nom d'*H. pleuropneumoniae*, nom originellement utilisé par Shope (Rycroft et Garside, 2000). Ils décrivent les bactéries de cette espèce comme étant des bâtonnets pléomorphes, immobiles, à tendance cocobacillaire et à Gram négatif. Sur gélose au sang, ces bactéries produisent une zone d'hémolyse qui est accentuée par la β -toxine (ou β -lysine pour Pohl *et al.*, 1983) de *Staphylococcus aureus*, d'où la réaction de CAMP positive (Sebunya et Saunders, 1983). Ce microorganisme possède un métabolisme fermentaire varié et dégrade rapidement l'urée. Des études d'homologie d'ADN ont permis à Pohl *et al.* (1983) de constater qu'*H. pleuropneumoniae* est plus proche d'*A. lignieresii* que d'*H. influenzae* et de proposer son transfert au genre *Actinobacillus* en lui donnant le nom d'*A. pleuropneumoniae*.

A. pleuropneumoniae requiert le facteur V ou nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) pour sa croissance. Ce besoin en NAD fait distinguer deux biotypes: le biotype I (NAD-dépendant) et le biotype II (NAD-indépendant). Cependant, Niven et Lévesque (1988) rapportent que les souches du biotype II peuvent être aussi dépendantes du facteur V. Celui-ci peut être remplacé par un précurseur de pyridine nucléotide tel que la nicotinamide (NAm) ou alors être substitué par la nicotinamide mononucléotide (NMN) ou par la nicotinamide riboside (NR).

2. *Pathogénicité et épidémiologie*

2.1 *Pouvoir pathogène et mode de transmission*

A. pleuropneumoniae est l'agent causal de la pleuropneumonie porcine, une maladie qui se traduit par une pneumonie aiguë fibrinohémorragique associée à une pleurésie, ou par une pneumonie chronique nécrosante. Toutefois, cette bactérie serait également responsable d'otite chez un porc sevré (Duff *et al.*, 1996) et, d'ostéomyélite nécrosante et d'arthrite fibrinopurulente (Jensen *et al.*, 1999).

La pleuropneumonie porcine est associée aux conditions de stress dans les systèmes d'élevage intensif. Les porcs de tous âges peuvent être infectés. Mais ceux âgés de plus de 3 mois sont plus vulnérables (Sebunya *et al.*, 1982). La virulence est attribuée à la présence de la capsule, d'une ou plusieurs exotoxines et de l'endotoxine (Bertram, 1990; Fenwick, 1990; Inzana, 1990). En effet, l'évolution rapide de l'infection avec ses foyers hémorragiques pulmonaires, une pleurésie fibrineuse et une coagulopathie, présume l'action d'une ou plusieurs toxines potentialisée par des médiateurs de l'inflammation (Nicolet, 1994). Cette virulence est cependant variable d'un sérovar à l'autre, et même au sein d'un même sérovar (Rosendal *et al.*, 1985; Brandreth et Smith, 1987). Les différences de virulence sont associées à la structure de la capsule (Jacques *et al.*, 1988a), mais aussi à la composition du LPS (Jensen et Bertram, 1986), ou au type d'Apx produit (Frey et Nicolet, 1990). On doit donc considérer une pathogénie multifactorielle au cours de laquelle, les polysaccharides capsulaires avec leur action anti-phagocytaire, et les lipopolysaccharides qui en stimulant les médiateurs de l'inflammation participent au complexe de l'agressivité de la bactérie (Nicolet, 1994). La septicémie est la rare habituelle complication terminale de l'infection (Rycroft et Garside, 2000).

Les souches d'*A. pleuropneumoniae* du biotype II sont isolées sporadiquement de cas de pneumonie nécrotique (Frank *et al.*, 1992).

A. pleuropneumoniae est transmissible par voie respiratoire (Nielsen et Mandrup, 1977) et par contact direct. La maladie affecte essentiellement les porcelets en pouponnière et les porcs lors de l'engraissement. L'engraissement par rotation stimule continuellement l'infection. Le statut sanitaire à l'entrée est d'une importance capitale (Vaillancourt *et al.*, 1987). Les animaux infectés de façon sous-clinique constituent le principal réservoir et vecteur de transmission de l'infection entre les troupeaux. Leur détection est nécessaire et indispensable (Fenwick et Henry, 1994). Les infections concomitantes avec d'autres pathogènes du tractus respiratoire peuvent aider au développement de la pleuropneumonie (Caruso et Ross, 1990).

Sidibé *et al.* (1993) rapportent que les sérotypes 1, 2, 3, 5a, 5b, 7, 8, 10 et 12 peuvent se retrouver au niveau des cavités nasales et des amygdales sans causer des manifestations cliniques. Les souches isolées du tractus respiratoire supérieur seraient donc probablement moins virulentes que celles isolées à partir des poumons chez des animaux malades. Celles-ci seraient donc incapables de causer une infection aiguë.

2.2 Épidémiologie

Depuis Nielsen (1986b), la classification sérotypique d'*A. pleuropneumoniae* compte toujours 12 sérotypes dans le biotype I. Le tableau II illustre la chronologie de leur description.

(souche K17) et 5b (souche L20) au moyen des techniques d'agglutination sur lame, d'hémagglutination indirecte et d'immunodiffusion. En 1994, Rika *et al.* subdivisent le sérotype 1 en sous-types 1A (souche 4074) et 1B (souche ISU 158) via le test de coagglutination.

TABLEAU II : Chronologie de la description des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* du biotype I.

Sérotypes		Références	Techniques
1-2-3	Nicolet	1971	AG, IF
4-5	Gunnarsson <i>et al.</i>	1977	AG
6	Nielsen	1982	AG
7	Rosendal and Boyd	1982	IF
8	Nielsen and O'Connor	1984	ID, IHA
9-10	Nielsen	1985 a, b	ID, IHA
11	Kamp <i>et al.</i>	1987	AG
12	Nielsen	1986 b	ID

AG = Agglutination ID = Immunodiffusion
 IF = Immunofluorescence IHA = Hémagglutination indirecte

La pleuropneumonie porcine est rapportée dans presque tous les pays où la production porcine est industrialisée. La distribution des sérotypes est variable d'un pays à l'autre (Mittal *et al.*, 1992). La prévalence d'un sérotype peut varier au cours du temps au sein d'une même région (Mittal *et al.*, 1998). Les sérotypes 1 et 5 sont particulièrement dominants en Amérique du Nord (Rycroft et Garside, 2000).

au sein d'une même région (Mittal *et al.*, 1998). Les sérotypes 1 et 5 sont particulièrement dominants en Amérique du Nord (Rycroft et Garside, 2000). L'existence de cette affection respiratoire au Québec remonte à la fin des années 70, période d'expansion et d'intensification de la production porcine (Higgins *et al.*, 1982). En 1992, Mittal *et al.* confirment la présence des sérotypes 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, et 12 au Québec, marquée par une prédominance du sérotype 1 jusqu'en 1990 avec une moyenne de 68% des souches isolées; suivi du sérotype 5 incluant les deux sous-types avec une moyenne de 23%. Les sérotypes 2, 3, 6, 7, 8, 10 et 12 ont été rarement isolés pour 9% en moyenne. Cette hiérarchie a été conservée jusqu'en 1992. Depuis 1993, le sérotype 5 (5a et 5b) est devenu prédominant, suivi de près par le sérotype 7 (Mittal *et al.*, 1998).

Lebrun *et al.* (1999) signalent la présence du sérotype 4 en Amérique du Nord. Par contre, les sérotypes 9 et 11 ne sont pas encore identifiés au Québec. Les trois sérotypes du biotype II proposés (Nielsen *et al.*, 1997) ne sont pas encore rapportés au Canada.

3. Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence ou constituants antigéniques majeurs d'*A. pleuropneumoniae* se subdivisent en antigènes de surface, qui comprennent les polysaccharides capsulaires, les lipopolysaccharides, les protéines de la membrane externe et les fimbriae ou pili; et en toxines (Bertram, 1990; Fenwick, 1990; Inzana, 1990).

3.1 Polysaccharides capsulaires (PSC)

A. pleuropneumoniae est en général une bactérie capsulée. Selon Perry *et al.* (1990), les PSC sont de trois types. Le premier correspond à des séquences normales d'unités de sucres reliés (sérotypes 5a, 5b et 10), les structures des PSC des sous-types 5a et 5b sont partiellement identiques (Altman *et al.*, 1990). Le deuxième est de type acide teichoïque (sérotypes 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 11) et le troisième correspond à des polymères composés d'unités répétitives d'oligosaccharides (sérotypes 1, 4 et 12). L'épaisseur du matériel capsulaire varie selon l'isolat et l'âge de la culture. Les différences de virulence entre les sérotypes de cette espèce pourraient donc s'expliquer par des différences dans la structure de leur matériel capsulaire (Jacques *et al.*, 1988a). L'observation au microscope électronique de celui-ci après sa stabilisation à l'aide d'anticorps spécifiques démontre qu'il est plus épais pour les cellules cultivées dans un bouillon et récoltées en début de la phase logarithmique de la courbe de croissance (6 h) qu'après 18 heures d'incubation. Il est plus mince chez les bactéries cultivées sur milieu gélosé (Jacques *et al.*, 1988a).

Bertram (1990) rapporte que la capsule d'*A. pleuropneumoniae* peut avoir un rôle dans la production des lésions et dans la virulence bactérienne. Il démontre que l'inoculation à un porc, de souches dont la capsule est très développée, induit des problèmes respiratoires aigus et des lésions nécrohémorragiques. Ces manifestations cliniques ne sont pas obtenues avec des isolats ayant une capsule mince. Des propriétés anti-phagocytaires sont associées à la capsule (Inzana, 1990). Il rapporte qu'un isolat capsulé d'*A. pleuropneumoniae* du sérotype 5 s'était avéré résistant à la lyse par le complément en présence d'anticorps contre la capsule ou contre des antigènes somatiques; alors que son mutant non capsulé était fortement sensible à la lyse par le complément. Cette sensibilité à la lyse par le complément a été possible même en l'absence d'anticorps spécifiques (Inzana *et al.*, 1988). Udeze et Kadis (1992)

en étudiant la résistance du sérotype 1 au système du complément rapportent que des anticorps non spécifiques, présents avant immunisation et reconnaissant des épitopes polypeptidiques exposés à la surface pourraient inhiber l'action bactéricide des anticorps dirigés contre la capsule. Ward et Inzana (1994) rapportent par contre, que la capsule n'empêche pas l'activation du complément, mais qu'elle limite la déposition du complexe d'attaque membranaire de celui-ci. Ils signalent aussi que des anticorps IgG spécifiques aux LPS, présents dans le sérum normal semblent agir en synergie avec la capsule en bloquant l'activité des anticorps IgG anti-capsule. Ces anticorps limitent ainsi la capacité du complément à lyser cette bactérie.

Les polysaccharides capsulaires hautement purifiés des différents sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* sont actuellement considérés par divers chercheurs comme étant les meilleurs antigènes pour le sérodiagnostic (Rycroft et Garside, 2000). Ils ne sont pas en général impliqués dans les réactions croisées (Nakai *et al.*, 1992).

3.2 Lipopolysaccharides (LPS)

Les lipopolysaccharides sont des constituants majeurs de la membrane externe. Ce sont également des composants antigéniques et toxiques majeurs des bactéries à Gram négatif. Ils sont constitués de trois parties: la chaîne "O" polysaccharidique spécifique, qui est une répétition d'unités de résidus monosaccharidiques, le noyau oligosaccharidique qui est une association de deux noyaux, dont un noyau externe composé d'hexoses, lié à la chaîne O, et un noyau interne composé d'heptoses et de KDO (2-céto-3-désoxyoctanate), rattaché au lipide A, qui est la troisième partie (Jacques, 1996). La longueur de la chaîne "O" varie d'un sérotype à l'autre. Sa structure polysaccharidique basale est identique pour les souches de référence (K17, L20, 81-750) d'*A. pleuropneumoniae* du sérotype 5. La chaîne O de la souche 81-750 est

partiellement *O*-acétylée, celles des souches K17 et L20 ne sont pas substituées (Altman *et al.*, 1990). Les antigènes "O" des LPS spécifiques sont toujours associés aux polysaccharides capsulaires spécifiques chez *A. pleuropneumoniae* (Perry *et al.*, 1990). Le lipide A est responsable des propriétés toxiques (Liggett and Farrell, 1986; Fenwick, 1990). La structure du noyau est peu variable au sein d'une même espèce. Par contre, la chaîne O qui est variable dans sa structure, est responsable de la spécificité au sein d'un groupe (Fenwick, 1990). *A. pleuropneumoniae* possède des LPS de type lisse, de type rugueux mais aussi de type semi-rugueux comme celui de la souche K17 du sérotype 5 (Byrd et Kadis, 1989). Lorsque le LPS est de type rugueux (sans chaîne O), il est appelé lipo-oligosaccharide (Jacques, 1996). Fenwick et Osburn (1986) rapportent que les réactions non spécifiques dues aux LPS sont plus fortes avec les LPS de type rugueux. Les LPS d'*A. pleuropneumoniae* traversent la couche capsulaire et s'exposent à la surface de la cellule sous forme de vésicules (Jacques *et al.*, 1988b).

Les LPS d'*A. pleuropneumoniae* stimulent la production des cytokines inflammatoires telles que le facteur nécrosant les tumeurs (TNF), les interleukines 1 et 8 par les macrophages alvéolaires (Lin *et al.*, 1994). Ces cytokines inflammatoires, en particulier IL-1 et IL-8 sont associées au développement de la pleuropneumonie et contribuent à la sévérité de l'infection (Baarsch *et al.*, 1995). Les LPS sont les adhésines majeures qui sont impliquées dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux anneaux de la trachée porcine. Ils ont une affinité pour les sécrétions du tractus respiratoire porcine chez certaines souches de cette espèce (Bélanger *et al.*, 1994). Dom *et al.* (1994) observent une adhérence *in vivo* d'une souche d'*A. pleuropneumoniae* du sérotype 2 aux cellules épithéliales des poumons. Paradis *et al.* (1994) rapportent une adhérence du LPS à l'endothélium vasculaire, au mésenchyme pulmonaire et à l'épithélium trachéal du porc. Le lipide A du LPS d'*A. pleuropneumoniae* est impliqué dans la liaison du LPS à l'hémoglobine de porc. Pour certains isolats, cette liaison du LPS à l'hémoglobine serait un moyen d'acquérir le fer relâché par les érythrocytes lysés par les hémolysines *in vivo*

(Bélangier *et al.*, 1995). La croissance dans les conditions réduites en fer affecte l'expression des LPS et non celle des polysaccharides capsulaires (Paradis *et al.*, 1996).

3.3 Protéines de la membrane externe (PME)

On peut détecter par électrophorèse (SDS-PAGE) au moins 3 protéines majeures de la membrane externe de poids moléculaires approximatifs de 17, 32 et 42 kDa, pour les souches des sérotypes 1 à 8 d'*A. pleuropneumoniae*. Ces PME majeures sont aussi reconnues par les antisérums préparés contre d'autres bactéries à Gram négatif incluant *Escherichia coli* et autres membres de la famille des *Pasteurellaceae* (MacInnes et Rosendal, 1987). Pour les protéines mineures, de faibles différences sont observées entre les souches des divers sérotypes. La synthèse de certaines PME est influencée par la quantité du NAD dans le milieu (O'Reilly et Niven, 1986).

Les sérotypes 1 à 5 et le sérotype 7 d'*A. pleuropneumoniae* produisent des PME immunologiquement conservées de 105 kDa et 76 kDa dans les conditions réduites en fer (Deener et Potter, 1989a). Certaines de ces protéines sont identifiées comme étant des récepteurs pour la transferrine et sont impliquées dans la spécificité d'hôte (Niven *et al.*, 1989; Gonzalez *et al.*, 1990; Ricard *et al.*, 1991). La présence du maltose induit la production d'une PME de 42 kDa qui jouerait le rôle de porine pour *A. pleuropneumoniae* dans le transport de ce sucre à travers sa membrane externe (Deener et Potter, 1989b). Wilma *et al.* (1996) rapportent une PME de 48 kDa qui est commune aux 12 sérotypes capsulaires d'*A. pleuropneumoniae* mais absente de la membrane externe des autres agents pathogènes à Gram négatif du porc. Cette protéine est immunogénique chez les porcs infectés par les souches des sérotypes 1 et 5.

3.4 *Fimbriae ou pili*

Les fimbriae servent à l'adhérence de certaines bactéries aux cellules épithéliales. Il existe une controverse quant à leur présence chez *A. pleuropneumoniae*. En 1991, Utrera et Pijoan (Rycroft et Garside, 2000) rapportent à l'aide de la microscopie électronique, la présence de fimbriae chez les souches d'*A. pleuropneumoniae* cultivées sur gélose au sang. Ces résultats diffèrent non seulement de ceux obtenus par Jacques *et al.* (1988b) qui, sans exclure la possibilité de leur présence sur d'autres isolats ou dans d'autres conditions expérimentales, n'ont pas réussi à observer ces structures. Mais aussi des structures observées par Inzana *et al.* (1988) qui ressembleraient plutôt à des ramifications dues à une déshydratation du matériel capsulaire.

3.5 *Protéases extracellulaires*

Une enzyme protéolytique antigéniquement commune à tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* présente dans le surnageant de la culture est décrite par Negrete-Abascal *et al.* (1998). Cette protéase extracellulaire a une activité protéolytique qui est augmentée en présence de calcium ou de zinc. Elle dégrade les immunoglobulines A et G du porc, mais aussi les hémoglobines porcine, humaine et bovine. Elle est reconnue par les sérums de porcs infectés naturellement par les sérotypes 1 et 5 d'*A. pleuropneumoniae*. Ces protéases pourraient, par cette capacité de dégradation, jouer un rôle dans la virulence de cette bactérie.

3.6 Exotoxines

A. pleuropneumoniae sécrète des exotoxines thermolabiles, qui possèdent différentes activités biologiques. Ces toxines font partie du groupe des RTX (Repeats in the Structural Toxin) et sont considérées comme étant des facteurs de virulence majeurs (Frey *et al.*, 1993; Kamp *et al.*, 1997). Elles sont responsables du développement des symptômes et des lésions pulmonaires typiques de la pleuropneumonie porcine (Kamp *et al.*, 1997).

Une désignation uniforme des hémolysines, cytolysines, pleurotoxines produites par *A. pleuropneumoniae*, et de leurs gènes retrouvés dans une seule unité transcriptionnelle "CABD", où le gène C représente la protéine activatrice, le gène A, la protéine de structure, et les gènes B et D, les protéines de sécrétion, a été proposée sous l'appellation de Apx (*Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin) par Frey *et al.* (1993). L'expression de ces gènes entraîne la production des différentes Apx par les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. Quatre types d'Apx ayant des poids moléculaires variables entre 100 et 202 kDa ont été identifiées :

a-/ ApxI (105 kDa) rapportée par Frey et Nicolet en 1988 (Rycroft et Garside, 2000) est une toxine fortement hémolytique et cytotoxique envers les cellules phagocytaires. Elle est sécrétée par les souches de référence des sérotypes 1, 5(a-b), 9, 10 et 11 (Frey, 1995).

b-/ ApxII (103-105 kDa) retrouvée chez tous les sérotypes à l'exception du sérotype 10 est une toxine faiblement hémolytique et faiblement cytotoxique (Frey, 1995).

c-/ ApxIII (120 kDa) retrouvée chez les sérotypes 2, 3, 4, et 8 est une toxine non hémolytique mais fortement cytotoxique pour les macrophages et les neutrophiles (Frey, 1995).

d-/ ApxIVA (environ 202 kDa) est une toxine strictement excrétée *in vivo* par tous les sérotypes et dont le rôle dans la pathogénicité est à présent inconnu (Schaller *et al.*, 1999).

Le degré de virulence observé entre les 12 sérotypes est relié à la force de leur activité hémolytique. Ceux produisant Apx I et Apx II sont les plus virulents (Komal et Mittal, 1990). Un mutant du sérotype 5 ne sécrétant pas les Apx I et II suite à une mutagenèse chimique s'est avéré non pathogène chez le porc et la souris (Inzana *et al.*, 1991).

4. Diagnostic

Les signes cliniques incluant : hyperthermie, détresse respiratoire sévère, anorexie, vomissements et épistaxis (Nielsen, 1970; Liggett et Farrell, 1986) et les lésions macroscopiques pulmonaires caractéristiques de la pleuropneumonie sont suffisants pour établir un diagnostic présomptif (Fenwick et Henry, 1994). La confirmation du laboratoire est très indispensable non seulement pour corroborer la clinique et le diagnostic morphologique, mais aussi pour déterminer le sérotype et la susceptibilité aux antibiotiques (Fenwick et Henry, 1994). Toutefois, une émergence d'isolats atypiques est actuellement observée (Frank *et al.*, 1992; Blanchard *et al.*, 1993; Gottschalk *et al.*, 2000)

4.1 Diagnostic bactériologique

L'isolement et l'identification d'*A. pleuropneumoniae* sont nécessaires pour la confirmation du diagnostic clinique. Il est recommandé de faire un typage sérologique de chaque isolat. Le microorganisme est retrouvé dans les cas aigus au niveau des tissus pulmonaires et dans les exsudats des plèvres et des narines. Plusieurs auteurs ont rapporté l'utilisation des tests immunologiques pour la détection des antigènes bactériens dans les poumons des animaux infectés. Cette pratique est possible avec des extraits pulmonaires et non avec des échantillons d'amygdales ou des cavités nasales d'animaux cliniquement sains. En effet, l'usage d'un antisérum polyclonal entraînerait des réactions croisées avec la flore normale des voies respiratoires supérieures (Rosendal *et al.*, 1981; Mittal *et al.*, 1983c et 1993b). Dans certains cas, l'isolement de cet agent pathogène est réalisé à partir d'écouvillonnages des cavités nasales, ou à partir des amygdales. Ces dernières permettent un meilleur isolement du germe que les narines (Sidibé *et al.*, 1993). L'isolement d'*A. pleuropneumoniae* à partir des voies respiratoires supérieures des porcs cliniquement sains, mais provenant de troupeaux avec indications sérologiques d'infection, constitue une méthode complémentaire au diagnostic sérologique (Sidibé *et al.*, 1993). Il y aurait une forte corrélation pour le sérotype 5. Alors que pour les autres sérotypes, certains troupeaux sont séropositifs sans isolement du sérotype correspondant, et d'autres séronégatifs avec une isolation confirmée (Sidibé *et al.*, 1993).

Différents milieux sélectifs ont été utilisés pour l'isolement d'*A. pleuropneumoniae* (Moller *et al.*, 1993; Sidibé *et al.*, 1993; Jacobsen et Nielsen, 1995). Actuellement, le milieu pleuropneumonia-like organism (PPLo) est employé pour l'isolement sélectif de cette bactérie qui est souvent présente en petit nombre dans les échantillons provenant des cavités nasales et des amygdales riches en flore normale abondante et capable d'interférer (Sidibé *et al.*, 1993). Cependant, Gagné *et al.* (1998) rapportent que

l'isolement du sérotype 1 de cette bactérie par la méthode immunomagnétique est 1000 fois plus sensible que la culture traditionnelle. Cette méthode est hautement efficace pour sa détection dans les amygdales.

L'identification préliminaire d'*A. pleuropneumoniae* est généralement effectuée par les critères clés suivants: colonies d'aspect cireux ou mucoïde, hémolytiques sur gélose au sang de mouton, réaction de CAMP positive, dépendance au NAD visualisée sur gélose au sang par un phénomène de satellitisme autour d'une strie de *Staphylococcus aureus* (source de NAD), réaction positive et souvent très rapide de la dégradation de l'urée, qui est un test clé, car les cultures subséquentes entraînent une perte du besoin en NAD et souvent une diminution de l'activité hémolytique (Fenwick et Henry, 1994). L'identification est complétée et confirmée par le sérotypage de l'isolat. Certaines souches d'*A. pleuropneumoniae* du sérotype 1 ne produisent pas d'uréase. Ces souches atypiques ne sont pas encore rapportées au Canada; mais elles peuvent être à l'origine d'une mauvaise identification du microorganisme (Frank *et al.*, 1992; Blanchard *et al.*, 1993).

4.2 Diagnostic sérologique

La sérologie est un outil important du diagnostic dans la détermination du statut sanitaire des troupeaux infectés chroniquement. Plusieurs troupeaux de porcs sont chroniquement infectés par *A. pleuropneumoniae* sans présenter de signes cliniques sauf un faible niveau de lésions pulmonaires (Rycroft et Garside, 2000).

Les tests sérologiques qui sont souvent utilisés pour la détection des anticorps anti-*A. pleuropneumoniae* et qui doivent être interprétés avec précaution sont: le CFT ou test de fixation du complément (Nicolet *et al.*, 1971; Lombin *et al.*, 1982),

le test ELISA ou enzyme-linked immunosorbent assay (Nielsen *et al.*, 1991; Gottschalk *et al.*, 1994) et l'AT-2ME ou agglutination en tube en présence de 2-mercaptoéthanol (Mittal *et al.*, 1984).

Le CFT, test de référence primordial, a pour inconvénients, une faible sensibilité et une complexité d'exécution (Nicolet *et al.*, 1971; Stenbaek *et al.*, 1997). Ce test ne détecte que des antigènes de surface, et ne peut être favorable pour les souches sans capsule, donc non typables (Fenwick et Henry, 1994). Sa sensibilité pour le sérotype 5 n'a été que de 47% (Gottschalk *et al.*, 1994).

L'AT-2ME élimine l'activité agglutinante des immunoglobulines M (IgM) qui sont souvent impliquées dans les réactions croisées. Facile d'utilisation, l'AT-2ME très spécifique et aussi sensible que le CFT est capable de détecter une infection active avant le CFT (Mittal *et al.*, 1984).

L'ELISA par contre est actuellement la méthode qui associe la sensibilité et la spécificité aussi bien sur la plan immunologique qu'au niveau épidémiologique (Nielsen *et al.*, 1991). L'antigène utilisé en diagnostic sérologique est l'extrait brut de bactéries entières d'*A. pleuropneumoniae* (Nielsen *et al.*, 1991; Trottier *et al.*, 1992). Certains chercheurs considèrent les polysaccharides capsulaires purifiés (dépourvus de protéines et de LPS) comme étant les meilleurs antigènes (Fenwick *et al.*, 1996). Cependant, l'utilisation du LPS à longue chaîne (LPS-LC) purifié comme antigène améliore la spécificité du test ELISA et facilite sa standardisation (Gottschalk *et al.*, 1994). Ces mêmes auteurs rapportent après évaluation du LPS-LC du sérotype 5 avec des sérums des troupeaux exposés à ce sérotype et à l'opposé, avec des sérums des animaux exposés à d'autres sérotypes, que celui-ci permet non seulement une diminution considérable des réactions croisées avec les autres sérotypes, mais aussi une augmentation de la spécificité et de la sensibilité, comparativement aux résultats obtenus avec l'extrait brut. Cette méthode pourrait probablement détecter les isolats atypiques

actuellement observés (Gottschalk *et al.*, 2000). Radacovici *et al.* (1995) rapportent que la culture d'*A. pleuropneumoniae* du sérotype 5 en milieu liquide permet d'obtenir une plus grande quantité de LPS-LC que la culture en milieu solide. Le test ELISA développé par Devenish *et al.* (1990), qui utilise un anticorps monoclonal de lapin contre l'hémolysine de 104 kDa donne des résultats positifs avec les sérums de porcs infectés expérimentalement non seulement avec les sérotypes 1, 2, 5, et 7 d'*A. pleuropneumoniae*, mais aussi avec *A. suis*.

L'utilisation du test immunoenzymatique (EIA) basé sur l'inhibition de la fixation d'un anticorps monoclonal spécifique au sérotype 5 de ce microorganisme (Stenbaek *et al.*, 1997) a démontré une sensibilité inférieure à celle de l'ELISA utilisant le LPS-LC, mais une sensibilité et une spécificité supérieures à celles du CFT.

La technique de RIA (radio immunoassay) développée par Inzana *et al.* (1990), capable de détecter les anticorps dirigés contre *A. pleuropneumoniae* ou les antigènes capsulaires de cette bactérie, est très sensible (détecte 1 ng d'anticorps spécifiques ou 100 pg de matériel capsulaire) mais peu spécifique.

Les résultats que l'on peut obtenir avec les tests ci-dessus décrits permettent de distinguer trois catégories de troupeaux suivant leur statut sanitaire envers *A. pleuropneumoniae* (Fenwick et Henry, 1994). Des troupeaux séropositifs sans signes cliniques et qui représentent la majorité (1), des troupeaux séronégatifs et cliniquement sains (2) et des troupeaux séropositifs avec une confirmation pathologique et bactériologique de l'infection (3). Un test sérologique positif peut cependant être le résultat d'une exposition de l'animal à un microorganisme qui possède des antigènes communs avec *A. pleuropneumoniae* (réactions croisées). Un résultat faussement positif condamnera à tort un troupeau non infecté. Alors qu'un résultat faussement négatif ne permettra pas de détecter les troupeaux infectés.

4.3 Diagnostic moléculaire

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) décrite par Gram et Ahrens (1998) qui utilise une sonde d'ADN capable de détecter *A. pleuropneumoniae* est proposée comme test de routine pour identifier cette bactérie grâce à sa sensibilité et à sa spécificité par rapport à la culture traditionnelle. Cette méthode ne permet pas de discriminer les sérotypes les uns des autres et est donc insuffisante au diagnostic de la pleuropneumonie porcine qui nécessite la connaissance du sérotype impliqué. Par contre, la réaction de polymérisation en chaîne multiplex développée par Lo *et al.* (1998) permet de différencier le sérotype 5 des autres sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* et non pas ses sous-types. En utilisant l'amplification génomique arbitraire (RAPD) associée à d'autres techniques, Chatellier *et al.* (1999) rapportent qu'une association de plusieurs méthodes est nécessaire pour le typage rapide en sous-sérotypage de routine du sérotype 5 contrairement au sérotype 1 d'*A. pleuropneumoniae*.

5. Sérotypage d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*

5.1 Méthodes de sérotypage

L'identification complète d'*A. pleuropneumoniae*, face à la grande hétérogénéité sérologique chez cette espèce, nécessite un sérotypage qui représente un paramètre important pour les études épizootiques et immunologiques des infections causées par cette bactérie (Veary, 1989). La détermination des sérotypes impliqués dans une région donnée permet non seulement de confirmer l'identification bactériologique et l'examen

histopathologique, qui sont souvent suffisants au cours de la phase aiguë de la maladie, mais aussi de contrôler adéquatement la maladie et d'assurer une bonne surveillance épidémiologique.

Les antisérums utilisés dans les méthodes sont obtenus en immunisant des lapins avec de cellules entières formolisées ou non des différentes souches de référence des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (Rosendal *et al.*, 1981). La spécificité du sérotype est obtenue en adsorbant son antisérum de lapin avec les souches de référence hétérologues. Cependant, l'adsorption d'un antisérum avec une souche hétérologue donnant une réaction croisée a pour conséquence, la réduction du titre d'anticorps. On retrouve parmi les méthodes de sérotypage actuellement développées:

- a) les épreuves d'agglutination lente en tube (Gunnarsson *et al.*, 1977) et d'agglutination rapide sur lame (Mittal *et al.*, 1987), qui ne permettent pas le sérotypage des souches auto-agglutinantes ou non agglutinantes (Hunter *et al.*, 1983; Mittal *et al.*, 1987).
- b) l'agglutination utilisant des anticorps monoclonaux adsorbés par des billes de polystyrène (Dubreuil *et al.*, 1996) constitue un test très rapide et simple d'exécution. Ce test ne permet pas le sérotypage des souches auto-agglutinantes.
- c) l'immunodiffusion en gel (Rosendal *et al.*, 1981) très spécifique permet par contre le sérotypage des souches auto-agglutinantes
- d) le test de précipitation en anneau (Hunter *et al.*, 1983) est préconisé comme alternative au problème des isolats auto-agglutinants.
- e) l'hémagglutination indirecte (Mittal *et al.*, 1983a) très spécifique est une épreuve qui permet de différencier les isolats présentant des réactions croisées (Mittal et Bourdon, 1991)

f) l'immunofluorescence indirecte (Rosendal *et al.*, 1981) dont la révélation utilise l'isothiocyanate de fluoresceine est une épreuve qui ne détecte que des antigènes de surface.

g) la coagglutination (Mittal *et al.*, 1983b) plus sensible et spécifique que l'agglutination sur lame est une technique qui présente l'avantage de détecter les antigènes particuliers et solubles (Mittal *et al.*, 1983c; 1987).

h) la contre-immunoélectrophorèse (Mittal *et al.*, 1993a) aussi rapide et sensible que la coagglutination, mais plus rapide que le test d'immunodiffusion et plus simple que l'hémagglutination indirecte, utilise une migration forcée par un courant électrique et s'avère une solution de choix pour le sérotypage des souches auto-agglutinantes.

Ces deux dernières épreuves (g et h) sont très utiles au diagnostic de la pleuropneumonie aiguë et sont capables de détecter les antigènes dans les tissus pulmonaires. Elles sont plus simples et rapides que l'isolement par culture.

5.2 Parenté antigénique

La parenté antigénique entre certains sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* est à l'origine des réactions croisées observées lors des tests sérologiques. Il existe au moins trois groupes d'antigènes comprenant des antigènes capsulaires thermostables spécifiques au sérotype et des antigènes capsulaires thermolabiles spécifiques au sérotype. En plus de ces deux groupes, les antigènes somatiques thermostables de nature lipopolysaccharidique (Nicolet, 1971; Nielsen, 1985a et 1985b; Mittal et Bourdon, 1991; Mittal *et al.*, 1993b) et les protéines de la membrane externe parfois communes aux douze sérotypes de l'espèce (Wilma *et al.*, 1996) sont responsables des réactions

réactions croisées suivant l'antigène et la méthode de sérotypage utilisés. Les réactions croisées entre les sérotypes 1, 9 et 11 (Nakai *et al.*, 1992) mais aussi entre les sérotypes 4, 7; 3, 6 et 3, 8 (Perry *et al.*, 1990) seraient attribuables à des épitopes communs associés aux lipopolysaccharides. C'est la chaîne "O" polysaccharidique du LPS qui est un des déterminants antigéniques communs à ces sérotypes. Par contre, les polysaccharides capsulaires constituent des déterminants antigéniques spécifiques à chaque sérotype d'*A. pleuropneumoniae* (Nakai *et al.*, 1992; Rycroft et Garside, 2000). Cependant, Nielsen et O'connor (1984) rapportent que les souches des sérotypes 6 et 8 possèdent des déterminants antigéniques polysaccharidiques capsulaires communs. Toutes ces observations sont corroborées par Jacques *et al.* (1988a) suite à la microscopie électronique de la capsule stabilisée par des antisérums homologues. Mittal *et al.* (1988) soutiennent que des antigènes de groupe sont partagés entre les sérotypes 1, 9 et 11; 3, 6 et 8; 4 et 7. Ces antigènes seraient indépendants des antigènes spécifiques à chaque sérotype, à l'espèce, à la souche et des antigènes communs à d'autres espèces.

Une classification des souches des sérotypes 1, 9 et 11 d'*A. pleuropneumoniae* faite sur la base des antigènes capsulaires spécifiques et somatiques du sérotype (K1:01, K9:01 et K11:01) est proposée à cause des épitopes communs entre ces sérotypes (Rodriguez-Barbosa *et al.*, 1996).

6. Prévention et contrôle de la pleuropneumonie porcine

Les conséquences les plus inquiétantes pour l'industrie porcine reposent sur les cas asymptomatiques ou chroniques, qui sont responsables de la propagation de la pleuropneumonie porcine, dont les modes de contamination sont le contact direct ou l'aérosol. L'introduction de l'agent infectieux dépend du statut immunitaire du troupeau et de la virulence de la souche. Les porcs séronégatifs et cliniquement sains

(catégorie 2) sont plus vulnérables. Tout animal séropositif doit être considéré comme un porteur potentiel (Nielsen et Mandrup, 1977). Une attention particulière doit donc être portée aux animaux infectés séronégatifs (faux négatifs), surtout lorsque le diagnostic bactériologique ne peut plus être établi. Mais aussi sur les porteurs sains (animaux infectés sans signes cliniques apparents).

La mise en place des conditions adéquates d'élevage diminue les risques de manifestations cliniques épidémiques. Cependant, si le troupeau est déjà infecté par *A. pleuropneumoniae*, les risques de développer la maladie sont augmentés. La majorité des troupeaux de porcs sont séropositifs pour cette bactérie. Mais c'est seulement quelques uns de ces troupeaux qui possèdent des animaux ayant des signes cliniques; parce qu'ils sont infectés par des souches peu virulentes dont l'opportunité dépend des conditions d'élevage. Les nouveau-nés protégés par l'immunité passive colostrale peuvent devenir porteurs après avoir été infectés par ce microorganisme. L'infection peut survenir entre 11 et 21 jours d'âge. Les animaux capables de survivre deviennent des porteurs chroniques et ont le potentiel d'excréter sporadiquement le microorganisme (Fenwick et Henry, 1994).

L'antibiothérapie est efficace à la phase initiale de la maladie. Elle n'élimine pas la maladie dans un troupeau, mais elle permet de réduire sa sévérité (Fenwick et Henry, 1994). La majorité des souches d'*A. pleuropneumoniae* sont sensibles à de nombreux antibiotiques. Cependant, une augmentation dans la fréquence des souches résistantes est observée (Fenwick et Henry, 1994; Bada *et al.*, 1995).

Plusieurs investigations vaccinales ont été rapportées avec une efficacité très variable. La vaccination avec une bactérine ne protège que contre l'infection avec une souche homologue (Higgins *et al.*, 1985). Bhatia *et al.* (1991) ne remarquent qu'une protection partielle lors de l'immunisation sous-cutanée avec soit des cellules entières formolisées, des polysaccharides capsulaires, des LPS ou l'hémolysine de 105 kDa

purifiée, chez les souris infectées par voie intra-nasale, avec les sérotypes homologues ou hétérologues d'*A. pleuropneumoniae*. Ils rapportent également que les composants thermolabiles tels que l'hémolysine et les PME peuvent jouer un rôle décisif dans la protection contre l'infection aiguë. Oishi *et al.* (1993) démontrent que des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la capsule des sérotypes 1, 2 et 5 ou contre le LPS du sérotype 2 confèrent une protection passive, lors d'une infection subséquente par la souche homologue. Andersen *et al.* (1997) observent qu'un vaccin expérimental utilisant des PSC du sous-type 5b d'*A. pleuropneumoniae* conjugués à la toxine tétanique induit une protection efficace considérable contre les lésions pulmonaires et létales causées par la souche homologue lors d'une infection expérimentale.

L'immunité induite par la vaccination est donc en général spécifique de sérotype. Ainsi, bien que réduisant le taux de mortalité et la sévérité des infections, les vaccins sont inefficaces dans la prévention des infections (Fenwick et Henry, 1994). Un vaccin induisant une protection efficace contre tous les sérotypes n'est pas disponible. Par contre, les expositions naturelles confèrent une protection complète (Fenwick et Henry, 1994; Rycroft et Garside, 2000). Alors que la bactérine inactivée induit seulement une protection partielle contre l'infection (Rycroft et Garside, 2000). La stratégie vaccinale alternative utilise *A. pleuropneumoniae* vivante ou inactivée pour l'immunisation orale des porcs par la voie de l'aérosol (Rycroft et Garside, 2000).

L'élimination de l'infection par la détection des animaux porteurs reste probablement le moyen le plus approprié pour une lutte efficace contre la pleuropneumonie porcine. La détermination du statut sanitaire des animaux avant tout transfert, la dépopulation, et l'isolement des animaux par groupe d'âge s'avèrent des mesures pour contrôler la maladie. L'alternative à la dépopulation serait la médication précoce entre les 10 et 15 premiers jours de la naissance, suivie d'un isolement (Fenwick et Henry, 1994).

III- Matériels, méthodes et résultats

**Studies on antigenic characterization
of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 strains
and their prevalence in Quebec**

J. Nzamba, and K. R. Mittal*

*Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire,
Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6*

*Corresponding author

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

Phone : (514) 345-8521 ext : 8296

Fax : (450) 778-8113

Key words : *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotyping, antigenic heterogeneity.

Soumis au "**Journal of Clinical Microbiology**".

ABSTRACT

A. pleuropneumoniae serotype 5 field strains were investigated for their antigenic heterogeneity using rabbit hyperimmune sera against reference strains and a battery of serological tests. CoA test was used as a primary screening test for serotyping of *A. pleuropneumoniae* strains. Serotype 5 strains showed some cross-reactivity with other serotypes in CoA test but not in ID, CIE, IHA and SSA tests. However, none of these tests were able to distinguish clearly between subtypes 5a and 5b strains. QCoA and QID tests were used to quantify the 5a and 5b specific antigens. The quantity of 5a specific antigen was at least 16 times more among 5a strains than that for 5b strains as detected by QCoA test. However, 5b strains possessed similar antigen titers for both 5a and 5b in QCoA test. In QID test, although the antigen titers were equal, the intensity of precipitation line was much more stronger for each subserotype with their corresponding homologous antisera. IHA test was used to measure the antibody titers in rabbit antisera for each subtype. The results in IHA test were similar to those obtained in QCoA test for both 5a and 5b strains. Using cross-adsorbed rabbit antisera, IHA test was able to further subdivide 5b field strains into typical (similar to reference strain) and atypical groups. Results obtained with IHA test regarding the existence of typical and atypical subtype 5b strains were confirmed by immunoblot assay. Capsulated and noncapsulated mutant J45 strains of *A. pleuropneumoniae* serotype 5 were used as controls to study the involvement of capsular and lipopolysaccharide antigens in IHA, QID and SSA tests. Results indicated that both subtypes 5a and 5b strains possessed subtype specific as well as cross reacting common capsular and lipopolysaccharide antigens. Based on the results obtained using a variety of serological tests developed in our laboratory during last 10 years to differentiate subtypes 5a and 5b strains, a total of 1159 strains of serotype 5 were characterized; subserotype 5b was more dominant with a prevalence of 75% than 5a with a prevalence of 25%.

INTRODUCTION

A. pleuropneumoniae is a Gram-negative bacteria and the etiological agent of swine pleuropneumonia, which is a major problem in the modern swine industry all over the world, characterized by acute fibrino-haemorrhagic or a chronic localized necrotizing pleuropneumonia in pigs, resulting in high mortality and severe economic losses.

Two biotypes of *A. pleuropneumoniae* have been distinguished (24): biotype I (NAD-dependent) and biotype II (NAD-independent). Strains of *A. pleuropneumoniae* possess several antigens, some of which are shared by different serotypes. On the basis of capsular antigens, to date there are 12 serotypes of *A. pleuropneumoniae* in biotype I (29). Nicolet (23) defined 3 serotypes. This classification scheme was extended by Gunnarsson et al.(4) who described serotypes 4 and 5, and by Nielsen (25), and Rosendal and Boyd (34) who proposed the existence of serotypes 6 and 7 respectively. Serotypes 8, 9, 10 and 12 were added respectively by Nielsen and O'Connor (30) and Nielsen (26, 27, 29) and serotype 11 by Kamp et al. (9). Serotypes 1 and 5 were further divided into 2 subtypes a and b (21, 28, 33).

Serotyping of *A. pleuropneumoniae* is based on identification and characterization of serotype-specific antigens. The various tests used for serotyping are: agglutination (4), slide agglutination (16), immunodiffusion (23), ring precipitation (16), indirect hemagglutination (17), immunofluorescence (34), coagglutination (18), counterimmunoelectrophoresis (31), slide precipitation (5), growth agglutination, serum soft agar and immunoblot assays (37). Cross reactivity has been reported only between serotypes 1, 9 and 11; 3, 6 and 8; 4 and 7; and 1 and 7 (13, 20, 22, 37).

In addition to clinical signs, diagnosis of porcine pleuropneumonia relies on the isolation, identification and serotyping of *A. pleuropneumoniae* and on serodiagnosis. Serotyping of *A. pleuropneumoniae* is essential from the epidemiological standpoint as well as for control programs with the goals of eradication and avoidance of outbreaks of highly virulent types.

Serotype 5 strains received in our laboratory for serotyping have been isolated from pigs with acute pleuropneumonia indicating that they are highly virulent. During last 7 years, serotype 5 strains have become the most prevalent serotype in Canada and USA. Unlike most other serotypes, serotype 5 strains are antigenically quite heterogenous which may cause problem in both serotyping and serodiagnosis.

Persual of literature shows that practically nothing is known about the prevalence of subtypes of serotype 5 in the world. In view of the fact that almost half of clinical strains isolated from pigs that died of acute pleuropneumonia belong to serotype 5, the present studies were undertaken to examine the antigenic heterogeneity among field strains of serotype 5, to develop simple, reliable, rapid and precise techniques for subserotyping of serotype 5 strains and to find out the prevalence of these subserotypes in Quebec.

MATERIALS AND METHODS

A. pleuropneumoniae strains.

Reference strains representing serotypes 1 through 12 of *A. pleuropneumoniae* were 4074 (1a), ISU 158 (1b), S1563 (2), 1421 (3), M62 (4), K17 (5a), L20 (5b), FemØ (6), WF83 (7), 405 (8), CVJ-13261 (9), D13039 (10), 56153 (11) and 8329 (12). However, local field strain 81-750 was routinely used in place of strain L20 as a type strain of subtype 5b because of its increased antigenicity. Capsulated strain J45 of *A. pleuropneumoniae* serotype 5 and its noncapsulated mutant strain (7) were used as controls for characterization of capsular and lipopolysaccharide antigens of reference and field strains. More than 5000 field isolates originating from pulmonary tissues of pigs that had died of acute pleuropneumonia were received from different diagnostic laboratories in Canada. Out of 1806 strains identified as serotype 5, 100 strains selected at random were used for further antigenic characterization. The cultural and biochemical characterization were done according to the method of Biberstein *et al.* (2).

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 (WC) of each strain

standardized to an optical density of 2 or more at 540 nm was divided into two portions. Both portions were kept at 100°C in water bath for 1 h; one portion was referred as boiled whole cell suspension (BC). The second portion was centrifuged at $800 \times g$ for 30 min, the supernatant collected and referred as boiled whole cell saline extract (BC-SE). BC or BC-SE were used for CoA and QCoA tests and BC-SE was used in ID, QID, CIE and IHA tests. Live bacterial cells were used for SSA test. BC-SE was used in CoA test for serotyping autoagglutinating strains.

Extraction of lipopolysaccharides (LPS).

Purification of LPS was done according to the procedure of Johnson and Perry (8) with slight modification. An equal volume of 90% phenol (w/v) preheated at 65°C was used for the extraction of LPS, precipitated with 2 volumes of 95% ethanol and solubilized in distilled water. The material was heated at 100°C for 30 min and designated as LPS antigens. LPS preparation did not contain any residual protein detectable by blue coomassie staining.

Purification of capsular polysaccharides (CPS).

Crude capsular material was extracted using method described by Inzana (6) with some modifications. Cultures in PPLO broth were incubated with constant shaking for 6 h at 37°C and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min to remove the cells. Cells were washed twice in PBS (pH 7.4), and the three supernatants were pooled. Polyanionic material was extracted from the supernatant at 4°C with hexadecyltrimethyl-ammonium bromide (Cetavlon, Lab. Luvabec inc.) added to a 0.1 M concentration. Precipitates

were collected by centrifugation at $10,000 \times g$ for 30 min, and resuspended in 1.0 M NaCl (Biopharm) and held overnight at 4°C . The pellet obtained by centrifugation at $20,000 \times g$ for 10 min was reextracted in 1.0 M NaCl. The solubilized CPS from combined supernatants of the two extractions was precipitated with 2 volumes of cold 95% ethanol at -20°C for two days, collected by centrifugation at $10,000 \times g$ for 30 min at -15°C and solubilized in a minimal volume of distilled water. This material was heated at 100°C for 30 min and designated as crude CPS antigen.

Preparation of hyperimmune sera in rabbits.

Hyperimmune sera were produced in rabbits by repeated inoculations of formalinized whole-cell suspensions (WC) of the reference strains of all the serotypes of *A. pleuropneumoniae* as described by Mittal *et al.* (16).

Adsorption of antisera.

Samples of rabbit hyperimmune sera against WC antigens of subtypes 5a and 5b were adsorbed with an equal volume of 10% suspension of WC antigens of heterologous subtype in PBS. The mixtures were kept at 37°C for 1 h and centrifuged at $800 \times g$ for 30 min. Two subsequent adsorptions were done in the same way. The sera were tested before and after adsorption for antibodies against homologous and heterologous subtypes by ID and IHA tests.

Serological tests.

Coagglutination (CoA) test. The details of the preparation of CoA reagents and the procedure of the CoA test have been described earlier by Mittal *et al.* (18). 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 the preparation of CoA reagents. One drop of the CoA reagent was mixed with an equal volume of BC or BC-SE. A positive reaction was characterized by a distinct clumping, recorded within 2 to 3 min and scored on 0 to 4+ basis depending on the rapidity and intensity of the reaction.

Counterimmunoelectrophoresis (CIE) test. CIE test was carried out as described by Mittal *et al.* (14). Cathodal and anodal wells were filled with BC-SE antigens and antisera respectively. Juxtaposed sheets of filter paper were used as connecting wicks to the tampon. The antigens and antisera were electrophoresed for 60 min at 80 V and the reactivity was expressed as visible precipitation lines.

Immunodiffusion (ID) test. A 2-dimensional immunodiffusion method of Ouchterlony was carried out as described by Mittal *et al.* (19) in small plastic Petri plates containing 1% agar noble (Difco) buffered with PBS. Reagent wells were 2 mm deep and 5 mm in diameter. Plates were incubated at room temperature in a water-saturated atmosphere, and were read daily for 2 days for the presence of precipitation line.

Indirect haemagglutination (IHA) test. IHA test was performed with a Microtiter system (Dynatech Lab. Inc.). Pellet of sheep red blood cell washed 3 times with PBS were sensitized directly with soluble antigens for 1 h at 37°C and washed 3 times with PBS followed by a resuspension in PBS. The details of IHA test have been described previously by Mittal *et al.* (17).

Quantitative CoA (QCoA) test. Serial twofold dilutions of BC-SE beginning at 1:2 to 1:512 were prepared in PBS. Using the same procedure of CoA test, the titer of the antigen was determined to be the reciprocal of the highest dilution of the antigen showing a 2+ reaction (20).

Quantitative ID (QID) test. Serial twofold dilutions of BC-SE beginning at 1:2 to 1:512 were prepared in PBS containing 0.01% sodium azide. Using the same procedure of ID test, the reciprocal of the highest dilution of the antigen giving clearly visible precipitation lines was considered to be the titer of the antigen present (20).

SDS-PAGE and immunoblot analysis. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to the method of Laemmli (12). The antigens of reference and field strains were solubilized in 10% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.5 M trisbase (pH 6.8) and 1% bromophenol blue, and heated at 100°C for 30 min. Samples were stacked in 4.5% acrylamide (100 V; constant voltage) and separated by using 12.5% acrylamide (200 V; constant voltage). Minigels were stained with Coomassie blue for proteins and with silver nitrate for lipopolysaccharides as described by Tsai and Frasch (39). Polysaccharides were stained using the periodate-Schiff procedure as described by Fairbanks *et al.* (3). After SDS-PAGE, separated material was transferred to nitrocellulose membrane (0.45 µm;

Bio-Rad) for Western blotting (38). Non-specific sites on the nitrocellulose paper were blocked with a 2% (w/v) casein-tris solution for 1 h at room temperature followed by incubation with rabbit antiserum for 2 h. The washed membranes were incubated with an optimal dilution of anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Bio Rad) in Tris-saline buffer at room temperature for 2 h. The blots were rinsed 3 times with Tris-saline and exposed to 4-chloro-1-naphthol substrate (Sigma) for 1-5 min. The reaction was stopped in distilled water and the reactivity was expressed as a visible coloured band and compared to the molecular-mass protein standards used in both analysis.

Serum soft agar (SSA) test. Colonial morphology in SSA test was determined according to the method of Yoshida (40). One drop of live bacterial suspension of reference and field strains containing about 10^5 colony forming units was added to PPLO broth containing optimally diluted hyperimmune sera against subtypes 5a and 5b strains and mixed with 0.15% bacteriological agar and incubated overnight at 37°C. Soft agar medium, normal rabbit serum and rabbit hyperimmune sera against other serotypes were used as controls. Conversion of diffuse mucoid type colonies (as in controls) to compact type colonies in the presence of type-specific antiserum was considered as a positive reaction.

RESULTS

1. Subserotyping of *A. pleuropneumoniae* serotype 5 strains and their prevalence in Quebec.

1.1 Serological reactivity of *A. pleuropneumoniae* reference strains of subserotypes 5a and 5b with rabbit hyperimmune sera against all the known serotypes of *A. pleuropneumoniae*. Results shown in Table 1 indicate that both subtypes of serotype 5 reference strains showed some cross reactivity with other serotypes using BC or its saline extract (BC-SE) in CoA test but not in ID, CIE and IHA tests. Using live cultures, both subserotypes 5a and 5b also did not show any evidence of cross reactivity with other serotypes in SSA test. Both subserotypes 5a and 5b strains shared common antigens with each other in all the serological tests used.

1.2 Results of subserotyping of *A. pleuropneumoniae* reference and field strains of subserotypes 5a and 5b using rabbit hyperimmune sera against subtypes 5a and 5b strains. Results in Table 2 indicate that both reference and 100 field strains of serotype 5 selected at random were easily classified in 2 subgroups using QCoA and IHA tests. Subtype 5a strains showed some evidence of mild cross reactivity with subtype 5b in all the tests used. However, subtype 5b strains reacted almost equally well in both QCoA and IHA tests with hyperimmune sera against both subtypes. Using QID test, both subserotypes showed equal antigen titers with both homologous and heterologous antisera but the intensity of precipitation line was much stronger with their corresponding homologous antisera.

1.3 Results of subserotyping of *A. pleuropneumoniae* reference and field strains of subserotypes 5a and 5b using rabbit hyperimmune sera adsorbed with heterologous antigens in IHA test. Antisera against *A. pleuropneumoniae* subserotypes 5a and 5b adsorbed with their heterologous antigens reacted only with their respective homologous strains of both reference and all the 24 field strains of subtype 5a and 65 strains of subtype 5b tested. However, 11 field strains of subtype 5b continued to react with heterologous antiserum (anti-K17) even after adsorption with strains 81-750 or L20 of subtype 5b (Table 3). These strains have been labelled as atypical strains.

1.4 Prevalence of *A. pleuropneumoniae* serotype 5 strains in relation to the prevalence of other serotypes isolated from acute cases of porcine pleuropneumonia in Quebec. As shown in Table 4, percentage distribution of different serotypes in Quebec varied considerably during the last 20 years. Subserotyping of *A. pleuropneumoniae* serotype 5 strains was initiated in 1990 in our laboratory. During the period from 1980 to 1992, serotype 1 was the most prevalent followed by serotypes 5 and 7. However, since 1993 until now, serotype 5 has replaced serotype 1 as the most dominant serotype and during the last 5 years, serotype 7 has become the second most prevalent. Among serotype 5 strains, subtype 5b has always been the dominant subgroup over 5a in Quebec except in the year 1991.

2. Implication of outer membrane proteins (OMP), lipopolysaccharides (LPS) and capsular polysaccharides (CPS) antigens in subserotyping of serotype 5 strains.

2.1 Serological reactivity of *A. pleuropneumoniae* capsulated strain J45 of serotype 5 and its noncapsulated mutant using rabbit hyperimmune sera against subtypes 5a and 5b strains in IHA, QID and SSA tests. Both capsulated and noncapsulated strains of serotype 5 reacted in both hyperimmune sera in IHA test. However, unlike capsulated strain J45, noncapsulated mutant strain failed to show any reactivity in QID and SSA tests in both antisera. The presence of CPS antigens in the capsulated strain J45 and its absence in the noncapsulated mutant strain J45 as shown by QID test was confirmed by the results of SSA test. Unlike capsulated strain, noncapsulated mutant strain failed to show mucoid colonies in the soft agar medium containing normal rabbit serum indicating the absence of capsule. SSA test was able to differentiate serotype 5 strains from those of other serotypes. However, this test did not differentiate between 5a and 5b (Table 5).

2.2 SDS-PAGE and immunoblot using whole cell suspension as antigen and hyperimmune sera against 5a and 5b strains. SDS-PAGE and immunoblot analysis did not show any difference in the profile of major OMP of reference and field strains of both subserotypes 5a and 5b (results not shown).

2.3 Immunodiffusion and immunoblot using crude CPS extract as antigen and hyperimmune sera against 5a and 5b strains. Both reference and field strains of subtype 5a showed 5a specific and common antigen for both 5a and 5b using purified capsular antigen in both ID and immunoblot assays. Similar results were obtained for subtype 5b strains in both the tests (results not shown).

2.4 Immunodiffusion and immunoblot using LPS extract as antigen and hyperimmune sera against 5a and 5b strains. LPS extract of both 5a and 5b reference and field strains reacted in ID test against both homologous and heterologous antisera (results not shown). Results of immunoblot showed that both typical and atypical strains of 5b but not of 5a showed a band in the region of about 106 kDa with antisera against both 5a and 5b strains. This band disappeared completely among typical but not in atypical subtype 5b strains when anti-K17 adsorbed with reference subtype 5b strain was used in immunoblot (Figure 1).

DISCUSSION

Porcine pleuropneumonia has been reported in most countries where the pig industry is important. When the disease occurs in acute form in non immune herds, it causes high mortality. The chronic form of the infection also causes significant economic loss. Thus, the precise identification of serotype 5 strains becomes extremely important especially in view of the fact that serotype 5 has now become as the most dominant serotype causing clinical disease in Canada and USA (15, 35), and that serotype 5 is considered as one of the most virulent serotypes among all the known 12 serotypes (10). Thus a more detailed knowledge of various antigenic components of serotype 5 is essential for devising a more precise serotyping scheme for serotype 5, for future development of better serodiagnostic methods, and more effective vaccines.

As shown in Table 1, serotype 5 strains showed some cross reactivity with other serotypes in CoA test but not in other tests. However, serotype 5 strains were not antigenically homogenous. The field strains of serotype 5 were clearly divisible into 2 subtypes 5a and 5b (Tables 2 and 3). Tests being used for subclassification of serotype 5 strains were CoA, QCoA, ID, QID, CIE and IHA. Results shown in Tables 1, 2 and 3 provide strong evidence for the presence of common antigens among strains of serotype 5. However, results of quantitative assays and cross adsorption studies clearly indicated the presence of 2 major subtypes (5a and 5b). Using a variety of quantitative serological tests involving both particulate and soluble antigens, attempts were made to investigate if the cross reactivity between subserotypes 5a and 5b could be abolished or partially reduced. Results obtained with reference strains indicate that cell associated particulate antigens may be sharing more cross reactive epitopes than cell free soluble antigens. Cell suspension may contain some more cell wall associated epitopes of proteinic and lipopolysaccharidic nature dispersed among capsular antigens. Whereas cell free saline extracted soluble antigens may be mainly of polysaccharidic capsular origin. Potent serotype specific antigens were present as freely diffusible material on the surface layer

of the bacterial cells and could easily be removed by washing cells in saline solution. Thus keeping in view the nature of type specific antigens, BC-SE was employed as the antigen of choice for most of the serological tests used in this study.

A number of serological tests involving both heat labile and heat stable antigens as well as whole bacterial suspensions or their saline extracts have been used by different workers in different countries for serotyping of *A. pleuropneumoniae*. Out of several techniques used for serotyping, it appears that slide agglutination test is the most commonly used method for routine serotyping because it is simple and easy to perform (9, 11, 16, 30, 32, 36).

A. pleuropneumoniae strains of serotype 5 were identified for the first time by Gunnarsson et al (4) by whole cell agglutination test using rabbit antisera. Nielsen (28) studied the antigenic properties of serotype 5 strains by means of slide agglutination, indirect haemagglutination and gel diffusion tests and divided serotype 5 strains into 2 subtypes, 5a and 5b based on subtype specific capsular antigenic determinants of polysaccharide nature. The cross reactivity between subserotypes 5a and 5b was eliminated by using cross adsorbed sera (28).

Cross reactivity among subserotypes 5a and 5b may be caused by some heat labile and heat stable antigens and their corresponding antibodies of mainly IgM type. Cross reactivity due to heat labile antigens and corresponding IgM antibodies present in rabbit antisera could easily be abolished by using boiled cell suspension or their extracts in CoA test. CoA test developed in our laboratory (18) is currently used by various workers in different countries. It is preferred over agglutination test because of its increased sensitivity and specificity associated with involvement of IgG antibodies only. Besides, auto agglutinating, non agglutinating and polyagglutinating strains which can not be serotyped by agglutination test could easily be typed by CoA test using their BC-SE as antigens. However, in the present studies, CoA test was not found completely free of

problems as cross reactions were observed not only between 5a and 5b but also between serotype 5 and some other serotypes. ID and CIE tests are routinely used for serotyping *A. pleuropneumoniae* because of their specificities. However, none of these tests were able to clearly distinguish between subserotypes 5a and 5b.

In view of the inability of CoA, ID and IHA tests to clearly distinguish between 5a and 5b, QCoA and QID tests were used and found to be highly satisfactory to precisely identify both subtypes. IHA test identified both subtypes correctly by using cross adsorbed rabbit hyperimmune sera against 5a and 5b. Both reference and field strains of subserotype 5a were positive only with homologous antiserum; whereas some field strains of subserotype 5b were not completely negative with heterologous antiserum. These results strongly indicate the existence of atypical strains of subtype 5b based on LPS associated epitopes.

SSA assay was found to be a suitable serological test to characterize the 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 such as CoA, ID, CIE and IHA (37). Although SSA assay was found to be highly specific for detecting type specific antigens, it failed to differentiate between 2 subtypes of serotype 5. These results clearly give evidence for the presence of cross reactive common epitopes present on the most superficially located capsular antigens of subserotypes 5a and 5b.

In order to study the respective roles of CPS and LPS antigens in type specific reactivity, capsulated serotype 5 strain J45 and its noncapsulated mutant strain were used in IHA, QID and SSA tests (Table 5). Results obtained strongly support the findings of Nielsen (28) who demonstrated that subserotypes 5a and 5b share common antigenic determinants located in the capsular polysaccharides as well as cell wall lipopolysaccharides. Capsular polysaccharides also bear some specific determinants

either for subtype 5a or 5b. More recently, Altman *et al* (1) described the chemical composition of capsular polysaccharides for subtype 5a which are a repeating disaccharide units of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose and 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid residues. The type 5b capsular polysaccharides have the same basic structure in which the 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid residues are substituted at O-4 by β -glucopyranosyl units. Results shown in Table 5 demonstrate that besides capsular polysaccharide antigens, which may be the principal sensitizing substance for erythrocytes, LPS also seems to be implicated in IHA test. Results of capsulated and noncapsulated mutant strains in QID test clearly show that precipitation line that appears within 24 hours in gels as an intense straight line between antigen and antiserum wells is characteristic of capsular antigen. Whereas precipitation line for LPS appears within 2-3 days as an intense curved line near the antigen well.

Although, in most cases, it is not difficult to identify serotype and subserotype-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 and subserotype-specific antigens.

Currently used serological tests are specific and sensitive to identify subtype-specific antigens of serotype 5 but may give confusing results for subserotyping some atypical strains. In such cases, it is recommended to use Western blot assay as a confirmatory test to identify subserotype-specific and cross reacting common antigens.

Persual of literature shows that there are not many laboratories in the world where subserotyping of serotype 5 is carried out routinely. Findings of significantly dominant prevalence of subserotype 5b over serotype 5a would immensely influence the future development of various serodiagnostic tools and vaccines used to control porcine

pleuropneumonia due to *A. pleuropneumoniae* serotype 5 which is now the most prevalent serotype in Quebec.

Acknowledgements

We gratefully thank Suzanne Bourdon for excellent technical help, and Dr Mario Jacques for supply of capsulated J45 and noncapsulated mutant J45 strains of Dr Inzana.

REFERENCES

1. **Altman, E., D. W. Griffith, and M. B. Perry.** 1990. Structural of the O-chains of the lipopolysaccharides produced by strains of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Biochem. Cell Biol.* **68**:1268-1271.
2. **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.
3. **Fairbanks, G., T. L. Steck, and D. F. H. Wallach.** 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of human erythrocyte membrane. *Biochem.* **10**:2606-2617.
4. **Gunnarsson, A., E. L. Biberstein, and B. Hurvell.** 1977. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae)*: Agglutination reactions. *Am. J. Vet. Res.* **38**:1111-1114.
5. **Hommez, J., L. A. Devriese, F. Castryck, and P. Cassimon.** 1990. Slide precipitation, a simple method to type *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* **24**:123-126.
6. **Inzana, T. J.** 1987. Purification and partial characterization of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **55**:1573-1579.
7. **Inzana, T. J., J. Todd, and H. P. Veit.** 1993. Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infect. Immun.* **61**:1682-1686.

8. **Johnson, K. G., and M. B. Perry.** 1976. Improved techniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharides. *Can. J. Microbiol.* **22**:29-34.
9. **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 1 and (proposed) serotype 9. *Vet. Microbiol.* **13**:249-257.
10. **Komal, J. P. S., and K. R. Mittal.** 1990. Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 through 12 on the basis of their virulence in mice. *Vet. Microbiol.* **25**:229-240.
11. **Kume, K., I. Nagano, and T. Nakai.** 1986. Bacteriological, serological and pathological examination of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in 200 slaughtered pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.* **48**:965-970.
12. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London).* **227**:680-685
13. **Mittal, K. R., and S. Bourdon.** 1991. Cross-reactivity and antigenic heterogeneity among *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 4 and 7. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1344-1347.
14. **Mittal, K. R., S. Bourdon, and M. Berrouard.** 1993a. 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.

15. **Mittal, K. R., S. Bourdon, et R. Higgins.** 1998. Évolution de la distribution des différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* provenant des porcs malades au Québec. *Méd. Vét. Québec.* **28**:91-92.
16. **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.
17. **Mittal, K. R., R. Higgins, and S. Larivière.** 1983a. Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect haemagglutination test. *J. Clin. Microbiol.* **17**:787-790.
18. **Mittal, K. R., R. Higgins, and S. Larivière.** 1983b. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination tests. *J. Clin. Microbiol.* **18**:1351-1354.
19. **Mittal, K. R., R. Higgins, and S. Larivière.** 1988a. Some serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 through 5. *Current Microbiol.* **17**:305-313.
20. **Mittal, K. R., R. Higgins, and S. Larivière.** 1988b. Quantitation of serotype-specific and cross-reacting group-specific antigens by coagglutination and immunodiffusion tests for differentiating *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains belonging to cross-reacting serotypes 3, 6, and 8. *J. Clin. Microbiol.* **26**:985-989.

21. **Mittal, K. R., R. Higgins, S. Larivière, and G. -P. Martineau.** 1987. Effect of heat treatment on the surface antigens of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates. *Vet. Rec.* **120**:62-65.
22. **Mittal, K. R., E. M. Kamp, and M. Kobisch.** 1993b. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains 1, 9 and 11. *Res. Vet. Sci.* **55**:179-184.
23. **Nicolet, J.** 1971. Sur l'hémophilose du porc. III. Différenciation sérologique de *Haemophilus paraphaemolyticus*. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* **216**:487-495.
24. **Nicolet, J.** 1988. Taxonomy and serological identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.* **29**:578-580.
25. **Nielsen, R.** 1982. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. Ph.D. thesis. Copenhagen, Denmark.
26. **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.
27. **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.
28. **Nielsen, R.** 1986a. Serology of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtypes a and b. *Acta Vet. Scand.* **27**:49-58.

29. **Nielsen, R.** 1986b. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet. Scand.* **27**:453-455.
30. **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.
31. **Piffer, I. A., G. R. Carter, and A. A. F. Botovchenco.** 1986. Identification of serotypes of *Haemophilus pleuropneumoniae* by counterimmunoelectrophoresis. *Vet. Res.* **118**:292-294.
32. **Rapp, V. J., R. F. Ross, and B. Z. Erickson.** 1985. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody tests in swine. *Am. J. Vet. Res.* **46**:185-192.
33. **Rika, A. V. J., M. H. Mulks, and B. J. Thacker.** 1994. Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet. Microbiol.* **38**:329-349.
34. **Rosendal, S., and D. A. Boyd.** 1982. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. *J. Clin. Microbiol.* **16**:840-843.
35. **Rycroft, A. N., and L. H. Garside.** 2000. *Actinobacillus* species and their role in animal disease. *The Veterinary Journal.* **159**:18-36.
36. **Schultz, R. A., R. F. Ross, A. Gunnarson, and R. Nielsen.** 1983. Serotyping 50 different isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* from swine pneumonia in Iowa and surrounding states. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* **78**:1451-1453.

37. **Tadjine, M., and K. R. Mittal.** 2001. Study of antigenic heterogeneity among *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 strains. *Vet. Microbiol.* **78**:49-60.
38. **Towbin, H. T., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**:4350-4354.
39. **Tsai, C. M., and C. E. Frasch.** 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**:115-119.
40. **Yoshida, K.** 1971. Demonstration of serologically different capsular types among strains of *Staphylococcus aureus* by the serum-soft agar technique. *Infect. Immun.* **3**:535-539.

TABLE 1. Serological reactivity of *A. pleuropneumoniae* reference strains of subserotypes 5a and 5b with rabbit hyperimmune sera against all the known serotypes of *A. pleuropneumoniae*.

Reference strains	Tests used	Rabbit hyperimmune sera against serotypes												
		1	2	3	4	5a	5b	6	7	8	9	10	11	12
K17 (5a)	CoA	-	-	+	-	4+	2+	+	-	-	+	-	-	+
	ID	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	CIE	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	IHA*	-	-	-	-	3200	400	-	-	-	-	-	-	-
	SSA	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
81-750 (5b)	CoA	-	-	+	-	4+	4+	+	-	-	+	+	-	+
	ID	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	CIE	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	IHA*	-	-	-	-	1600	6400	-	-	-	-	-	-	-
	SSA	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+, positive reaction; ±, weak reaction; -, negative reaction; * Antibody titer.

+ to 4+, intensity of the reaction in CoA test .

TABLE 2. Results of subserotyping of *A. pleuropneumoniae* reference and field strains of subserotypes 5a and 5b using rabbit hyperimmune sera against subtypes 5a and 5b strains.

Strains	Tests used	Rabbit hyperimmune sera against serotypes	
		5a	5b
Reference strain of 5a	QCoA ^a	512	32
	QID ^b	32	32 ^w
	IHA ^c	3200	400
Reference strain of 5b	QCoA	512	512
	QID	32 ^w	32
	IHA	1600	6400
Field strains of 5a (n = 24)	QCoA	≥ 128	≤ 16
	QID	32	32 ^w
	IHA	≥ 1600	≤ 400
Field strains of 5b (n = 76)	QCoA	512	512
	QID	32 ^w	32
	IHA	≥ 1600	≥ 1600

^{a, b} Antigen titer; ^c Antibody titer; ^w Weak precipitation line.

TABLE 3. Results of subserotyping of *A. pleuropneumoniae* reference and field strains of subserotypes 5a and 5b using rabbit hyperimmune sera adsorbed with heterologous antigens in IHA test.

Strains	Antibody titers in rabbit hyperimmune sera against subserotype			
	5a	5b	5a adsorbed with 5b	5b adsorbed with 5a
Reference strain of 5a	3200	400	1600	0
Reference strain of 5b	1600	6400	0	1600
Field strains of 5a (n = 24)	≥ 1600	≤ 400	≥ 400	0
Field strains of 5b (Typical 5b) (n = 76) n = 65	≥ 1600	≥ 1600	0	≥ 800
(Atypical 5b) n = 11	≥ 1600	≥ 1600	≥ 400	≥ 800

0, antibody titer < 100.

TABLE 4. Prevalence of *A. pleuropneumoniae* serotype 5 strains in relation to the prevalence of other serotypes isolated from acute cases of porcine pleuropneumonia in Quebec.

Years	Number of isolates	Percentage of different serotypes					
		1	5*			7	Others
			Total	5a	5b		
1980	295	87	11			0	2
1983	169	69	25			4	2
1984	466	84	9			4	3
1985	390	71	19			5	5
1986	300	60	30			5	5
1987	367	53	26			5	16
1988	402	55	30			5	10
1989	444	61	29			4	6
1990	473	60	26	35	65	8	6
1991	463	50	33	54	46	10	7
1992	317	40	38	25	75	17	5
1993	260	30	44	27	73	12	14
1994	255	37	45	22	78	15	3
1995	303	28	52	17	83	14	6
1996	215	22	51	15	85	24	3
1997	190	20	44	17	83	32	4
1998	157	14	43	18	82	31	12
1999	135	15	33	7	93	35	17
2000	117	13	42	8	92	32	13

* Subserotyping of serotype 5 strains was initiated only in the year 1990.

TABLE 5. Serological reactivity of *A. pleuropneumoniae* capsulated strain J45 of serotype 5 and its noncapsulated mutant using rabbit hyperimmune sera against subtypes 5a and 5b strains in IHA, QID and SSA tests.

Tests used	Strains	Antisera against	Titers							
			100	200	400	800	1600	3200	C	
IHA ^a	J45 (capsulated)	5a	4+	4+	4+	4+	-	-	-	
		5b	4+	4+	-	-	-	-	-	
	J45 (noncapsulated mutant)	5a	2+	2+	2+	2+	-	-	-	
		5b	2+	2+	-	-	-	-	-	
	QID ^b	J45 (capsulated)	5a	2	4	8	16	32	64	C
			5b	±	±	±	±	±	-	-
J45 (noncapsulated mutant)		5a	-	-	-	-	-	-	-	
		5b	-	-	-	-	-	-	-	
SSA ^c		J45 (capsulated)	5a	+	+	+	-	-	-	- (d)
			5b	+	+	+	-	-	-	- (d)
	J45 (noncapsulated mutant)	5a	-	-	-	-	-	-	- (c)	
		5b	-	-	-	-	-	-	- (c)	

^{a, c}Antibody titer; ^bAntigen titer; C, control.

+, positive reaction; -, negative reaction; ±, weak precipitation line.

+ to 4+, intensity of the reaction in IHA test.

In SSA test: +, conversion of mucoid colonies to compact colonies in the presence of antiserum; (c), compact colonies; (d), diffuse mucoid colonies.

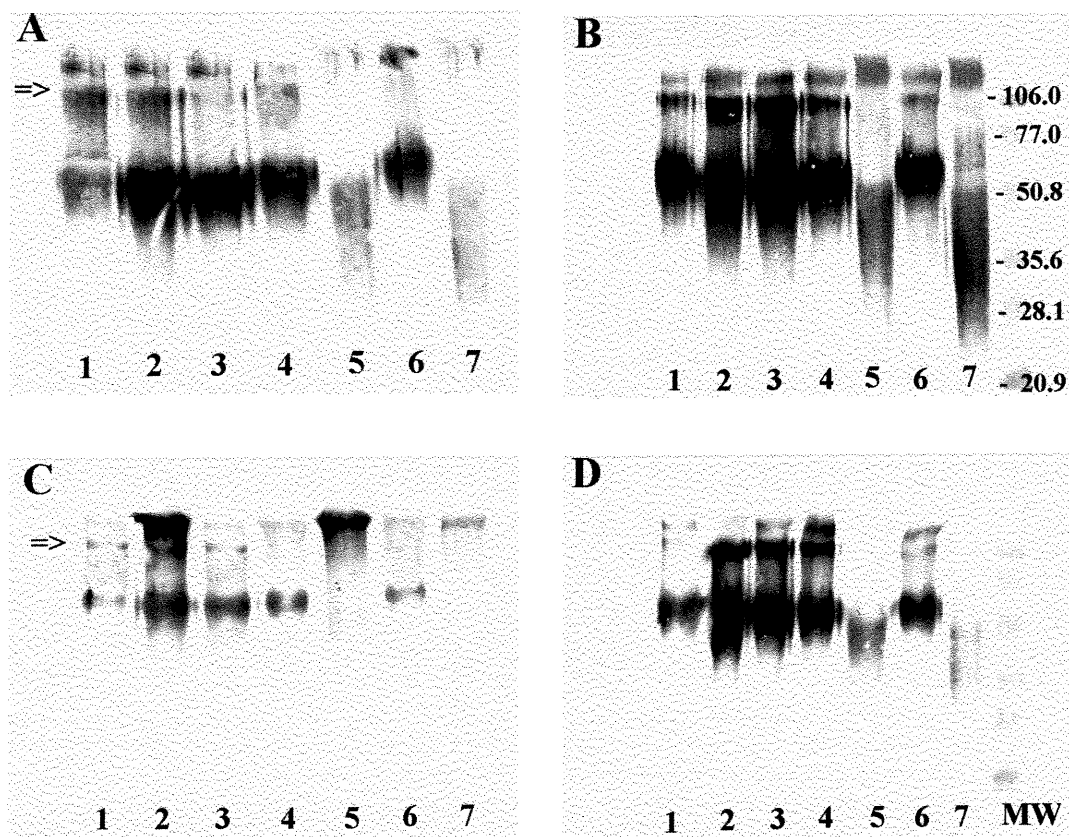


FIG. 1. Immunoblots using LPS extract as antigen and hyperimmune sera against serotypes 5a and 5b strains. A, rabbit anti-K17; B, rabbit anti-81-750; C, rabbit anti-K17 adsorbed with strain 81-750; D, rabbit anti-81-750 adsorbed with strain K17; Lanes: 1-3, atypical 5b strains in IHA test; 4, typical 5b strain in IHA test; 5, 5a strain; 6, 5b reference strain 81-750; 7, 5a reference strain K17; Molecular weight standards (MW in kilodaltons) are indicated on the right of immunoblot B.

IV- Discussion et conclusions

La pleuropneumonie contagieuse du porc est une infection à incidence économique importante, que l'on doit combattre. Elle a été rapportée dans la plupart des pays où la production porcine est industrialisée. La maladie sous sa forme aiguë cause une forte mortalité chez les troupeaux non immunisés. La forme chronique est à l'origine des pertes économiques énormes.

Face à la diversité d'espèces bactériennes pathogènes capables de coloniser les mêmes sites anatomiques et de causer des symptômes identiques, l'identification de l'espèce en cause, et la détermination du sérotype et du sous-type selon les cas sont indispensables à la compréhension de l'épidémiologie d'une infection.

La caractérisation antigénique permet la connaissance des relations antigéniques nécessaires à l'établissement d'un diagnostic précis, à l'étude épidémiologique et à la mise au point des moyens de lutte tels que la production des vaccins.

Le sérotype 5, considéré comme un des sérotypes les plus virulents (Komal et Mittal, 1990), est depuis 1993, le sérotype prédominant dans les cas cliniques de pleuropneumonie porcine au Québec (Mittal *et al.*, 1998). Parfois, une combinaison de deux ou de plusieurs tests sérologiques est nécessaire pour identifier certaines souches correctement. Dans le but de s'assurer d'un schéma d'identification précise des souches du sérotype 5 et le cas échéant d'en établir, il devenait donc important d'examiner l'hétérogénéité antigénique parmi les souches de champ de ce sérotype isolées au Québec.

Les résultats du Tableau 1 ont montré que les souches du sérotype 5 sont antigéniquement hétérogènes et qu'il existe des réactions croisées causées par des antigènes communs partagés entre ce sérotype 5 et d'autres sérotypes de cette espèce. L'évidence de la présence des antigènes communs et spécifiques entre les souches des

sous-types 5a et 5b a été également confirmée par les résultats des tableaux 2 et 3. Les réactions croisées avec les autres sérotypes ainsi constatées en CoA n'ont pas été observées avec les tests de CIE, ID, IHA et SSA

Dans les Tableaux 1, 2 et 3, les souches de champ du sérotype 5 ont été clairement divisées en deux sous-types majeurs 5a et 5b par tous les tests utilisés; à l'exception du test de SSA. Cependant, toutes ces techniques retenues pour cette investigation présentent chacune, certains désavantages tels que le temps d'exécution ou le coût des réactifs nécessaires.

De nombreux tests sérologiques impliquant aussi bien les antigènes thermolabiles que thermostables sont utilisés par différents chercheurs à travers le monde pour le sérotypage des souches d'*A. pleuropneumoniae*. Le test d'agglutination sur lame semble être le plus communément employé pour le sérotypage de routine, à cause de sa simplicité (Mittal *et al.*, 1982; Schultz *et al.*, 1983; Nielsen et O'Connor, 1984; Rapp *et al.*, 1985; Kume *et al.*, 1986; Kamp *et al.*, 1987).

Les tests de CIE et ID sont fréquemment employés en sérotypage de routine d'*A. pleuropneumoniae*. Les résultats observés avec ces tests démontrent que les antigènes spécifiques au sérotype sont capables de diffuser librement dans un gel. Ceux-ci sont donc présents à la surface de la cellule bactérienne et peuvent être facilement recueillis par des lavages avec une solution saline. L'extrait salin (BC-SE) a donc été employé comme antigène de choix dans la plupart des tests sérologiques utilisés dans cette étude. Aucune de ces deux méthodes n'a pu discriminer de façon stricte (élimination de la réactivité croisée) les souches de 5a de celles de 5b.

A cause de l'incapacité des tests de CoA, ID, CIE et IHA à fournir une discrimination stricte entre les souches des sous-types 5a et 5b, et pour vérifier si la réactivité croisée entre les souches de ces deux sous-types pouvait être totalement

éliminée ou partiellement réduite, les tests de CoA et d'ID quantitatives (QCoA, QID) ont été exploités en utilisant les antigènes aussi bien particuliers que solubles, en présence des antisérums adsorbés et non adsorbés. Les résultats obtenus avec les souches de référence tout comme avec celles de champ ont permis de constater que les antigènes particuliers possèdent plus d'épitopes communs que les antigènes solubles. Ces épitopes communs seraient plus associés aux antigènes de nature protéinique et lipopolysaccharidique dispersés parmi les antigènes capsulaires. Par contre, les antigènes solubles seraient en majorité d'origine capsulaire. Les tests quantitatifs se sont avérés plus satisfaisants que les techniques de coagglutination et d'immunodiffusion simples.

Le sérotype 5 a été décrit pour la première fois par Gunnarsson *et al.* (1977) au moyen de l'agglutination de cellules entières en présence d'antisérums de lapin. La subdivision des souches de ce sérotype en sous-types 5a et 5b sur la base des déterminants antigéniques polysaccharidiques capsulaires spécifiques à chaque sous-type a été rapportée par Nielsen (1986a). Grâce à l'adsorption croisée des antisérums, il a pu éliminer la réactivité croisée entre les souches de 5a et celles de 5b. Cette réactivité croisée est souvent causée par les antigènes thermolabiles et thermostables et leurs anticorps spécifiques de type IgM. Elle peut être facilement éliminée par le test de CoA développé dans notre laboratoire (Mittal *et al.*, 1983b). Ce dernier est préféré au test d'agglutination sur lame à cause de sa grande sensibilité et de sa spécificité associées à la présence des immunoglobulines G (IgG), qui sont les seuls anticorps impliqués dans cette méthode. Mais aussi à cause de l'incapacité du test d'agglutination à permettre le sérotypage des souches auto-agglutinantes, non agglutinantes et polyagglutinantes. Cependant, cette technique a présenté des défaillances telles que les réactions croisées observées non seulement entre les 2 sous-types mais aussi et surtout entre le sérotype 5 et d'autres sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*.

L'IHA est reconnue pour sa sensibilité et sa capacité à détecter l'antigène spécifique au sérotype, en éliminant la majorité des réactions croisées

(Mittal *et al.*, 1983a). Cette méthode par contre, au moyen des antisérums spécifiques adsorbés de façon hétérologue, en plus de fournir une identification stricte (élimination de la réactivité croisée) des souches du sous-type 5a, elle a permis de constater que les souches de champ identifiées comme 5b avec les antisérums non adsorbés, peuvent être subdivisées en 2 groupes, selon une réactivité typique (identification stricte) ou atypique à celle de la souche de référence 81-750 employée dans cette investigation, avec l'anti-K17 adsorbé aussi bien avec la souche 81-750 qu'avec la souche L20 (Tableau 3).

Tadjine et Mittal (2001) rapportent que le test de SSA a été satisfaisant pour la caractérisation des antigènes superficiels localisés à la surface de la bactérie plutôt vivante, contrairement à la suspension des bactéries tuées ou à l'extrait salin utilisés en routine dans les tests sérologiques conventionnels comme la CoA, l'ID, la CIE et l'IHA. Cette technique n'a pas permis la distinction entre les souches de 5a et 5b (Annexe 3). Cet échec a par contre démontré clairement l'évidence de la présence des épitopes superficiels communs entre les deux sous-types.

Le sérotypage est basé sur l'identification et la caractérisation des antigènes. Les souches du sérotype 5 ont présenté des profils identiques des protéines de la membrane externe en SDS-PAGE (Annexe 1). Pour étudier les rôles des PSC et des LPS dans la réactivité spécifique de chaque sous-type, nous avons soumis la souche capsulée J45 et son mutant non capsulé du sérotype 5 (Inzana *et al.*, 1993) aux tests d'IHA, de QID et de SSA. Les résultats obtenus présentés dans le Tableau 5 ont confirmé ceux de Nielsen (1986a) qui a rapporté que les souches des sous-types 5a et 5b possèdent non seulement des déterminants antigéniques polysaccharidiques capsulaires et lipopolysaccharidiques communs, mais aussi des épitopes polysaccharidiques capsulaires spécifiques au sous-type 5a ou 5b. Ces mêmes résultats ont corroboré également ceux de Altman *et al.* (1990) qui ont décrit une identité partielle entre la composition chimique

des polysaccharides capsulaires des sous-types 5a et 5b. Cette identité partielle a été observée en ID (Annexe 2).

Les antigènes capsulaires sont considérés comme étant les principaux antigènes impliqués en IHA (Mittal *et al.*, 1983a; Nielsen, 1986a). La réactivité du mutant J45 en IHA a permis de démontrer que les LPS contenus dans l'extrait salin participent aussi à la sensibilisation des globules rouges de mouton utilisés dans cette technique. Et que les souches des sous-types 5a et 5b possèdent non seulement des déterminants antigéniques capsulaires spécifiques à chaque sous-type, mais aussi des épitopes associés aux lipopolysaccharidiques spécifiques au sous-type 5a ou 5b. Ces mêmes résultats ont été obtenus avec les LPS purifiés. Mais les PSC purifiés ont causé une hémolyse totale des érythrocytes qui n'a pas permis la comparaison. La spécificité antigénique observée au niveau des épitopes associés aux LPS, a confirmé l'identité partielle rapportée par Altman *et al.* (1990) entre les structures des chaînes O des LPS des souches K17 (5a) et 81-750 (5b).

Selon Nielsen (1986a), en présence d'antisérums spécifiques en ID, les PSC donnent une ligne de précipitation droite et intense entre les puits des antigènes et de l'antisérum, alors que celle des LPS est courbée et très proche du puits des antigènes. Sur la base de cette interprétation, nous avons constaté que la réactivité des souches de référence et de champ de chaque sous-type ne donnait que la ligne de précipitation des LPS avec l'antisérum hétérologue adsorbé (Annexe 2). La réactivité atypique de certaines souches de champ du sous-type 5b observée en IHA avec les antisérums spécifiques adsorbés a été confirmée par immunobuvardage avec les LPS purifiés uniquement (Figure 1). Ces observations sont plutôt en faveur d'une réactivité atypique causée par des épitopes associés aux LPS et non pas par ceux des PSC. Ces épitopes non observés chez les souches du sous-type 5a dans la région approximativement de 106 kDa (Figure 1), seraient donc des déterminants antigéniques d'une part mineurs chez

certaines souches de champ et de référence du sous-type 5b, et d'autre part des épitopes dominants reconnus par l'anti-K17 adsorbé, chez d'autres souches de champ de type 5b.

Il devient donc possible face à cette nouvelle observation, dans le cas du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae*, d'obtenir un sérotypage des souches non capsulées, donc non typables par d'autres méthodes, en utilisant le test d'IHA qui permet une différenciation des souches basée sur des épitopes communs et spécifiques associés aux LPS. D'après les résultats obtenus, l'immunobuvardage (Western blot) doit être utilisé comme test de confirmation pour toute identification des antigènes capsulaires ou somatiques spécifiques au sérotype ou au sous-type.

Dans le cadre de la prévention de la pleuropneumonie porcine, Higgins *et al.* (1985) rapportent que la vaccination avec une bactérine ne protège que contre l'infection avec la souche homologue. Exploitant des expériences de protection croisée entre les souches des sous-types 5a et 5b, Nielsen (1988) rapporte suite à l'échec d'une protection satisfaisante par la souche T928 (5b) contre l'infection par la souche K17 (5a), qu'il existe une expression variable des déterminants antigéniques qui induisent l'immunité protectrice contre l'infection à *A. pleuropneumoniae*. La littérature sur le sérotype 5 démontre qu'il semble non seulement que peu de laboratoires s'intéressent au sous-sérotypage de routine des souches de ce sérotype, mais qu'il n'y a également aucune donnée épidémiologique sur la distribution des sous-types de ce sérotype.

Le Tableau 4 décrit entre autres, l'évolution de la distribution des souches du sérotype 5 et la contribution de chaque sous-type à partir de 1990. Sur un total de 5718 souches d'*A. pleuropneumoniae* soumises au sérotypage dans notre laboratoire depuis 1980, 1806 souches (32%) appartiennent au sérotype 5. De ces 1806 souches, 1159 (64%) ont été identifiées durant les 10 dernières années (1990-2000), soit 40% du total durant cette même période. Dans ce dernier lot, le sous-type 5b a été dominant avec une prévalence totale de 75% contre 25% pour les souches du sous-type 5a.

Les données statistiques actuelles sur les souches de champ des sous-types 5a et 5b isolées au Québec, ainsi rapportées à l'intérieur du sérotype 5, marquées par la haute prévalence du sous-type 5b, devraient influencer les prises de décisions futures dans le développement des moyens de contrôle aussi bien sur le plan du sérodiagnostic que celui de la prévention par la vaccination pour lutter contre la pleuropneumonie causée par le sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae*.

V- Références bibliographiques

Altman, E., D. W. Griffith and M. B. Perry. 1990. Structural of the O-chains of the lipopolysaccharides produced by strains of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Biochem. Cell Biol.* **68**:1268-1271.

Andersen, L. O., M. J. Jacobsen and J. P. Nielsen. 1997. Experimental vaccination of pigs with an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5b capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate. *Acta Vet. Scand.* **38**:283-293.

Angen, Ø., R. Mutters, D. A. Caugant, J. E. Olsen and M. Bisgaard. 1999. Taxonomic relationships of [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:67-86.

Baarsch, M. J., R. W. Scamurra, K. Burger, D. L. Foss, S. K. Maheswaran and M. P. Murtaugh. 1995. Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun.* **63**:3587-3594.

Bada, R., R. Higgins et S. Messier. 1995. Sensibilité des isolats porcins de *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* et *Actinobacillus suis* envers différents agents antibactériens. *Le Médecin Vétérinaire du Québec.* **25**:112-114.

Bélanger, M., C. Bégin and M. Jacques. 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* **63**:656-662.

Bélanger, M., D. Dubreuil and M. Jacques. 1994. Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **62**:868-873.

Bertam, T. A. 1990. *Actinobacillus pleuropneumoniae* : molecular aspects of virulence and pulmonary injury. *Can. J. Vet. Res.* **54**:S53-S56.

Bhatia, B., K. R. Mittal and J. Frey. 1991. Factors involved in immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Vet. Microbiol.* **29**:147-158.

Blanchard, P. C., R. L. Walker and I. Gardner. 1993. Pleuropneumonia in swine associated with a urease-negative variant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J. Vet. Diagn. Invest.* **5**:279-282.

Brandreth, S. R. and I. M. Smith. 1987. Comparative virulence of some English strains of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes 2 and 3 in the pig. *Res. Vet. Sci.* **42**:187-193.

Byrd, W. and S. Kadis. 1989. Structures and sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Infect. Immun.* **57**:3901-3906.

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

Chatellier, S., J. Harel, D. Dugourd, B. Chevallier, M. Kobisch and M. Gottschalk. 1999. Genomic relatedness among *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 and 5 isolated from healthy and diseased pigs. *Can. J. Vet. Res.* **63**:170-176.

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

Deener, H. G. and A. A. Potter. 1989b. Identification of a maltose-inductible major outer membrane protein in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Microbiol. Pathog. **6**:425-432.

Devenish, J., S. Rosendal, J. T. Bossé, B. N. Wilkie and R. Johnson. 1990. Prevalence of seroreactors to the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine herds. J. Clin. Microbiol. **28**:789-791.

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.

Dubreuil, J. D., A. Letellier, E. Stenbaek and M. Gottschalk. 1996. Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 strains using a monoclonal-based polystyrene agglutination test. Can. J. Vet. Res. **60**:69-71.

Duff, J. P., W. A. Scott, M. K. Wilkes and B. Hunt. 1996. Otitis in weaned pig: a new pathological role for *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Vet. Rec. **139**:561-563.

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

Fenwick, B. and S. Henry. 1994. Porcine pleuropneumonia. J. Am. Vet. Med. Assoc. **204**:1334-1342.

Fenwick, B. W. and B. I. Osburn. 1986. Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. Infect. Immun. **54**:575-582.

Fenwick, B. W., B. I. Osburn and H. J. Olander. 1996. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **47**:1433-1441.

Frank, R. K., M. M. Chengappa, R. D. Oberst, K. J. Hennessy, S. C. Henry and B. Fenwick. 1992. Pleuropneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 in growing and finishing pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**:270-278.

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

Frey, J., J. T. Bossé, 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. N. Rycroft, R. P. A. M. Segers, 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. Microbiol.* **139**:1723-1728.

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

Gagné, A., S. Lacouture, A. Broes, S. D'Allaire and M. Gottschalk. 1998. Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils. *J. Clin. Microbiol.* **36**:251-254.

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

Gottschalk, M., F. De Lasalle, S. Radacovici and J. D. Dubreuil. 1994. Evaluation of long chain lipopolysaccharides (LC-LPS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 for serodiagnosis of swine pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.* **38**:315-327.

Gottschalk, M., A. Lebrun, S. Lacouture, J. Harel, C. Forget and K. R. Mittal. 2000. Atypical *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates that share antigenic determinants with both serotypes 1 and 7. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12**:444-449.

Gram, T. and P. Ahrens. 1998. Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane lipoprotein. *J. Clin. Microbiol.* **36**:443-448.

Gunnarsson, A., E. L. Biberstein and B. Hurvell. 1977. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus paraahaemolyticus* (*pleuropneumoniae*): Agglutination reactions. *Am. J. Vet. Res.* **38**:1111-1114.

Higgins, R., S. Larivière, K. R. Mittal, R. Desrosiers, A. Désilets, C. Bédard-Royal, R. Éthier et J. Simard. 1982. La pleuropneumonie porcine au Québec. *Le Médecin Vétérinaire du Québec.* **12**:33-47.

Higgins, R., S. Larivière, K. R. Mittal, G. P. Martineau, P. Rousseau and J. Cameron. 1985. Evaluation of a killed vaccine against porcine pleuropneumonia due to *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.* **26**:86-89.

Hunter, D., M. A. Jones and T. McKendry. 1983. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates using ring precipitate tests. *Vet. Rec.* **113**:158.

Inzana, T. J. 1990. Capsules and virulence in the HAP group of bacteria. *Can. J. Vet. Res.* **54**:S22-S27.

Inzana, T. J., G. F. Clark and J. Todd. 1990. Detection of serotype-specific antibodies or capsular antigen of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by a double-label radioimmunoassay. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 312-318.

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.

Inzana, T. J., J. Todd. and H. P. Veit. 1993. Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infect. Immun.* **61**:1682-1686.

Jacobsen, M. J. and J. P. Nielsen. 1995. Development and evaluation of a selective and indicative medium for isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from tonsils. *Vet. Microbiol.* **47**:191-197.

Jacques, M. 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends. Microbiol.* **4**:408-410.

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

Jacques, M., G. Roy and K. R. Mittal. 1988b. Hemagglutinating properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. J. Microbiol.* **34**:1046-1049.

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.

Jensen, T. K., M. Boye, T. Hagedorn-Olsen, H. J. Riising and Ø. Angen. 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae* osteomyelitis in pigs demonstrated by fluorescent in situ hybridization. *Vet. Pathol.* **36**:258-261.

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 1 and (proposed) serotype 9. *Vet. Microbiol.* **13**:249-257.

Kamp, E. M., N. Stockhote-Zurwieden, L. A. M. G. Van Leengoed and M. A. Smits. 1997. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infect. Immun.* **65**:4350-4354.

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. Bact.* **28**:20-26.

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

Kume, K., I. Nagano and T. Nakai. 1986. Bacteriological, serological and pathological examination of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in 200 slaughtered pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.* **48**:965-970.

Lebrun, A., S. Lacouture, D. Côté, K. R. Mittal and M. Gottschalk. 1999. 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**:271-282.

Liggett, A. D. and L. R. Farrell. 1986. Acute inflammatory effects of intratracheally instilled *Escherichia coli* endotoxin and sonicated suspension of *Haemophilus pleuropneumoniae* in swine. *Can. J. vet. Res.* **50**:526-531.

Lin, G., A. E. Pearson, R. W. Scamurra, Y. Zhou, M. J. Baarsch, D. J. Weiss and M. P. Murtaugh. 1994. Regulation of interleukin-8 expression in porcine alveolar macrophages by bacterial lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **269**:77-85.

Lo, M. T., C. K. Ward and T. J. Inzana. 1998. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1704-1710.

Lombin, L. H., S. Rosendal and W. R. Mitchell. 1982. Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.* **46**:109-114.

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

MacInnes, J. I. and N. L. Smart. 1993. *Actinobacillus* and *Haemophilus*. Dans : Carlton L. G. and C. O. Thoen. 2nd ed. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Ames, Iowa State University Press. Ames. 188-200.

Mittal, K. R. and 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. Berrouard. 1993a. 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., S. Bourdon et R. Higgins. 1998. Évolution de la distribution des différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* provenant des porcs malades au Québec. Le Médecin Vétérinaire du Québec. **28**:91-92.

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.

Mittal, K. R., R. Higgins and S. Larivière. 1983a. Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect haemagglutination test. J. Clin. Microbiol. **17**:787-790.

Mittal, K. R., R. Higgins and S. Larivière. 1983b. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination tests. J. Clin. Microbiol. **18**:1351-1354.

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

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.

Mittal, K. R., R. Higgins and S. Larivière. 1988. Quantitation of serotype-specific and cross-reacting group-specific antigens by coagglutination and immunodiffusion tests for differentiating *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains belonging to cross-reacting serotypes 3, 6, and 8. *J. Clin. Microbiol.* **26**:985-989.

Mittal, K. R., R. Higgins, S. Larivière and D. Leblanc. 1984. A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Am. J. Vet. Res.* **45**:715-719.

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.

Mittal, K. R., E. M. Kamp and M. Kobisch. 1993b. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains 1, 9 and 11. *Res. Vet. Sci.* **55**:179-184.

Moller, K., L. V. Andersen, G. Christensen and M. Kilian. 1993. Optimization of the detection of NAD dependant Pasteurellaceae from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. *Vet. Microbiol.* **36**:261-271.

Nakai, T., K. Kawahara, H. Danbara and K. Kume. 1992. Identification of the cross-reacting antigen among *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1, 9 and 11 by use of monoclonal antibodies. *J. Vet. Med. Sci.* **54**:707-710.

Negrete-Abascal, E., V. R. Tenorio, A. L. Guerrero, R. M. García, M. E. Reyes and M. de la Garza. 1998. Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an common antigen to all serotypes. *Can. J. Vet. Res.* **62**:183-190.

Nicolet, J. 1971. Sur l'hémophilose du porc. III. Différenciation sérologique de *Haemophilus parahaemolyticus*. *Zbl. Bakt. I. Hyg. Abt. Orig.* **216**:487-495.

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

Nicolet, J. 1994. Rôle des toxines Apx dans la virulence d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Bull. Acad. Vet. De France.* **67**:233-238.

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

Nielsen, R. 1970. *Haemophilus parahaemolyticus* as the cause of pleuropneumonia in swine II. Studies on the identity and pathogenicity of organism isolated. *Nord. Vet. Med.* **22**:246-255.

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

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. Acta Vet. Scand. **27**:453-455.

Nielsen, R. 1988. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5, subtypes a and b: cross protection experiments. Acta Vet. Scand. **29**:67-75.

Nielsen, R. and M. Mandrup. 1977. Pleuropneumonia in swine caused by *Haemophilus parahaemolyticus*. A study of the epidemiology of the infection. Nord. Vet. Med. **29**:465-473.

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., T. Plambeck et N. T. Foged. 1991. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. J. Clin. Microbiol. **29**:794-797.

Nielsen, R. L., O. Andersen, T. Plambeck, J. P. Nielsen, L. T. Krarup and S. E. Jorsal. 1997. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds. *Vet. Microbiol.* **54**:35-46.

Niven, D. F., J. Donga and F. S. Archibald. 1989. Responses 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.

Niven, D. F. and M. Lévesque. 1988. V-Factor-dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 (Bertschinger 2008/76). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:319-320.

Oishi, E., H. Ito, T. Okabe and N. Terakado. 1993. Passive protection of mice against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection by monoclonal antibodies. *J. Vet. Med. Sci.* **55**:711-715.

O'Reilly, T. and D. F. Niven. 1986. Defining the metabolic and growth responses of porcine haemophili to exogenous pyridine nucleotides and precursors. *J. Gen. Microbiol.* **132**:807-818.

Paradis, S. É., D. Dubreuil and M. Jacques. 1996. Examination of surface polysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 grown under iron-restricted conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **137**:201-206.

Paradis, S. É., D. Dubreuil, S. Rioux, M. Gottschalk and M. Jacques. 1994. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect. Immun.* **62**:3311-3319.

- 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 (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains. *Serodiag. Immunother. Infect. Dis.* 4:299-308.
- Phillips, J. E.** 1990. *Actinobacillus*. Dans : G. R. Carter, J. R. Cole, and Jr. 5th ed. *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology*. San Diego, California 92101, Academic Press, Inc. 143-149.
- Pilet, C. et al.** 1987. *Bactériologie médicale et vétérinaire, systématique bactérienne*. Paris, Doin Éditeurs. 169-170.
- 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* comb. Nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33:510-514.
- Radacovici, S., M. Gottschalk and J. D. Dubreuil.** 1995. Recovery of long-chain lipopolysaccharides from liquid culture of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serotype 5) for ELISA serodiagnosis. *Vet. Res.* 26:63-67.
- Rapp, V. J., R. F. Ross and B. Z. Erickson.** 1985. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody tests in swine. *Am. J. Vet. Res.* 46:185-192.

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

Rika, A. V. J., 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. Gutiérrez-Martin, R. I. Tascón, 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. and Med. Microbiol.* **16**:173-181 .

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

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

Rosendal, S., L. Lombin and J. DeMoor. 1981. Serotyping and detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* by indirect fluorescent antibody technique. *Can. J. Comp. Med.* **45**:271-274.

Rycroft, A. N. and L. H. Garside. 2000. *Actinobacillus* species and their role in animal disease. *The Veterinary Journal.* **159**:18-36.

Schaller, A., R. Kuhn, P. Kuhnert, J. Nicolet, T. J. Anderson, J. I. MacInnes, R. P. A. M. Segers and J. Frey. 1999. Characterization of ApxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology.* **145**:2105-2116.

Schultz, R. A., R. F. Ross, A. Gunnarson and R. Nielsen. 1983. Serotyping 50 different isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* from swine pneumonia in Iowa and surrounding states. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* **78**:1451-1453.

Sebunya, T. N. K. and J. R. Saunders. 1983. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **182**:1331-1336.

Sebunya, T. N. K., J. R. Saunders and A. D. Osborne. 1982. Characteristics of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates and some epidemiological findings on porcine *Haemophilus pleuropneumoniae* in Saskatchewan. *Can. Vet. J.* **23**:224-228.

Sidibé, M., S. Messier, S. Larivière, M. Gottschalk and K. R. Mittal. 1993. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. *Can. J. Vet. Res.* **57**: 204-208.

Stenbaek, E. I., F. De LaSalle and M. Gottschalk. 1997. Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 using an inhibition enzyme immunoassay. *Can. J. Vet. Res.* **61**:1-7.

Tadjine, M. and K. R. Mittal. 2001. Study of antigenic heterogeneity among *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 strains. *Vet. Microbiol.* **78**:49-60.

Trottier, Y. L., P. F. Wright and S. Larivière. 1992. Optimization and standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay protocol for serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *J. Clin. Microbiol.* **30**:46-53.

Udeze, F. A. and Kadis. 1992. Inhibition of bactericidal activity of anticapsular antibody by nonspecific antibodies reactive with surface-exposed antigenic determinants on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **60**:3852-3860

Vaillancourt, J., G. -P. Martineau, R. Higgins et S. Larivière. 1987. Pleuropneumonie porcine à *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Partie 2: De la situation épidémiologique mondiale à celle du Québec. *Le Médecin Vétérinaire du Québec.* **17**:189-193.

Veary, C. M. 1989. *Haemophilus pleuropneumoniae* in pigs: A review. *J. South African Vet. Assoc.* **60**:56-61.

Ward, C. K. and T. J. Inzana. 1994. Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **153**:2110-2121.

Wilma, T. C., Y. A. Nedialkov, B. J. Thacker and M. H. Mulks. 1996. Molecular characterization of a common 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**:83-90.

VI- Annexes

ANNEXE 1

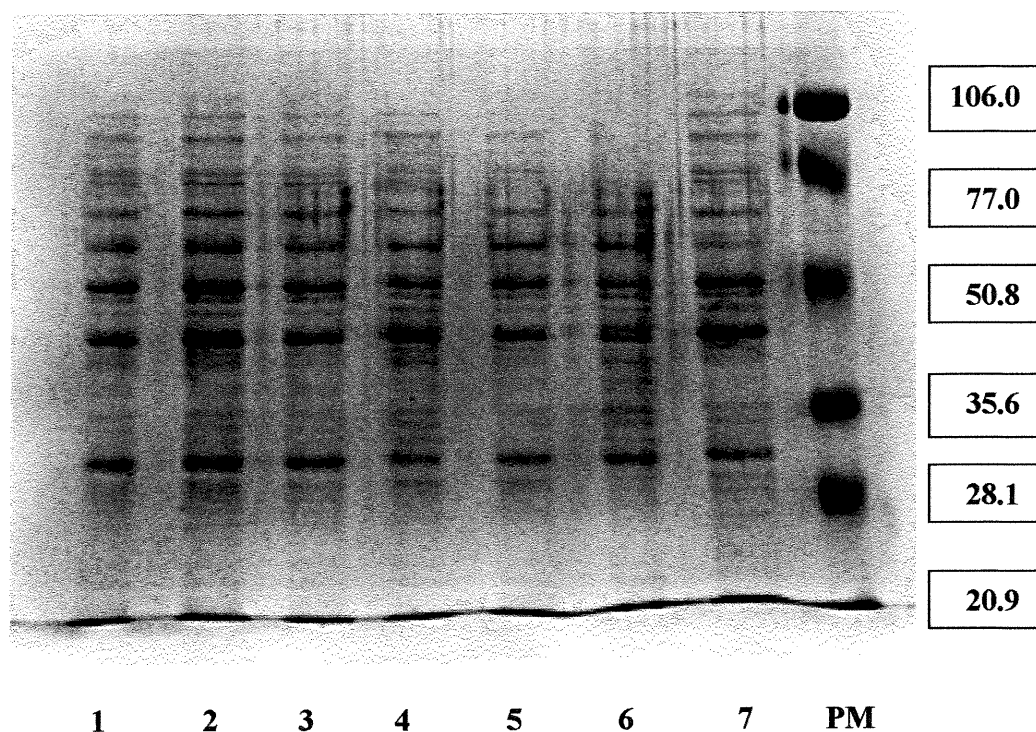


FIGURE 2. Profils des protéines de la membrane externe des souches d'*A. pleuropneumoniae* du sérotype 5 en SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium). Coloration au bleu de Coomassie. Lignes 1-5: souches de champ; ligne 6: souche 81-750 (5b); ligne 7: souche K17 (5a); PM = poids moléculaires en kilodaltons.

ANNEXE 2

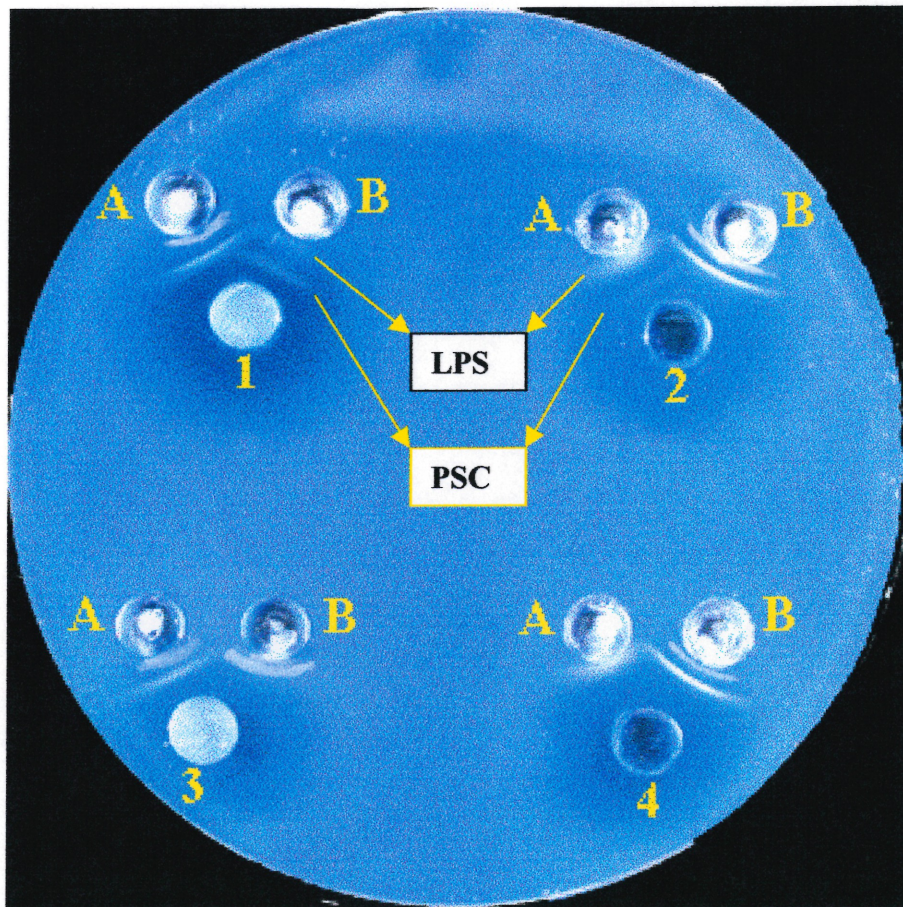


FIGURE 3. Réactivité sérologique des souches de référence et de champ d'*A. pleuropneumoniae* du sérotype 5 en immunodiffusion. Puits A: antigènes des souches du sous-type 5a; Puits B: antigènes des souches du sous-type 5b; Puits 1: anti-K17 non adsorbé; Puits 2: anti-81-750 non adsorbé; Puits 3: anti-K17 adsorbé avec la souche 81-750; Puits 4: anti-81-750 adsorbé avec la souche K17.

N. B. Les lignes de précipitation des polysaccharides capsulaires (PSC) entre 1 et B (réaction hétérologue) et, 2 et A (réaction hétérologue) donnent respectivement une identité partielle avec les lignes de précipitation des PSC entre 1 et A (réaction homologue) et, 2 et B (réaction homologue); et **disparaissent en présence des mêmes antisérums adsorbés**. Seuls les LPS réagissent avec ces derniers.

ANNEXE 3



1 2 3 4 5

FIGURE 4. Morphologie des colonies des souches de référence et de champ d'*A. pleuropneumoniae* du sérotype 5 en serum soft agar (croissance de la bactérie en milieu semi-solide en présence d'antisérums). Tube 1: milieu PPLO semi-solide (1); Tube 2: (1) + sérum normal de lapin; Tube 3: (1) + antisérums contre les autres sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*; Tube 4: (1) + anti-K17; Tube 5: (1) + anti-81-750.

N. B. Les tubes 1-3 (Témoins négatifs) présentent des colonies mucoïdes diffuses qui sont converties en colonies compactes dans les tubes 4-5 (**réaction positive**) en présence des deux antisérums spécifiques. Réaction identique pour toutes les souches de référence et de champ des deux sous-types avec les deux antisérums (pas de distinction évidente entre 5a et 5b).